(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202100200 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.28

(22) Дата подачи заявки
2019.12.27

(51) Int. Cl. ***C12N 9/72*** (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/49 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/786,302**
(32) **2018.12.28**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/068839**
(87) **WO 2020/140101 2020.07.02**

(71) Заявитель:
КАТАЛИСТ БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Мэдисон Эдвин Льюис, Тсанос Кристофер Деннис, Сорос Ванесса, Попков Михаил, Типтон Кимберли, Трейлор Мэттью Джон, Фурфайн Эрик Стивен, Вэй Джеффри Чарльз (US)

(74) Представитель:
Стояченко И.Л. (RU)

(57) Предложены u-PA полипептиды и слитые белки, содержащие полипептиды u-PA. Полипептиды u-PA модифицированы с изменением активности и/или специфичности, так что они расщепляют белок комплемента, такой как белок комплемента C3, тем самым ингибируя активацию комплемента. Модифицированные полипептиды u-PA и слитые белки, которые ингибируют активацию комплемента, могут быть использованы для лечения заболеваний и нарушений, опосредованных активацией комплемента, или в которых активация комплемента имеет значение. Эти нарушения включают ишемические и реперфузионные нарушения, включая инфаркт миокарда, сепсис, аутоиммунные заболевания, диабетическую ретинопатию, возрастную макулярную дегенерацию, отторжение трансплантированного органа, воспалительные нарушения и нарушения с воспалительным компонентом.

202100200 A1

202100200 A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

Приоритет заявлен в предварительной заявке на патент США No62 /786,302, озаглавленной "МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА УРОКИНАЗНОГО ТИПА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ, поданной 28 декабря 2018 г. авторы изобретения EdwinLMadison, ChristopherThanos, MikerailPopkov, VanessaSoros и KimberlyTipton, и заявитель Biosciences, Inc., объект настоящей заявки включен в настоящий документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫХ ЭЛЕКТРОННЫМ СПОСОБОМ

Подана электронная версия перечня последовательностей, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Электронный файл был создан в декабре 26, 2019, имеет размер 2,294 килобайт и назван 4940 seqPC1txt

Область техники, к которой относится изобретение

Предложены модифицированные полипептиды u-PA, которые расщепляют белок комплемента, тем самым ингибируя активацию комплемента. Благодаря этому ингибированию модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы для лечения заболеваний и состояний, опосредованных комплементом или в которых активация комплемента играет роль.Эти заболевания и состояния включают, но не ограничиваются ими, офтальмологические показатели, включая макулярную дегенерацию, такую как возрастная макулярная дегенерация (AMD) и болезнь Старгардта, почечная

отсроченная функция трансплантата (DGF), ишемические и реперфузионные расстройства, включая инфаркт миокарда и инсульт, сепсис, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания и заболевания с воспалительным компонентом, включая болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные расстройства.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента (С) является частью иммунной системы и играет роль в устранении инвазионных патогенов и в инициации воспалительного ответа. Система комплемента человека и других млекопитающих включает более 30 растворимых и мембраносвязанных белков, которые участвуют в упорядоченной последовательности реакций, приводящих к активации комплемента.Система комплемента крови имеет широкий ряд функций, связанных с широким спектром механизмов защиты хозяина, включая противомикробные и противовирусные действия. Продукты, полученные из активации С компонентов, включают в себя несамораспознающие молекулы C3b, C4b и C5b, а также анафилаксины C3a, C4a и C5a, которые влияют на множество клеточных иммунных ответов. Эти анафилаксины также действуют как провоспалительные агенты.

Система комплемента состоит из матрицы ферментов и неферментативных белков и рецепторов. Активация комплемента происходит по одному из трех основных режимов, известных как "классический" путь, "альтернативный" путь и соответствующий лектиновый путь (см. фиг. 1). Комплемент обычно активируется или запускается с помощью 1 из этих 3 путей, которые, как показано на фиг.1, сходятся при активации C3. В четвертом механизме активации комплемента, указываемом как внутренний путь, сериновые протеазы, ассоциированные с коагулирующим/фибринолитическим каскадом, активируют систему комплемента непосредственно посредством расщепления C3 или C5, независимо от классических, альтернативных и лектиновых путей.

Эти пути могут различаться способом, который инициирует активацию комплемента. Классический путь инициируется комплексами антитело-антиген или агрегированными формами иммуноглобулинов; альтернативный путь инициируется распознаванием структур на микробных и клеточных поверхностях; и лектиновый путь, который представляет собой независимый от антитела путь, инициируется связыванием маннан-связывающего лектина (MBL , также обозначаемый связывающий маннозу белок) с углеводами, такими как те, которые отображаются на поверхности бактерий или вирусов. Активация каскадов приводит к получению комплексов, вовлеченных в протеолиз или лизис клеток, и пептидов, вовлеченных в опсонизацию, анафилаксию и хемотаксис.

Каскад комплемента, который является центральным компонентом иммунного ответа животного, является необратимым каскадом. Многочисленные белковые кофакторы регулируют процесс. Несоответствующая регуляция, обычно несоответствующая активация, может быть фаской или может происходить во множестве расстройств, которые включают неподходящие воспалительные и иммунные ответы, такие как наблюдаемые при острых и хронических воспалительных заболеваниях и других условиях, включающих неадекватный иммунный ответ.Эти заболевания и расстройства включают аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит и волчанка, нарушения сердечной деятельности и другие воспалительные заболевания, такие как сепсис и ишемически-реперфузионное повреждение.

Из-за вовлеченности путей комплемента во множестве заболеваний и состояний компоненты пути комплемента являются мишенями для терапевтического вмешательства, в частности, для ингибирования пути. Примеры таких терапевтических средств включают синтетические и природные низкомолекулярные терапевтические средства, ингибиторы антител и рекомбинантные растворимые формы мембранных регуляторов комплемента. Существуют ограничения для стратегий получения таких терапевтических средств.Небольшие молекулы имеют короткие времена жизни invivo и

нуждаются в непрерывной инфузии для поддержания ингибирования комплемента, тем самым ограничивая их роль, особенно при хронических заболеваниях. Терапевтические антитела могут приводить к иммунной реакции у субъекта и, таким образом, могут привести к осложнениям при лечении, в частности к лечению, предназначенному для модуляции иммунных ответов. Таким образом, существует потребность в терапии для лечения заболеваний и заболеваний, опосредованных комплементом, в которых активация комплемента играет роль. Они включают острые и хронические воспалительные заболевания. Соответственно, среди целей, описанных в данном документе, целью является обеспечение таких терапевтических средств для нацеливания на активацию каскада комплемента и для обеспечения терапевтических средств и способов лечения заболеваний.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены модифицированные полипептиды активатора плазминогенаурокиназного типа (u-PA), которые включают инсерции, делеции и/или замены аминокислот в протеазном домене, которые приводят к увеличению активности расщепления белка C3 комплемента по сравнению с доменом протеазы u-PA дикого типа (где домен протеазы может включать замену свободного CyshaSer для уменьшения/устранения агрегации). Модифицированные полипептиды u-PA являются любыми, которые содержат домен протеазы, такой как полноразмерная активированная протеаза, их зимоген, и слитые белки содержат модифицированный полипептид u-PA и партнер слияния, который придает фармакологическое свойство или активность. Модифицированные полипептиды u-PA и слитые белки, содержащие модифицированные полипептиды u-PA, когда они находятся в активной форме, ингибируют активацию комплемента.В частности, эти полипептиды и слитые белки расщепляют C3, в результате чего активность C3 ингибируется или устраняется.

Модификации, включая делеции аминокислот, замены и вставки, представленные в настоящем документе, находятся в протеазном домене.

Модифицированные полипептиды u-PA включают или представляют собой протеазные домены. Модифицированные полипептиды u-PA дополнительно могут включать посттрансляционные и другие модификации в отличную от первичной аминокислотную последовательность, такие как конъюгация или связь с другими полипептидами и фрагментами, которые изменяют свойства, такие как период жизни в сыворотке, и устойчивость к эндогенной протеазы. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, связь с альбумином, связь с альбумином-мультимеризация домена (ов) и ПЭГилирование. Таким образом, модифицированные полипептиды u-PA могут быть модифицированы путем ПЭГилирования, альбуминилирования, фарнизилирования, карбоксилирования,гидроксилирования, фосфорилирования и других полипептидных модификаций, известных в данной области техники. При модификации происходит замена свободного цистеина на зимоген, такой как C122, серином или аланином, для снижения агрегации, в частности при экспрессии invitro. Эта замена является необязательной и не обязательно включена в полипептиды, которые должны быть пэгилированы или экспрессированыinvivo.

Модифицированные полипептиды u-PA инактивируют белок C3 комплемента посредством расщепления. Модифицированные полипептиды u-PA расщепляют C3, чтобы, таким образом, ингибировать активацию комплемента, они расщепляют C3 на активном участке, что инактивирует или ингибирует активность C3, тем самым ингибирует активацию комплемента. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, были выбраны и предназначены для расщепления в пределах QHARASHLG, и в частности, где P1-P1' представляет собой RA (QHAR ¯ ASL; см. SEQIDNO: 47 остатков 737-744, где расщепление находится между остатками 740 и 741). В результате эти модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы в качестве терапевтических средств для лечения расстройств, заболеваний и/или состояний, в которых активация комплемента играет роль, так что их ингибирование может лечить расстройства, заболевания и/или состояния. Модифицированные полипептиды u-PA также могут иметь

пониженную активность для нативного субстрата, такого как плазминоген, по сравнению с u-PA дикого типа или по сравнению с таким, который имеет замену, соответствующую C122S.

Среди заболеваний и состояний, для которых модифицированные полипептиды u-PA находятся любые опосредованные C3 или комплемент-опосредованные или вовлеченные заболевания и условия. Они включают офтальмологические расстройства, такие как возрастная дегенерация AMD и диабетические ретинопатии, и отторжение органа, такое как отложенная функция почек (DGF), а также другие заболевания, расстройства и состояния, которые могут быть обработаны путем ингибирования активации комплемента.AMD обрабатывают путем введения в стекловидное тело, например, интравитреальной инъекцией или интраретинальной или субретинальной инъекцией, и DGF обрабатывают внутривенным или другим системным введением. Модифицированные u-PA полипептиды и слитые белки могут быть дополнительно модифицированы, например, посредством ПЭГилирования, для усиления или улучшения или придания желаемых фармакологических свойств, в том числе увеличенного периода жизни и/или пониженной иммуногенности. Другие заболевания и состояния включают, например, ревматоидный артрит (RA), глазные заболевания,мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN), рассеянный склероз (MS), миастению гравис (MG), астму, воспалительное заболевание кишечника, иммунное комплексное (IC)-опосредованное острое воспалительное повреждение тканей, болезнь Альцгеймера (AD), ишемически-реперфузионное повреждение, атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS) и комплемент 3 гломерулопатии (C3G). Немодифицированные полипептиды u-PA включают формы предшественника, зрелые формы, каталитический домен и их каталитически активные формы, а также слитые белки, такие как те, которые описаны в примерах 14-16.6 Примером немодифицированнойu-PA являются полипептиды, последовательности которых представлены в SEQIDNO: 1-6. включенные среди немодифицированных полипептидов u-PA те, в которых свободный цистеин в каталитическом домене (соответствующий C122 посредством нумерации

химотрипсина) заменен другой аминокислотой, такой как S или A, в частности S, которая не изменяет каталитическую активность, но уменьшает агрегацию полипептидов.Понятно, что все модифицированные полипептиды u-PA могут включать замену, в общем, S, на остаток, соответствующий C122 посредством нумерации химотрипсина.Среди модифицированных урокиназных активаторов плазминогена (u-PA) полипептидами, представленными в настоящем документе, являются те, которые содержат одну или более модификаций аминокислот, выбранных из замен, соответствующих R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI и H99Q, и консервативных аминокислотных модификаций для них, при этом модифицированный полипептид u-PA обладает повышенной активностью/специфичностью для белка комплемента по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида u-PA,где остатки пронумерованы посредством нумерации химотрипсина; немодифицированный полипептид u-PA содержит последовательность, представленную в любом из SEQIDNo: 1-6 (полноразмерная u-PA человека дикого типа, протеаза дикого типа (каталитический) домен u-PA, зрелая u-PA дикого типа, полноразмерная u-PA с заменой, соответствующей C122S, домен протеазы u-PA с заменой, соответствующей C122S, и зрелой u-PA с заменой, соответствующей C122S) и ее каталитически активным фрагментом, который включает замену (ы) аминокислоты.Консервативные модификации выбраны из R35Y, W, F или N; H37 R, Q, E, W или F, V41K, D60aS, T97aD, L или V, L97ГК или S и H99N, посредством нумерации химотрипсина.В частности, среди этих модифицированных полипептидов урокиназного активатора плазминогена (uPA) имеются те, которые содержат одну или несколько модификаций аминокислот, выбранных из замен, соответствующих R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI и H99Q.

Модифицированные полипептиды u-PA обладают пониженной активностью и/или специфичностью для расщепления последовательности субстрата в плазминогене. Белок комплемента, для которого полипептиды обладают повышенной специфичностью/активностью, представляет собой C3; расщепление инактивирует C3. Примеры сайтов расщепления находятся в

пределах активного участка C3. Среди модифицированных полипептидов u-PA-те, которые обладают повышенной активностью для расщепления C3, которая по меньшей мере в 3 раза больше, чем немодифицированный полипептид u-PASEQIDNO: 5 (домен протеазы с заменой C122S).

Модифицированные полипептиды u-PA включают те, которые содержат замену H37Y, такую как замену H37Y/V38E. Модифицированные полипептиды u-PA включают те, которые содержат замены R35Y/H37K или R35Q/H37K, такие как те, которые содержат замены R35Y/H37K/V38E или R35Q/H37K/V38E.

Также предложены модифицированные полипептиды u-PA, включая описанные выше, которые также содержат замену L97bA и/или R35Q, и/или H99Q, и/или D60aP, и/или T97aI.

Модифицированный полипептид u-PA может дополнительно включать аминокислотные замены, соответствующие T39Y, T39W, T39F, такие как T39Y, или консервативные замены, выбранные из T39M или T39L. Другие модифицированные полипептиды u-PA, включают или дополнительно включают аминокислотные замены R35Q/H37Y и/или V38E/V41R/Y149R.

Другими из модифицированных полипептидов u-PA являются те, которые содержат модификацию V41R, такие как модифицированные полипептиды u-PA, содержащие модификации V38E/V41R, включая те, которые дополнительно содержат замену в одном или более положениях R35, H37 и V38. Они включают модифицированный полипептид u-PA, в котором замена в V38 представляет собой E, такую как, например, модифицированные полипептиды u-PA, содержащие R35Y/H37S/V38E/V41R, H37Y/V38E, и другие комбинации остатков, которые способствуют расщеплению C3 и/или стабильности, например, в жидкости организма.

Среди модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, имеются те, которые имеют ED50 для расщепления инактивацией C3 менее или 100 нМ, или 50 нМ или 30 нМ или 25 нМ при

анализе invitro. Примерами данных являются те, которые изложены в таблице 14, где ED50 составляет 100 нМ или менее, или те, которые представлены в таблице 14, где ED50 составляет менее 50 нМ, или те, которые представлены в таблице 14, где ED50 составляет менее 30 нМ, или те, которые представлены в таблице 14, где ED50 меньше 25 нМ.Пример анализа для оценки ED50 представляет собой инкубацию белка комплемента человека С3 с различными концентрациями каждой модифицированной протеазы в течение 1 часа при 37° С для определения ED50. В частности, модифицированные полипептиды u-PA являются любыми, которые расщепляют С3 с ED50 50 нМ или менее.

Немодифицированные полипептиды u-PA могут состоять из последовательности аминокислот, представленной в любой из SEQIDNO: 1-6, или могут включать дополнительные модификации, включая дополнительные вставки и делеции. Любая из замен, инсерций или делеций в данном документе может быть включена в немодифицированные полипептиды u-PA, например домен протеазы, в частности домен протеазы SEQIDNO: 5. Модифицированный полипептид u-PA может иметь по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с полипептидами любого из SEQIDNO: 1-6 или его каталитически активной частью. Модифицированные полипептиды u-PA могут содержать 1 или до 2,3,4, 5,6,7, 8,9,10, 11,12,13, 14, 15, 16 или 17 аминокислотных замен, инсерций или делеций по сравнению с немодифицированным полипептидом u-PA любой из SEQIDNO: 1-6 или его каталитически активной частью.

Следовательно, предложены модифицированные полипептиды u-PA, которые содержат модификацию V41R, или H37Y, или L97bA, или R35Q, или H99Q, или D60aP, или T97aI или их комбинации. Любой из модифицированных полипептидов u-PA может дополнительно содержать замену аминокислоты, соответствующую T39Y, T39W, T39F или ее консервативные замены, выбранные из T39M или T39L. В частности, модифицированные полипептиды u-PA могут дополнительно содержать замену аминокислоты T39Y, такую как комбинация

T39Y/V41R и до 12 или 13 дополнительных модификаций, а также возможно C122S. Любой из модифицированных полипептидов u-PA дополнительно может содержать замену аминокислоты V38E и может дополнительно содержать одну или более аминокислотных модификаций R35Q, Y60bQ и/или Y149R. Любой из модифицированных полипептидов u-PA может дополнительно содержать аминокислотную модификацию R37aE или R37aS. Следовательно, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут содержать замены R35Q/H37Y/T39Y/V41R или R35Q/H37Y/T39Y/V41R/C122S. Любой из модифицированных полипептидов u-PA может содержать замену, соответствующую H99Q.

Среди модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, имеются те, которые содержат модификации аминокислот R35Q/H37Y/ T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122SилиR35Q/H37Y/ T39Y/V41R/L97bA/H99Q, илиT39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99QилиT39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S илиT39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122Sили T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S.

Также среди модифицированных u-PAполипептидов те, которые содержат модификации Y40Q/V41L/L97bA/C122SилиY40Q/V41R/L97bA/C122SилиY40Q/V41L/L97bAи лиY40Q/V41R/L97bAили R37aS/V41R/L97bG/H99Q или R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S или T39Y/V41L/L97bA/H99Q/C122S или T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S, атакжесодержащиемодификации R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/ Y149R или R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R. атакжеполипептидысмодификациями H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/ Y149R; или

R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/
Y149R
или
R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
149R
или
R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/
Y149R
или

R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R

или

R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R

или

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R

или

R35Q/H37T/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R

или

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R

или

R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R или

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R или

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C1 22S или

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A или

R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T или

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T или

каждая без замен вС122. Примерами таких модифицированных u-РАполипептидов являются те, которые содержат модификацииR35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R.

Примерами этих полипептидов являются те последовательности, которые представлены в любой из SEQIDNO: 8-44 и 987, такие как 21 и 39-44, а также предшественники и полноразмерные модифицированные полипептиды u-PA, которые содержат полипептиды, последовательности которых представлены в SEQIDNO: 8-44 и их каталитически активные части.Также понятно, что в любом из модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, Cys в остатке 122 посредством нумерации химотрипсина, может быть замещен Ser или может оставаться Cys.

Cys сохраняется для вариантов осуществления, в которых полипептид, включая слитые белки, содержащий модифицированный домен протеазы u-PA, предназначен для использования в качестве двухцепочечной формы, в которой свободный C122 образует дисульфидную связь с другим свободным Cys в полипептиде, или Cys модифицирован, например, путем ПЭГилирования.Во всех вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, положение 122 может быть Cys или Ser. Специалист в данной области может выбрать соответствующий остаток в зависимости от предполагаемого использования.

Немодифицированный полипептид u-PA содержит домен протеазы любой из SEQIDNO: 1-6 или его каталитически активную часть, включая или содержащий только домен протеазы SEQIDNO: 2 или SEQIDNO: 5.

Модифицированный полипептид u-PA может содержать дополнительные модификации, включая посттрансляционные модификации, модификации, которые вводят или удаляют сайт гликозилирования, модификацию, такую как связь или конъюгация с полимером, таким как ПЭГ, для увеличения периода жизни в сыворотке и/или для снижения иммуногенности или и того, и другого. В частности, любые и все модифицированные полипептиды u-PA, описанные и представленные в настоящем документе, могут быть ПЭГилированными. Представлены слитые белки, содержащие модифицированные полипептиды u-PA, упомянутые в настоящем документе, такие как слитые с Fc-доменом, или нацеливающим агентом, специфичным для целевой клетки или антигена.

Среди модифицированных полипептидов u-PA и слитых белков, представленных в настоящем документе, имеются те, которые имеют стабильность более чем 50% или 80% после инкубации в PBS, или в жидкости организма, такой как водные гуматы или сыворотка в течение 7 дней. Кроме того, среди модифицированных полипептидов u-PA имеются те, которые, когда они находятся в активной форме, имеют по меньшей мере 100-кратное снижение активности плазмина по сравнению с соответствующей формой немодифицированного полипептида u-PA.

Также среди модифицированных полипептидов u-PA и слитых белков, представленных в настоящем документе, имеются те, которые имеют ED50 для расщепления инактивацией C3 менее или 100 нМ, или 50 нМ или 30 нМ или 25 нМ или 15 нМ или 10 нМ в анализе invitro, таком как любой пример в Примерах в данном документе.Они включают полипептиды, которые содержат или представляют собой протеазные домены, представленные в таблице 14, которая перечисляет многочисленные мутации мутации и ED50 для модифицированных полипептидов полипептида u-PA, которые демонстрируют ED50, оцененную, как описано в примере 2. Модифицированные полипептиды u-PA и слитые полипептиды, которые имеют ED50 100 нМ или менее, менее 50 нМ, менее 30 нМ, менее 25 нМ, менее 15 нМ, менее 10 нМ, имеются среди тех, которые могут быть использованы в качестве доменов протеаз или в более длинных u-PA формах и/или в слитых белках, как описано в настоящем документе.

Представлены конъюгированные белки, включая слитые белки, содержащие модифицированный полипептид u-PA или каталитически активную часть любого из модифицированных полипептидов u-PA, слитых с непротеазным полипептидом или его частью. Предусмотрены также не протеазные полипептиды, такие как те, которые включают домен мультимеризации, такой как домен Fc, полипептид, такой как альбумин, который повышает стабильность сыворотки, или домен трансдукции белка (PTD).

Как обсуждалось выше, все модификации могут быть в немодифицированных полипептидах, последовательности которых представлены в любой из SEQIDNO: 1-6 и их каталитически активных частей. Среди полипептидов включены те, в которых немодифицированныйполипептид имеет последовательность, представленную в SEQIDNO: 5 (домен протеазы с заменой C122S).

Также предложены слитые белки, которые содержат модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе, и дополнительные полипептиды, такие как сывороточный альбумин, мультимерные домены, сигнальные последовательности и другие транспортирующие последовательности и теги для облегчения экспрессии и выделения. Слитые белки также могут включать последовательности активации для активации u-PA-частей.Активные формы слитых белков получают при экспрессии и удалении сигнальных последовательностей и любой другой обработке и транспортировании сигналов, чтобы привести к активным слитым белкам, которые расщепляют C3. Активные формы слитых белков включают 2-цепочечные активированные формы, а также димеры, такие как продукты, полученные в результате включения мультимеризующего домена.

Среди слитых белков имеются те, которые содержат модифицированный полипептид u-PA или каталитически активную часть модифицированного полипептида u-PA, например, в таблице 14, где имеются слитые с непротеазным полипептидом или его частью. Слитые белки также могут включать в себя последовательности активации и, перед обработкой, сигнальные последовательности и другие транспортирующие сигналы. Непротеазные полипептиды включают, но не ограничиваются ими, любые известные специалистам в данной области техники для придания желаемой фармацевтической активности или свойства, мультимеризационный домен, такой как Fc, домен белковой трансдукции (PTD), домен связывания гиалуроновой кислоты (HABD), антитело к мишени для конкретного антигена. Слитые белки также могут включать последовательности активации, такие как нативная последовательность активации u-PA или последовательность

активации фурана.Примерами последовательностей активации фурана являются те, которые являются или содержат QSGQKTLRRRKR (SEQIDNO: 996) или QCGQKTLRRRKR (SEQIDNO: 995) или QSGQKTLRRKR (SEQIDNO: 1044) или сайт активации фурана, имеющий по меньшей мере 98% идентичность последовательности с ней.

Например, слитые белки, которые содержат любой из модифицированных полипептидов u-PA, как описано или предоставлено в данном документе, а также включают, перед обработкой или активацией, сигнальную последовательность и модифицированный полипептид u-PA или его каталитически активную часть. Сигнальные последовательности для кодирования секреции слитых белков включают, например, сигнальную последовательность из Il -2, u-PA или IgGk.

Слитые белки могут включать партнер слияния, такой как мультимеризационный домен, или полипептид, который увеличивает полупериод жизни в сыворотке, или который придает другому желаемое фармакологическое свойсто или активность. Примерами являются альбумин, или Fc-домен, или одноцепочечное антитело или другой антигенсвязывающий фрагмент антитела, или домен, связывающий гиалуроновую кислоту (HABD). Примеры партнеров по слиянию включают, но не ограничиваясь ими, ген-стимулированный фактор некроза опухоли -6 (TSG -6); HSA, IgGFc, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такие как фрагмент scFv антитела к коллагену II типа или антитело против VEGFR или его фрагмент.

Слитые белки также могут включать последовательность активации, так что полученный слитый белок, содержащий u-PA, находится в активной форме, такой как двухцепочечная форма. Активационные последовательности могут содержать или быть модифицированы, чтобы содержать цистеин, который может образовывать дисульфидную связь со свободным Cys, таким как C122, в модифицированном полипептиде u-PA, посредством чего при активации

полученный активированный полипептид содержит две цепи.Иллюстративные последовательности активации представляют собой последовательность активации u-PA и последовательность активации фурана, и ее модифицированные формы, такие как последовательность активации, которая имеет последовательность, представленную в любой из SEQIDNO: 995-998, 1041 и 1044, или последовательность, имеющую по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности с ней.

Примерами слитых белков являются те, которые содержат последовательность активации, модифицированный полипептид u-PA и HSA, такие как любая из последовательностей аминокислот, представленных в любой из SEQIDNO: 1014,1015,1016, 1019 и 1040, или модифицированная форма, имеющая по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности (и содержащая модификации в последовательности u-PA-части). Для применения в способах лечения слитые белки обычно не содержат сигнальную последовательность.Для применения в способах генной терапии нуклеиновая кислота может кодировать сигнальную последовательность.

Представлены такие слитые белки, которые содержат последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQIDNO: 1004-1019 и 1034-1040, или любую, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности (и содержащую модификацию в последовательности u-PA-части). Примерами слитых белков являются те, которые имеют последовательность аминокислот, представленную в SEQIDNO: 1015 или 1019. В частности, последовательность сигналов удаляется перед использованием или при экспрессии invivo или при продуцировании invitro. Они включают те, которые находятся в двухцепочечной активированной форме, содержащей цепь и цепь B.

Например, слитые белки, где цепь B начинается с остатков IIGG модифицированного полипептида u-PA и заканчивается на C-конце слитого белка, такого как те, которые содержат модифицированный полипептид u-PA и HSA, те, которые содержат последовательность аминокислот, представленную в

любой из SEQIDNos 1005,1011,1014, 1015 и 1036, но не содержащей сигнальную последовательность. Примеры слитых белков в активированной форме представляют собой слитый белок, который содержит цепь из остатков 21-178, и В-цепь остатков 179-с С-концом белка с дисульфидной связью между остатками 168-299, следует понимать, что они также включают слитые белки, имеющие по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичность последовательности (и содержащие модификации в последовательности u-PA-части).Например, предусмотрен слитый белок, содержащий цепь А и цепь В, где цепь А состоит из остатков 21-178 SEQIDNo.1015, и цепь В состоит из остатков 179-1022; и цепи А и В связаны посредством дисульфидного мостика между С168 и С299 SEQIDNO: 1015.

Другие слитые белки, предложенные в настоящем документе, содержат мультимеризующие домены, так что при обработке они образуют мультимеры, такие как димеры, которые проявляют взаимодействие комплементарных мультимеризационных доменов, таких как Fc-домены.

Также предложены комбинации, которые могут быть упакованы в виде набора, которые содержат первую композицию, содержащую модифицированный полипептид u-PA, включая, как во всех вариантах осуществления, слитые белки, в частности, в активированной форме, или их множество, и вторую композицию, содержащую второй агент или агенты для лечения комплемент-опосредованного заболевания или расстройства. Второй агент или агенты, например, могут представлять собой противовоспалительный агент (ы) или антикоагулянт (антикоагулянты). Примеры таких агентов представляют собой противовоспалительное средство (ы), выбранное из любого одного или более нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), антиметаболита, кортикостероида, анальгезирующего, цитотоксического агента, провоспалительного ингибитора цитокина, противовоспалительных цитокинов, нацеливающих агентов В-клеток, соединений, нацеленных на Т-антигены, блокаторы молекул адгезии, антагонисты хемокиновых рецепторов, ингибиторы киназ, лигандыPPAR-γ),

ингибиторы комплемента, гепарин, варфарин, акценокумарил, фениндиона, ЭДТА, цитрата, оксалата, аргатробана, лепирудина, бивалирудина и ксимелагатрана.

Представлены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют любые модифицированные полипептиды u-PA и слитые белки, представленные в настоящем документе. Также предусмотрены векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновой кислоты и кодирующие модифицированные полипептиды u-PA. Векторы включают прокариотические векторы и эукариотические векторы, включая векторы млекопитающих и насекомых, такие как бакуловирусный вектор, дрожжевые векторы, такие как Pichia и Saccharomyces, и вирусные векторы, такие как вирус простого герпеса, или вектор вируса осповакцины, вектор AAV, аденовирусный вектор или ретровирусный вектор. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы для получения модифицированных полипептидов и/или векторов u-PA, таких как аденовирусы и AV вирусы, в частности, с тропизмом для интересующей ткани, такой как печень или глаз, для генной терапии.

Предложены способы получения модифицированных полипептидов u-PA путем выращивания клетки, содержащей вектор или нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид u-PA или слитый белок в условиях, в которых экспрессируется вектор, и, возможно, выделения экспрессированного модифицированного полипептида u-PA.

Также предложены клетки и клеточные культуры, которые содержат молекулы нуклеиновой кислоты или векторы. Клетки могут представлять собой нечеловеческие клетки или культуры клеток человека, но не включают в себя любые зиготы или клетки, которые развиваются в человеческом теле. Клетки включают клетки млекопитающих и бактериальные клетки, включая, но не ограничиваясь ими, бактериальные клетки, такие как E. coli, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, мыши NS0, BHK, клетки насекомых, дрожжевые клетки и другие клетки, обычно используемые для рекомбинантной экспрессии полипептидов. Способы получения модифицированного полипептида u-PA включают

выращивание клеток в условиях, при которых кодируемый модифицированный полипептид u-PA экспрессируется и,возможно, изолирует или очищает модифицированный полипептид u-PA. Как правило, модифицированные полипептиды u-PA и их конъюгаты, такие как слитые белки, продуцируются в клетках, которые гликозилируют белки. Выделенные модифицированные u-PA полипептиды могут быть дополнительно модифицированы, например, с помощью ПЭГилирования.

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие модифицированные полипептиды u-PA и слитые белки и/или нуклеиновые кислоты и/или векторы. Предложены применение фармацевтических композиций, нуклеиновых кислот или модифицированных полипептидов u-PA для ингибирования активации комплемента, чтобы таким образом лечить заболевание или расстройство, опосредованное активацией комплемента, или в котором активация комплемента играет роль в этиологии или лежащего в основе этиологии заболевания или расстройства.В частности, предлагаются применение молекул и/или векторов нуклеиновой кислоты для генной терапии для лечения таких заболеваний, расстройств и состояний, опосредованных или включающих в себя активацию комплемента, где ингибирование активации комплемента вызывает лечение или облегчение заболевания или состояния. Также предложены способы лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента путем введения векторов или введения молекул нуклеиновой кислоты. В частности, заболевания, расстройства и условия являются такими, в которых происходит инактивация C3, чтобы таким образом ингибировать или уменьшать эффекты активации комплемента.

Заболевания, опосредованные комплементом, расстройства или состояния или заболевания, в которых активация комплемента играет роль в этиологии или лежит в основе этиологии, включают, но не ограничиваются ими, любое воспалительное расстройство, сепсис, ревматоидный артрит (RA), глазное или офтальмологическое заболевание, сердечно-сосудистые нарушения, мембранопролиферативный гломерулонефрит (MPGN), рассеянный склероз

(MS), миастению гравис (MG), астму, воспалительное заболевание кишечника, иммунное комплексное (IC)-опосредованное острое воспалительное повреждение ткани, болезнь Альцгеймера (AD), ишемически-реперфузионноеповреждение, атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), комплемент 3 гломерулопатии (C3G) и отторжение трансплантата органа.

Конкретные заболевания и расстройства включают глазные или офтальмологические расстройства, такие как дегенерация желтого пятна или диабетическая ретинопатия, или воспаление вследствие трансплантированного органа.Среди заболеваний, расстройств и состояний включены возрастная дегенерация желтого пятна (AMD) и отсроченная функции почек (DGF).

Представлены способы ингибирования активации комплемента. Способы осуществляют путем контактирования модифицированного полипептида u-PA с белком C3 комплемента, в результате чего белок C3 комплемента расщепляется, так что активация комплемента снижается или ингибируется. Контактирование может осуществляться invitro, но, как правило, происходит invivo, путем введения модифицированного полипептида u-PA субъекту, у которого желательна инактивация или уменьшение комплемента.Введение может быть системным, таким как парентерально, включая внутривенно или локально, например, путем контактирования пораженной ткани, такой как глаз. Введение в глаз включает введение капель путем связывания модифицированного полипептида u-PA с доменом трансдукции белка или интравитреальной инъекцией, интраретинальной или субретинальной инъекцией или другим таким способом. Для заболеваний и состояний, таких как DGF, введение может осуществляться путем внутривенного введения. Другие способы включают подкожное и трансдермальное введение.

Способы и применения включают лечение любого заболевания, расстройства или состояния, где ингибирование активации комплемента приводит к снижению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из воспалительного нарушения, нейродегенеративного расстройства,

офтальмологического нарушения и сердечно-сосудистого расстройства.Они включают, но не ограничиваются ими, воспалительные заболевания, состояния и расстройства, сепсис, ревматоидный артрит (RA), глазные расстройства, мембранно-пролиферативный гломерулонефрит (MPGN), рассеянный склероз (MS), миастению гравис (MG), астму, воспалительное заболевание кишечника, иммунное комплексное (IC)-опосредованное острое воспалительное повреждение тканей, атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), комплемент 3 гломерулопатии (C3G), болезнь Альцгеймера (AD), опиоидные расстройства, таких как AMD и диабетические ретинопатии, и ишемически-реперфузионное повреждение.

Ишемически-реперфузионное повреждение может включать или быть вызвано событием или обработкой, выбранным из инфаркта миокарда (MI), инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарных артерий, искусственного кровообращения (CPB) и гемодиализа или лечения субъекта. Обработку модифицированным полипептидом u-PA осуществляют до лечения субъекта. Способы лечения включают трансплантацию органов. Заболевание, нарушение или состояние включают офтальмологические состояния или представляет собой глазное заболевание или отторжение или воспаление вследствие трансплантированного органа, такого как диабетическая ретинопатия или макулярная дегенерация. В частности, предоставлены способы лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD), а также способы лечения отсроченной функции почечного трансплантата (DGF).Лечение можно осуществлять внутривенно или подкожно или локально, например, путем инъекции модифицированного полипептида u-PA в глаз.

Включено интравитреальное или интраретинальное, субретинальное, инъекционное введение или связывание модифицированного полипептида u-PA с доменом трансдукции белка для облегчения трансдукции в стекловидное тело. Модифицированный полипептид u-PA может быть связан или конъюгирован с фрагментами, которые влияют на нацеливание полипептида на конкретный орган или ткань, или которые увеличивает полупериод жизни в сыворотке или

снижают иммуногенность, например путемПЭГилирования и/или связывания с Fc-доменом или с антителом или его антигенсвязывающей частью.

Следовательно, предложены способы лечения субъекта с опосредованным комплементом расстройством или состоянием или такого, где активация комплемента играет роль в таком нарушении или состоянии, путем введения модифицированного полипептида u-PA, предусмотренного в данном документе. Такие применения модифицированных полипептидов u-PA и слитых белков, предусмотренных в настоящем документе, также представлены.

Модифицированные полипептиды u-PA и обработка с помощью слитого белка или могут быть использованы для такого лечения, поскольку они расщепляют белок C3 комплемента, чтобы, таким образом, ингибировать или уменьшать активацию комплемента. Ингибирование активации комплемента приводит к снижению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом расстройством, заболеванием или состоянием, которое включает воспалительный ответ, приводящий к снижению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием, состояния или расстройства, выбранного из воспалительного нарушения, нейродегенеративного расстройства и сердечно-сосудистого расстройства. Они включают офтальмологические состояния, такие как диабетическая ретинопатия и дегенерация желтого пятна, а также отсроченное отторжение органов, такое как DGF.

Дозировки для применения и способов и одноразовых лекарственных форм приведены в настоящем документе. Доза может быть эмпирически определена специалистом в данной области и включает, например, одиночные дозы, которые находятся в диапазоне от 0,1 мг до 1 мг для местного введения, и от 0,1 мг до 10,15,20, 30 мг или более для системного, такого как внутривенное введение.Конкретная доза зависит от конкретного расстройства или заболевания или состояния, подвергаемого лечению, стадии заболевания, расстройства или состояния, пути введения, режима и других таких параметров.

Дозы можно повторять ежедневно, каждые два, три, четыре, пять, шесть или семь дней, по меньшей мере два раза в неделю, по меньшей мере каждые две недели, три недели, четыре недели или более длинные интервалы. Конкретный режим и дозировка зависят, например, от подвергаемого лечению расстройства, режима введения и, в частности, веса, такого как вес субъекта. Их определение находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

Также предложены способы, применения и комбинации и модифицированные полипептиды u-PA и слитые белки, где модифицированный полипептид u-PA содержит модификацию V41R или V41L, в частности V41R, такую как V41I или R и V38E, и те, которые содержат H37Y/V38E. Примерами такого модифицированного полипептида u-PA являются модифицированные полипептиды u-PA, которые содержат модификации Y40Q/V41R/L97bA или Y40Q/V41L/L97BA или R37aS/V41R/L97ГК/H99Q, или R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R. Модификации находятся в любом немодифицированном полипептиде u-PA, включая те, которые изложены в любой из SEQIDNO: 1-6 и их каталитически активных частей, которые включают остаток, соответствующий V41.

Примерами таких модифицированных полипептидов u-PA являются модифицированные полипептиды u-PA, которые содержат последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 21 или 987, или в любой из SEQIDNo 40-44 или 40-44 без модификации в C122, путем нумерации химотрипсина, и их каталитически активных частей и их модифицированных форм, таких как ПЭГилированные формы, и слитые белки и их модифицированные формы.

Также предложены способы лечения расстройств, таких как DGF, в которых внутривенно вводят модифицированный полипептид u-PA или слитый белок (в активированной форме), как описано и представлено здесь, включая модифицированные полипептиды u-PA, которые содержат последовательность аминокислотных остатков, представленных в любой из SEQIDNO: 21 и 40-44, и их модифицированные формы, такие как ПЭГилированные формы.

Доза может быть эмпирически определена специалистом в данной области и включает в себя одиночные дозировки, которые находятся в диапазоне от 0,1 мг до 1 мг. Дозировка зависит от субъекта, тяжести или стадии заболевания или расстройства, такого как DGF. Лечение может повторяться несколько раз, например, два, три или четыре раза в день, один раз в день, повторяться каждые 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, двухмесячно или ежемесячно. Модифицированный полипептид u-PA может быть такам, который содержит замены/инсерции, посредством нумерации химотрипсина, R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; и посредством зрелой нумерации R20Q/H22Y/R23E/V27E/T28Y/V30R/D50P/Y51Q/T91I/L92A/H94Q/C121S/Y148R.

Примером является модифицированный полипептид u-PA, который содержит домен протеазы, представленный в SEQIDNO: 21, или его каталитически активную часть, или его полноразмерные или формы предшественника, которые содержат домен протеазы, и их модифицированные формы, такие как ПЭГилированные формы и слитые белки.Введение может осуществляться любым подходящим способом, включая внутривенное, подкожное, трансдермальное, местное, внутримышечное, пероральное и другое системное введение. Обычно введенная форма модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, представляет собой активированную форму, которая обычно в зависимости от компонентов белка (см. например, пример 15) представляет собой двухцепочечную форму.

Способы, описанные в настоящем документе, как описано выше и ниже, включают способы лечения офтальмологического нарушения или глазного расстройства посредством введения любого из модифицированных полипептидов u-PA и их модифицированных форм, таких как ПЭГилированные формы и слитые белки, такие как те, которые содержат домен трансдукции белка, предусмотренный здесь для глаза. Офтальмологические расстройства, заболевания или состояния, включающие активацию комплемента, включают диабетические ретинопатии и дегенерацию желтого пятна, такие как AMD.

Дозировка, как описано выше, и включает единичные дозы от 0,1 мг до 1 мг. Модифицированные полипептиды u-PA включают те, которые содержат замены R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149Rили R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R, Y40Q/V41L/L97bA/C122S or Y40Q/V41R/L97bA/C122S or Y40Q/V41L/L97bA or Y40Q/V41R/L97bA,

и те, которые содержат последовательность аминокислотных остатков, установленных в любом из SEQIDNO: 21 и 40-44 и их каталитически активные части, а также их модифицированные формы. Лечение можно повторять множество раз, например один раз в день. Используют модифицированные полипептиды u-PA и их модифицированные формы для лечения AMD или DGF. Модифицированные полипептиды u-PA включают любые описанные здесь полипептиды, включая те, которые содержат замены R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149Rили R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149RилиY40Q/V41L/L97bA/C122SилиY40Q/V41R/L97bA/C122SилиY40Q/V41L/L97bAилиY40Q/V41R/L97bA, и их модифицированные формы, которые являются ПЭГилированными или которые являются слитыми белками, как описано в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фиг.1 показан обзор классического, лектинового и альтернативных путей комплемента и активации терминального комплекса комплемента, комплекса мембранной атаки (MAC). Фигура изображает многие из более чем 30 белков, которые участвуют в каскаде комплемента, их действие в каскаде и там, где применимо, их точки схождения среди путей комплемента.Например, три пути сходятся после генерации C3-конвертазы, которая расщепляет C3 с образованием C5-конвертазы, давая в результате образование MAC-комплекса.

Фигура также изображает генерацию многих продуктов расщепления комплемента.

Фиг. 2A -2 B дает схематическое изображение N-терминальных слитых белков u-PA. 2A дает схему N-концевых слитых белков u-PA, которые содержат партнер слияния (те Fc) N-концевой части в каталитический домен u-PA. Примерный N-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1004, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), Fc (партнер слияния), AGS (линкер), последовательность активации u-PA и модифицированный каталитический домен u-PA. Фиг 2 B дает схему N-концевого белка дикого типа, который не содержит партнера по слиянию. Примерный N-концевой белок дикого типа представлен в SEQIDNO: 1005, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), N-конец u-PA, последовательность активации u-PA и модифицированный каталитический домен u-PA.

Фиг. 3A -3 C дают схематическое изображение C-концевых белков слияния u-PA. ФИГ.3A представляет собой схематическое изображение слитых с C-конца белков u-PA, которые содержат партнерский C-концевой участок слияния с u-PA каталитическим доменом, где слитый белок не имеет N-концевой последовательности активации для каталитического домена u-PA. Примерный C-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1006, который содержит последовательность сигналов IL2 человека (hIL2SP), модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и Fc (партнер слияния).

Другой примерный C-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1007, которая содержит последовательность сигналов IL2 человека (hIL2SP), модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и HSA (человеческий сывороточный альбумин в качестве партнерского партнера). Другой примерный C-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1008, который содержит последовательность сигналов IL2 человека (hIL2SP), модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и scFv, который связывает коллаген II (Cd2scFv) (партнер слияния).Другой примерный C-концевой слитый белок

представлен в SEQIDNO: 1009, которая содержит последовательность сигналов IL2 человека (hIL2SP), модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и HABD (домен связывания гиалуроновой кислоты (партнер слияния).

Другой примерный С-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1012, которая содержит последовательность сигналов IL2 человека (hIL2SP), каталитический домен u-PA дикого типа, линкер и Fc (партнер слияния).Другой примерный С-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1013, который содержит последовательность сигналов IL2 человека (hIL2SP), каталитический домен u-PA дикого типа, линкер и HSA (партнер слияния).Фиг. 3B показывает схему С-концевых слитых белков u-PA, которые содержат партнер слияния (те Fc или HSA) С-терминал в каталитический домен u-PA. Примерный С-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1010, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), сайт активации фурана, модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и Fc (партнер слияния).

Другой примерный С-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1016, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), последовательность активации фурана, модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и HSA (партнер слияния). Фиг 3 С представляет собой схематическое изображение слитых белков u-PA, которые содержат партнер слияния (те Fc или HSA) С-терминал в каталитический домен u-PA и партнер слияния (те N-конец дикого типа из u-PA) N-терминала в каталитический домен u-PA.

Примерный слитый белок представлен в SEQIDNO: 1011, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), u-PAN-концевой домен, модифицированный u-PA каталитический домен, линкер и Fc (партнер слияния).Другой примерный С-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1014, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), N-концевую область u-PA, сайт активации фурана, модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и HSA (партнер слияния).

Другой примерный С-концевой слитый белок представлен в SEQIDNO: 1015, которая содержит сигнальную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), N-концевую область u-PA, последовательность активации u-PA, модифицированный каталитический домен u-PA, линкер и HSA (партнер слияния).

Фиг. 4A -4 H показывают схематическое изображение активированных форм слитых белков, где SPD относится к домену сериновой протеазы (модифицированному домену u-PA), представленному в настоящем документе; u-PAN-конец относится в целом к остаткам 1-178 u-PA или их любым модифицированным формам. Фиг 4A показывает схему слитого белка SEQIDNO: 1010, которая содержит домен Fc на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и последовательность активации фурана, где дисульфидная связь между Fc-доменами образует димер. На Фиг. 4B показана схема слитого белка SEQIDNO: 1011, которая содержит Fc-домен на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 987), и N-конец u-PA и последовательность активации u-PA на N-конце белка, где есть дисульфидная связь между Fc-доменами с образованием димера.

На Фиг. 4C показана схема слитого белка, представленного в SEQIDNO: 1036, которая содержит Fc-домен на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 987), и N-конец u-PA и последовательность активации фурана на N-конце слитого белка, где дисульфидная связь между Fc-доменами образует димер.

Фиг 4 D является принципиальной схемой слитого белка, представленной в SEQIDNO: 1014, которая содержит HSA на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 987), и N-конец u-PA и последовательность активации фурана на N-конце слитого белка.

Фиг 4 E показывает схему слитого белка, представленного в SEQIDNO: 1015, которая содержит HSA на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 987), и N-конец u-PA и последовательность активации u-PA на N-конце слитого белка.

Фиг. 4F показывает схему слитого белка, представленного в SEQIDNO: 1016, которая содержит HSA на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и N-концевую последовательности активации фурана в домен протеазы.

Фиг 4 F является принципиальной схемой слитого белка, представленной в SEQIDNO: 1017, которая содержит HSA на С-конце домена протеазы u-PA(SEQIDNO: 21) и N-концевую последовательность активации SUMO для домена протеазы.

Фиг. 4H показывает схему слитого белка,представленного в SEQIDNO: 1018, которая содержит Fc-домен на С-конце домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и N-конец u-PA и N-концевую последовательность активации SUMO в протеазную область где дисульфидная связь между Fc-доменами образует димер.

ПОДРОБНОЕОПИСАНИЕ

A. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относятся изобретение . Все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности, веб-сайты и другие опубликованные материалы, называемые в настоящем документе по всему описанию, если не указано иное, включены в настоящий документ посредством ссылки.В случае, когда имеется множество определений для терминов в данном документе, указанные в этой секции преобладают. Если ссылка делается на URL или другой такой идентификатор или адрес, понятно, что такие идентификаторы могут изменяться, и конкретная информация в сети Интернет может поступать и проходить, но эквивалентная информация известна и может быть легко доступна, например, посредством поиска Интернет и/или соответствующих баз данных.Ссылка на нее свидетельствует о доступности такой информации.

Как используется в настоящем документе, расщепление относится к разрушению пептидных связей протеазой. Места сайта расщепления протеазой включают остатки N-и С-конца к соединению (непримированную и

примированную стороны, соответственно, с сайтом расщепления протеазой, определенной как P3-P2-P1-P1'- P2'- P3', и расщепление происходит между остатками P1 и P1). У человека расщепление C3-конвертазой происходит между остатками R и S (см. остатки 746-751 SEQIDNO: 47, расщепление между остатками 748 и 749 у человека C3) C3:

P3 P2 P1 P1' P2' P3'

Leu Ala Arg↓ SerAsn Leu

Как правило, расщепление субстрата биохимическим путем представляет собой активирующее расщепление или ингибирующее расщепление. Активирующее расщепление относится к расщеплению полипептида из неактивной формы в активную форму. Это включает, например, расщепление зимогена до активного фермента. Активирующее расщепление также представляет собой расщепление, в результате чего белок расщепляется на один или более белков, которые сами обладают активностью.Например, система комплемента является необратимым каскадом событий протеолитического расщепления, окончание которого приводит к образованию множества эффекторных молекул, которые стимулируют воспаление, облегчают фагоцитоз антигена и лизируют некоторые клетки непосредственно. Таким образом, расщепление C3 конвертазой C3 в C3a и C3в представляет собой активирующее расщепление. Напротив, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, оказывают ингибирующее расщепление C3, такое как расщепление в активном сайте.

Как используется в настоящем документе, ингибирующее расщепление или расщепление инактивации представляет собой расщепление белка на один или более продуктов деградации, которые не являются функциональными. Ингибирующее расщепление приводит к уменьшению или снижению активности белка.

Как правило, снижение активности белка уменьшает путь или процесс, в который вовлечен белок. В одном из примеров расщепление любого одного или более белков комплемента, которое представляет собой ингибирующее

расщепление, приводит к сопутствующему уменьшению активности или ингибированию любого классического, лектинового или альтернативных функциональных путей комплемента. При ингибировании, расщепление снижает активность по меньшей мере на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более по сравнению с нативной формой белка.Процент расщепления белка, который требуется для ингибирования, изменяется среди белков, но может быть определен путем анализа активности белка.

Используемый в настоящем документе термин "активация комплемента" относится к активации путей комплемента, например, активация комплемента относится к увеличению функций или активности любого одного или более путей комплемента посредством протеазы или увеличения активности любого из белков в пути комплемента.

Активация комплемента может приводить к опосредованному комплементом клеточному лизису или может приводить к клеточному или тканевому разрушению. Несоответствующая активация комплемента на ткани-хозяине играет важную роль в патологии многих аутоиммунных и воспалительных заболеваний, а также ответственна за или связана с многими болезненными состояниями, связанными с биосовместимостью. Понятно, что активация может означать увеличение существующей активности, а также индукцию новой активности. Активация комплемента может происходить invitro или invivo. Примерные функции комплемента, которые могут быть проанализированы и которые описаны в данном документе, включают гемолитические анализы и анализы для измерения любой одной или более из молекул эффекторов, таких как SDSPAGE, с последующим вестерн-блоттингом или окрашиванемCoomassieBrilliantBlue или с помощью ELISA.В некоторых вариантах осуществления активация комплемента ингибируется протеазой, такой как протеаза, описанная в данном документе, на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% или более по сравнению с активностью комплемента в отсутствие протеазы.

Используемый в настоящем документе термин "ингибирующая активация комплемента" или "инактивация комплемента" относится к уменьшению или снижению опосредованной комплементом функции или активности любого одного или нескольких путей комплемента с помощью протеазы или активности любого из белков в пути. Функция или активность комплемента может происходить invitro или invivo.Примерные функции комплемента, которые могут быть проанализированы и которые описаны в данном документе, включают гемолитические анализы и анализы для измерения любой одной или более из молекул эффекторов, таких как SDSPAGE, за которым следует вестерн-блоттинг или окрашивание CoomassieBrilliantBlueили с помощью ELISA. Протеаза может ингибировать активацию комплемента на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более. В других вариантах осуществления активация комплемента ингибируется протеазой на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% или более по сравнению с активностью комплемента в отсутствие протеазы.

Используемый здесь термин "белок комплемента" или "компонент комплемента" представляет собой белок системы комплемента, который функционирует в защите хозяина от инфекций и в воспалительном процессе. Белки комплемента включают те, которые функционируют в классическом пути, те, которые функционируют в альтернативном пути, и те, которые функционируют в лектиновом пути. Среди белков комплемента имеются протеазы, которые участвуют в путях комплемента.

Как используется в настоящем документе, белки комплемента включают любые продукты расщепления (также называемые "фрагментами"), которые образуются при активации каскада комплемента. Кроме того, среди белков комплемента имнются неактивные или измененные формы белков комплемента, такие как iC3b и C3a-desArg.Таким образом, белки комплемента включают, но не ограничиваются ими: C1q, C1r, C1s, C2, C3, C3a, C3b, C3c, C3dg, C3g, C3d, C3f, iC3, C3a-desArg, C4, C4a, C4b, iC4, C4a-desArg, C5, C5a, C5a-des-Arg, C6, C7, C8, C9, MASP-1, MASP-2, MBL, FactorB, FactorD, FactorH, FactorI, CR1, CR2, CR3, CR4, пропердин, C1Inh, C4bp, MCP, DAF, CD59 (MIRL),кластерин и

HRF и разновидности аллельных и видовых вариантов любого белка комплемента.

Как используется в настоящем документе, "нативная" форма белка комплемента является такой, которая может быть выделена из организма, такого как позвоночник в отсутствие активации комплемента, и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории. Примеры нативных белков комплемента включают C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4, фактор B, фактор D, пропердин, C5, C6, C7, C6 и C9.

Как правило, "нативные белки комплемента" являются неактивными и приобретают активность при активации. Активация может потребовать активационного расщепления , расщепления созревания и/или образования комплекса с другими белками. Исключением являются фактор I и фактор D, которые имеют ферментативную активность в своей нативной форме. В некоторых примерах активация нативного белка комплемента происходит после расщепления белка.Например, зимогены комплемента, такие как C3, представляют собой протеазы, которые сами активируются расщеплением протеазой таким образом, что расщепление C3 конвертазойC4b2b генерирует активные фрагменты C3a и C3b. В другом примере расщепление неактивного нативного белка комплемента приводит к изменениям структурной стабильности белка, что приводит к активации белка.

Например, C3 содержит внутреннюю тиоэфирную связь, которая в нативном белке стабильна, но может стать высокореакционноспособной и активирована после конформационных изменений, которые приводят к расщеплению белка. Таким образом, продукты расщепления C3 являются биологически активными. Активация C3 также может происходить самопроизвольно в отсутствие расщепления. Это спонтанное превращение тиоэфирной связи в нативномC3, которое является инициирующим событием альтернативного пути комплемента.В другом примере активация нативного белка комплемента происходит после высвобождения образовавшейся в комплексе регуляторной молекулы, которая ингибирует активность иным

образом активного нативного белка комплемента. Например, C1inh связывается с и инактивирует C1s и C1r, если они находятся в комплексе с C1q.

Используемый здесь термин "расщепление на созревание" представляет собой общий термин, который относится к любому расщеплению, необходимому для активации зимогена. Он включает расщепление, которое приводит к конформационному изменению, приводящему к активности (те активационному расщеплению). Он также включает в себя расщепление, в котором перемещается критический сайт связывания или возникает стерическое затруднение или ингибирующий сегмент удаляется или перемещается.

Используемый в настоящем документе термин "измененная форма" белка комплемента относится к белку комплемента, который присутствует в ненативной форме, обусловленной модификациями в своей молекулярной структуре. Например, C3-реакция тиоэфира с водой может происходить в отсутствие расщепления конвертазы, давая гидролизованную неактивную форму C3, названную iC3. В другом примере анафилаксины, включающие C3a, C5a и C4a, могут быть дезинтегрированы карбоксипептидазойN в более стабильные, менее активные формы.

Используемый в настоящем документе термин "фрагмент" или "продукт расщепления" белка комплемента представляет собой область или сегмент белка комплемента, который содержит часть полипептидной последовательности нативного белка комплемента. Фрагмент белка комплемента обычно приводит к активации каскада комплемента. Как правило, фрагмент приводит к протеолитическому расщеплению нативного белка комплемента. Например, белок C3 комплемента ферментативно расщепляется C3 конвертазой, что приводит к двум фрагментам: C3a, который составляет N-концевую часть C3; и C3b, который представляет собой C-концевую часть и содержит сайт сериновойпротеазы.

Фрагмент белка комплемента также приводит к протеолитическому расщеплению другого фрагмента белка комплемента. Например, C3b фрагмент, генерируемый расщеплением C3, расщепляется с помощью фактора I для генерирования фрагментов iC3b и C3f. Как правило, продукты расщепления белков комплемента являются биологически активными продуктами и функционируют как молекулы эффекторов распада системы комплемента. Следовательно, фрагмент или часть белка комплемента включает продукты расщепления белков комплемента, а также части белков, которые сохраняют или проявляют по меньшей мере одну активность белка комплемента.

Используемый в настоящем документе термин "эффекторные молекулы расщепления" или "эффекторные белки расщепления" относится к активным продуктам расщепления, генерируемым в результате действия каскада с активируемым ферментом системы комплемента. Молекула концевого эффектора, фрагмент или продукт расщепления, полученный в результате активации комплемента, может вносить вклад в любую из одной или нескольких опосредованных комплементом функций или активностей, которые включают опсонизацию, анафилаксию, лизис клеток и воспаление. Примеры молекул расщепления или эффекторов включают, но не ограничиваются ими, C3a, C3b, C4a, C4b, C5a, C5b -9 и Bb. Молекулы эффекторов расщепления системы комплемента, благодаря участию в каскаде, проявляют активности, которые включают стимулирующее воспаление, облегчая фагоцитоз антигена и лизирование некоторых клетки непосредственно. Продукты расщепления комплемента способствуют или участвуют в активации путей комплемента.

Как используется в настоящем документе, "анафилаксины" представляют собой белки эффекторов расщепления, которые вызывают дегрануляцию или высвобождение веществ из тучных клеток или базофилов, которые участвуют в воспалительном ответе, в частности в качестве части защиты от паразитов. Если дегрануляция является слишком сильной, она может вызывать аллергические реакции. Анафилаксины включают, например, C3a, C4a и C5a. Анафилаксины также косвенно опосредуют спазмы гладкомышечных клеток (таких как бронхоспазмы), повышают проницаемость капилляров крови и хемотаксис.

Используемый здесь термин "хемотаксис" относится к опосредованному рецепторами перемещению лейкоцитов в направлении хемоаттрактанта, как правило, в направлении увеличения его концентрации, например, в направлении увеличения концентрации анафилатоксина.

Используемый здесь термин "опсонизация" относится к изменению поверхности патогена или другой частицы, так что она может быть проглажена фагоцитами. Белок, который связывается или изменяет поверхность патогена, называют опсоном. Антитела и белки дополняют внеклеточные бактерии для поглощения и разрушения фагоцитами, такими как нейтрофилы и макрофаги.

Используемый здесь термин "лизис клеток" относится к разрушению клетки путем разрушения ее стенки или мембраны. Гемолиз красных кровяных клеток является мерой клеточного лизиса.

Используемый в настоящем документе термин "белок комплимента С3" или "С3" относится к белку С3 комплемента системы комплемента, которая функционирует в организме хозяина против инфекций и в воспалительном процессе. Белок С3 комплемента человека представляет собой одноцепочечный с 1663 амнокислотами предшественник белка или зимоген, представленный в SEQIDNO: 47, который содержит 22 аминокислотный сигнальный пептид (аминокислоты 1-22 SEQIDNO: 47) и последовательность тетра-аргинина (аминокислоты 678-671 из SEQIDNO: 47), который удаляется фураноподобным ферментом, в результате чего образуется зрелый двухцепочечный белок, содержащий бета-цепь (аминокислоты 23-667 SEQIDNO: 47) и альфа-цепь (аминокислоты 672-1663 SEQIDNO: 47), связанные дисульфидной связью между остатками С559 и С816.

Белок комплемента С3 дополнительно активируется протеолитическим расщеплением С3 конвертазой (С4b2b или С3bBb) между аминокислотами 748 и 749 SEQIDNO: 47, с генерацией анафилатоксина С3а и опсонина С3b.

Используемый в настоящем документе термин "зимоген" относится к белку, который активируется протеолитическим расщеплением, включая

расщепление созревания, такое как расщепление активации, и/или комплексообразование с другим белком (ами) и/или кофактором (ами). Зимоген представляет собой неактивный предшественник белка. Такие предшественники, как правило, больше, хотя и не обязательно больше, чем активная форма. Со ссылкой на u-PA или белок C3 комплемента, зимогены превращаются в активные ферменты посредством специфического расщепления, включая каталитическое и автокаталитическое расщепление, или путем связывания активирующего кофактора, который генерирует активный фермент. Таким образом, зимоген представляет собой ферментативно неактивный белок, который преобразуется в протеолитический фермент действием активатора. Расщепление может быть осуществлено автокаталитически. Ряд белков комплемента представляют собой зимогены; они являются неактивными, но становятся расщепленными и активируются при инициировании системы комплемента после инфицирования. Зимогены, как правило, неактивны и могут быть превращены в зрелые активные полипептиды путем каталитического или автокаталитического расщепления прообласти из зимогена.

Используемый в настоящем документе термин "прообласть", " пропептид" или "про-последовательность" относится к области или сегменту белка, который расщепляется с получением зрелого белка. Он может включать в себя сегменты, которые функционируют для подавления ферментативной активности путем маскировки каталитиза и, таким образом, предотвращения образования каталитического промежуточного соединения (т.е. посредством стерического перекрывания сайта связывания субстрата).Прообласть представляет собой последовательность аминокислот, расположенных на аминоконце зрелого биологически активного полипептида, и может составлять всего несколько аминокислот или может представлять собой многодоменную структуру.

Используемый в настоящем документе термин "последовательность активации" относится к последовательности аминокислот в зимогене, которая представляет собой сайт, необходимый для расщепления активации или

расщепления созревания с образованием активной протеазы. Расщепление активационной последовательности может быть катализировано автокаталитически или путем активации партнерами. Расщепление активации представляет собой тип расщепления созревания, в котором происходит конформационное изменение, необходимое для активности.

Это классический путь активации, например, для сериновых протеаз, в которых расщепление генерирует новый N-конец, который взаимодействует с консервативными областями каталитических механизмов, таких как каталитические остатки, для индуцирования конформационных изменений, необходимых для активности. Активация может привести к получению многоцепочечных форм протеаз. В некоторых случаях одноцепочечные формы протеазы могут проявлять протеолитическую активность.

Используемый здесь термин "домен" относится к части молекулы, такой как белки или кодирующие нуклеиновые кислоты, которая структурно и/или функционально отличается от других частей молекулы и является идентифицируемой. Примерный полипептидный домен представляет собой часть полипептида, которая может образовывать независимо сложенную структуру внутри полипептида, состоящего из одной или более структурных звеньев (например, комбинации альфа-спиралей и/или бета-цепей, соединенных петлевыми областями) и/или которые распознаются конкретной функциональной активностью, такой как ферментативная активность, димеризация или связывание субстрата. Полипептид может иметь один или более, обычно более одного, отдельных доменов. Например, полипептид может иметь один или более структурных доменов и один или более функциональных доменов. Единственный полипептидный домен может определяться структурой и функцией.Домен может охватывать непрерывную линейную последовательность аминокислот. Альтернативно, домен может охватывать множество несмежных аминокислотных участков, которые не являются смежными по линейной последовательности аминокислот полипептида. Обычно полипептид содержит множество доменов. Например, сериновые протеазы могут быть охарактеризованы на основе последовательности домена

(ов) протеазы.Специалисты в данной области техники знакомы с полипептидными доменами и могут идентифицировать их за счет структурной и/или функциональной гомологии с другими такими доменами. Для примера в данном документе предоставлены определения, но ясно, что специалистам в данной области техники должно быть понятно, что конкретные домены распознаются по названию. При необходимости можно использовать соответствующее программное обеспечение для идентификации доменов.

Используемый в настоящем документе термин "структурная область" полипептида представляет собой область полипептида, которая содержит по меньшей мере один структурный домен.

Используемый в настоящем документе термин "домен протеаз" представляет собой каталитически активную часть протеазы. Ссылка на домен протеаз включает одну, две-и многоцепочечные формы любого из этих белков. Домен протеаз белка содержит все необходимые свойства этого белка, необходимые для его протеолитической активности, такие как, например, его каталитический центр.

Используемый в настоящем документе термин "каталитически активный участок" или "каталитически активный домен" протеазы, например полипептид u-PA, относится к протеазному домену или любому фрагменту или его части, который сохраняет протеазную активность. Например, каталитически активная часть полипептида u-PA может представлять собой домен протеазы u-PA, включающий выделенную одноцепочечную форму протеазного домена или активированную двухцепочечную форму.Существенно,что, по меньшей мере, invitro, одноцепочечные формы протеаз и каталитические домены или их протеолитически активные участки (обычно С-концевые усечения) проявляют протеазную активность.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеиновая кислота, кодирующая протеазную область или каталитически активную часть протеазы», относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей только указанный одноцепочечный протеазный домен или его активную часть, а не к другим смежным частям протеазы в виде непрерывной последовательности.

Как используется в настоящем документе, указание, что полипептид состоит по существу из домена протеазы, означает, что единственная часть полипептида представляет собой протеазную область или ее каталитически активную часть. Полипептид может и, как правило, включает дополнительные не относящиеся к протеазе последовательности аминокислот.

Используемый здесь термин "активный сайт протеазы" относится к сайту связывания субстрата, где происходит катализ субстрата. Структура и химические свойства активного участка обеспечивают возможность распознавания и связывания субстрата и последующего гидролиза и расщепления связи в субстрате.Активный сайт протеазы содержит аминокислоты, которые вносят вклад в каталитический механизм расщепления пептида, такого как аминокислоты GlnHisAlaArgAlaSerHisLeu (активный участок С3; остатки 737-744 SEQIDNO: 47), а также аминокислоты, которые вносят вклад в распознавание последовательности субстрата, такие как аминокислоты, которые вносят вклад в специфичность связывания с субстратом. Например, расщепление в активном участке С3 может ингибировать его активность, такую как:

Q H A R↓A S H L (остатки 737-744 SEQ ID NO:47)

P4 P3 P2 P1 ↓P1' P2' P3' P4'.

Используемый в настоящем документе термин "сайт узнавания субстрата" или "последовательность расщепления" относится к последовательности, распознаваемой активным участком протеазы, который расщепляется протеазой. Как правило, последовательность расщепления сериновой протеазы представляет собой шесть остатков по длине, чтобы соответствовать расширенной субстратной специфичности многих протеаз, но может быть длиннее или короче в зависимости от протеазы.

Как правило, например, для сериновой протеазы, последовательность расщепления состоит из аминокислот P1-P4 и P1'- P4'в субстрате, где расщепление происходит после P1-положения. Как правило, последовательность расщепления сериновой протеазы представляет собой шесть остатков по длине, чтобы соответствовать расширенной субстратной специфичности многих протеаз, но может быть длиннее или короче в зависимости от протеазы.

Используемый в настоящем документе термин "целевой субстрат" относится к субстрату, который расщепляется протеазой. Как правило, целевой субстрат специфически расщепляется на месте его распознавания протеазой. Минимально, целевой субстрат включает аминокислоты, которые составляют последовательность расщепления. Целевой субстрат может включать пептид, содержащий последовательность расщепления и любые другие аминокислоты. Полноразмерный белок, аллельный вариант, изоформа или любая их часть, содержащие последовательность расщепления, распознаваемую протеазой, является целевым субстратом для этой протеазы. Например, для целей, в которых предполагается инактивация комплемента, целевой субстрат представляет собой белок C3 комплемента, или любой его фрагмент или фрагмент, содержащий последовательность расщепления, распознаваемую полипептидом u-PA.Такие целевые субстраты могут быть очищенными белками или могут присутствовать в смеси, такой как смесь invitro или смесь invivo. Смеси могут включать, например, кровь или сыворотку или другие тканевые жидкости.Кроме того, целевой субстрат включает пептид или белок, содержащий дополнительный фрагмент, который не влияет на расщепление субстрата протеазой. Например, целевой субстрат может включать в себя четыре аминокислотных пептида или полноразмерный белок, химически связанный с флуорогенным фрагментом. Протеазы могут быть модифицированы таким образом, чтобы проявлять большую специфичность целевого субстрата.

Используемый в настоящем документе термин "полипептид u-PA" или "uPA" или "u-PA" относится к любому полипептиду u-PA, включающему, но не

ограничиваясь этим, рекомбинантно продуцируемый полипептид, синтетически полученный полипептид и полипептид u-PA, экстрагированный или выделенный из клеток или тканей, включая, но не ограничиваясь ими, печень и кровь.Альтернативные названия, которые используются взаимозаменяемо для u-PA, включают урокиназу и урокиназный активатор плазминогена и активатор плазминогенаурокиназного типа.u-PA включает в себя родственные полипептиды из различных видов, включая, но не ограничиваясь ими, животные человеческого и нечеловеческого происхождения. Человеческий u-PA включает u-PA, аллельные варианты, изоформы, синтетические молекулы из нуклеиновых кислот, белок, выделенный из ткани человека и клеток, и их модифицированные формы.

Примеры немодифицированных полипептидов u-PA человека включают, но не ограничиваются ими, немодифицированные и нативные зрелые полипептиды u-PA дикого типа (SEQIDNO: 3), немодифицированный и предшественник u-PA дикого типа, который включает в себя пропептид и/или сигнальные пептиды (такие как полипептид u-PA, представленный в SEQIDNO: 1) и домен протеазы (такой как домен протеазы u-PA, представленный в SEQIDNO: 2). Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что указанные положения зрелого полипептида u-PA (SEQIDNO: 3) отличаются на 20 аминокислотных остатков по сравнению с предшественником u-PA полипептида (SEQIDNO: 1), который представляет собой полипептид u-PA, содержащий сигнальную пептидную последовательность. Таким образом, первый аминокислотный остаток SEQIDNO: 3' соответствует двадцать первому (21) аминокислотному остаток SEQIDNO: 1

"u-PA" охватывает активированную или двухцепочечную форму полипептида u-PA, содержащего N-концевую цепь (аминокислоты 1-158 SEQIDNO: 3) и C-концевую B цепь (аминокислоты 159-411 SEQIDNO: 3), связанные дисульфидной связью между остатками 148C и 279C (соответствующими зрелым полипептидам u-PA, представленным в SEQIDNO: 3). Двухцепочечная форма или высокомолекулярная (HMW) u-PA образуется из зрелого u-PA полипептида (например, представлено в SEQIDNO: 3) протеолитическим расщеплением после аминокислотного остатка Lys158 до

остатка Ile159.Протеолитическое расщепление может быть осуществлено, например, с помощью плазмина, калликреина, катепсина B, матриптазы и фактора роста нервов-гамма. Полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть дополнительно модифицированы, например, посредством химической модификации или посттрансляционноймодификации. Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, гликозилирование, пегилирование, альболюминирование, фарнисилирование, карбоксилирование, гидроксилирование, фосфорилирование и другие модификации полипептидов, известные в данной области техники.

u-PA включает в себя u-PA из любого вида, включая человека и нечеловеческие виды. Полипептиды u-PA нечеловеческого происхождения включают, но не ограничиваются ими, мышиные, собачьи, липорин, птичьи, бычий, овечий, свиной и другие полипептиды u-PA приматов.

Примеры полипептидов u-PA нечеловеческого происхождения включают, например,такие как мышь (Musmusculus, SEQIDNO: 52), крыса (Rattusnorvegicus, SEQIDNO: 53), корову (Bostaurus, SEQIDNO: 54), свиньи (Susscrofa, SEQIDNO: 55), кролик (Oryctolaguscuniculus, SEQIDNO: 56), курица (gallusgallus, SEQIDNO: 57), орангутанг (Pongoabelii, SEQIDNO: 59), собака (Canislupus, SEQIDNO: 60), овцы (Ovisarangus, SEQIDNO: 61), мармосет (Callithrixjacchus, SEQIDNO: 62), обезьяна макака (Macacamulatta, SEQIDNO: 63), северный гиббон (Nomascusleukogens, SEQIDNO: 64) и шимпанзе (Pantroglodytes, SEQIDNO: 65).

Ссылка на полипептиды u-PA также включает полипептиды-предшественники и зрелые полипептиды u-PA в одноцепочечных или двухцепочечных формах, их усеченные формы, которые обладают активностью, выделенный домен протеазы и включает аллельные варианты и разновидности вариантов, варианты, кодируемые вариантами сплайсинга, и другие варианты, включая полипептиды, которые имеют по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с

полипептидом-предшественником, изложенным в SEQIDNO: 1, или его зрелой формой (SEQIDNO: 3) или ее протеазным доменом (SEQIDNO: 2).

Полипептиды u-PA включают, но не ограничиваются ими, тканеспецифические изоформы и их аллельные варианты, синтетические молекулы, полученные трансляцией нуклеиновых кислот, белки, генерируемые химическим синтезом, такие как синтезы, которые включают лигирование более коротких полипептидов, посредством рекомбинантных способов, белки, выделенные из человеческих и нечеловеческих тканей и клеток, химерные полипептиды u-PA и их модифицированные формы.

Полипептиды U-PA также включают фрагменты или части u-PA, которые имеют достаточную длину или включают в себя соответствующие области для сохранения по меньшей мере одной активности (при активации если необходимо) полноразмерного зрелого полипептида.В одном примере часть u-PA представляет собой домен протеазы, такой как, например, домен протеазы, представленный в SEQIDNO: 2, который соответствует аминокислотам 179-431 последовательности u-PA, представленной в SEQIDNO: 1. Полипептиды u-PA также включают те, которые содержат химические или посттрансляционные модификации и те, которые не содержат химических или посттрансляционных модификаций

Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, пегилирование, альболюминирование, гликозилирование, фарнизилирование, карбоксилирование, гидроксилирование,фосфорилирование, HESилирование (увеличение периода полужизни на основе связывания молекул лекарственного средства с биоразлагаемымгидроксиэтилкрахмалом (HES)), PASилирование (конъюгация посредством генетического слияния или химического соединения фармакологически активных соединений, таких как белки, пептиды и низкомолекулярные лекарственные средства, с неупорядоченными биосинтетическими полимерами, изготовленными из небольших L-аминокислот Pro, Ala и/или Ser), и другиеполипептидные модификации, известные в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин "протеаза u-PA" или "домен протеазы u-PA" относится к любому полипептиду u-PA, включающему, но не ограничиваясь этим, рекомбинантно продуцируемый полипептид, синтетически полученный полипептид и полипептид u-PA, выделенный или выделенный из клеток или тканей, включая, но не ограничиваясь ими, печень и кровь. u-PA протеаза включает родственные полипептиды из различных видов, включая, но не ограничиваясь ими, животные человеческого и нечеловеческого происхождения.Протеаза u-PA человека или домен протеазы u-PA включает u-PA, аллельные варианты, изоформы, синтетические молекулы из нуклеиновых кислот, белок, выделенный из ткани и клеток человека, и их модифицированные формы. Примерные референсные домены протеаз u-PA человека включают, но не ограничиваются ими, немодифицированный и домен протеазы u-PA дикого типа (SEQIDNO: 2) и альтернативный домен протеазы (такой как домен протеазы u-PA, представленный в SEQIDNO: 5).Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что указанные положения домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 2) отличаются от 178 аминокислотных остатков по сравнению с зрелым полипептидом u-PA (SEQIDNO: 1), который представляет собой полипептид u-PA, содержащий полноразмерную последовательность WT. Таким образом, первый аминокислотный остаток SEQIDNO: 2'соответствует сто семьдесят девятому (179-му) аминокислотному остатку SEQIDNO: 1

Используемый в настоящем документе термин "модификация" относится к модификации последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот или нуклеотидов, соответственно. Способы модификации полипептида являются обычными для специалистов в данной области техники, например, с использованием методов рекомбинантной ДНК.

Существует различие между модификациями последовательности аминокислот полипептида и модификацией полипептида.Первые относятся к инсерциям,

делециям и заменам или замещениям аминокислот; последняя относится к модификациям полипептида, таким как посттрансляционные модификации, ПЭГилирование и другие подобные модификации белков для изменения свойств и/или активностей.

Используемый в настоящем документе термин "замена" или "замещение" относится к замене одного или более нуклеотидов или аминокислот в нативной, мишени, дикого типа или другой последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида на другой нуклеотид или аминокислоту, без изменения длины (как следует из числа остатков) молекулы. Таким образом, одна или более замен в молекуле не изменяет количество аминокислотных остатков или нуклеотидов молекулы. Аминокислотные замены по сравнению с конкретным полипептидом могут быть выражены в терминах количества аминокислотных остатков по длине полипептидной последовательности.

Например, модифицированный полипептид, имеющий модификацию в аминокислоте в 35 положении аминокислотной последовательности, с заменой/замещением аргинина (Arg; R) глутамином (Gln; Q) может быть выражен как R35Q, Arg35Gln или 35Q. Просто R35 может быть использован для указания, что аминокислота в модифицированном 35-ом положении представляет собой аргинин.

Используемый в настоящем документе термин "модифицированный u-PA" или "модифицированный полипептид u-PA" относится к протеазеu-PA, которая проявляет измененную активность, такую как измененная субстратная специфичность, по сравнению с немодифицированной формой. Такие протеазы включают 1,2,3, 4,5,6, 7,8,9, 10,11,12, 13,14,15, 16,17,18, 19, 20 или более модификаций (изменений аминокислот) по сравнению с u-PA дикого типа, так что активность, такая как специфичность или селективность субстрата, u-PA протеазы для расщепления белка C3 комплемента изменяется.

Модифицированный u-PA может представлять собой полноразмерную u-PA протеазу, или может быть частью полноразмерной протеазы, такой как протеазная область u-PA при условии, что модифицированная протеаза u-PA содержит модификации в областях, которые изменяют активность или субстратную специфичность протеазы, и протеаза протеолитически активна.

Модифицированная протеаза u-PA или модифицированный домен протеазы u-PA также может включать другие модификации в областях, которые не оказывают влияния на субстратную специфичность протеазы. Следовательно, модифицированный полипептид u-PA обычно имеет 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,95 %, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с соответствующей последовательностью аминокислот полипептида u-PA дикого типа.

Модифицированный полноразмерный u-PA полипептид или его каталитически активная часть или его протеазная область могут включать полипептиды, которые являются слитыми белками при условии, что слитый белок обладает целевой специфичностью.

В настоящем документе нумерация химотрипсина относится к нумерации аминокислот зрелого полипептида химотрипсина SEQIDNO: 76. Выравнивание протеазного домена другой протеазы, такой как, например, протеазная область u-PA, может быть произведена химотрипсином. В таком случае аминокислоты полипептида u-PA, которые соответствуют аминокислотам химотрипсина, приведены в нумерации аминокислот химотрипсина.Соответствующие положения могут быть определены таким выравниванием специалистом в данной области с использованием ручных выравниваний или с использованием доступных многочисленных программ выравнивания (например, BLASTP).

Соответствующие положения также могут быть основаны на структурном выравнивании, например, с использованием компьютерных моделируемых выравниваний белковой структуры. Указание, что аминокислоты полипептида соответствуют аминокислотам в раскрытой последовательности, относятся к аминокислотам, идентифицированным при выравнивании полипептида с раскрытой последовательностью для максимизации идентичности или гомологии (где консервативные аминокислоты выравнены) с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP.

Соответствующие химотрипсиновые числа аминокислотных положений 159-411 полипептида u-PA, представленные в SEQIDNO: 3, представлены в таблице 1.Аминокислотные положения относительно последовательности, представленной в SEQIDNO: 3, находятся в нормальном шрифте, аминокислотные остатки в этих положениях жирным шрифтом и соответствующие химотрипсиновые числа указаны другим шрифтом. Например, при выравнивании домена сериновой протеазы u-PA (SEQIDNO: 2) зрелым химотрипсином, изолейцин (I) в положении 159 в u-PA давал нумерацию химотрипсина I16. последующие аминокислоты пронумерованы соответственно.В примере фенилаланин (F) в аминокислотном положении 173 зрелой u-PA (SEQIDNO: 3) соответствует аминокислотному положению F30 на основе нумерации химотрипсина.

Если остаток существует в протеазе, но не присутствует в химотрипсине, аминокислотный остаток привоится в буквенном обозначении.Например, остатки химотрипсина, которые являются частью петли с аминокислотой 60 на основе нумерации химотрипсина, но вставляются в последовательность u-PA по сравнению с химотрипсином, называются, например, D60a, Y60b или P60c. Эти остатки соответствуют D208, Y209 и P210, соответственно, посредством нумерации относительно зрелой последовательности u-PA, представленной в SEQIDNO: 3

Таблица 1. Нумерация ofu-PA по химотрипсину

159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173
I	**I**	**G**	**G**	**E**	**F**	**T**	**T**	**I**	**E**	**N**	**Q**	**P**	**W**	**F**
16	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*23*	*24*	*25*	*26*	*27*	*28*	*29*	*30*
174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188
A	**A**	**I**	**Y**	**R**	**R**	**H**	**R**	**G**	**G**	**S**	**V**	**T**	**Y**	**V**
31	*32*	*33*	*34*	*35*	*36*	*37*	*37A*	*37*	*37*	*37*	*38*	*39*	*40*	*41*

								B	*C*	*D*				
189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
C	**G**	**G**	**S**	**L**	**I**	**S**	**P**	**C**	**W**	**V**	**I**	**S**	**A**	**T**
42	*43*	*44*	*45*	*46*	*47*	*48*	*49*	*50*	*51*	*52*	*53*	*54*	*55*	*56*
204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218
H	**C**	**F**	**I**	**D**	**Y**	**P**	**K**	**K**	**E**	**D**	**Y**	**I**	**V**	**Y**
57	*58*	*59*	*60*	*60A*	*60B*	*60C*	*61*	*62*	*62A*	*63*	*64*	*65*	*66*	*67*
219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233
L	**G**	**R**	**S**	**R**	**L**	**N**	**S**	**N**	**T**	**Q**	**G**	**E**	**M**	**K**
68	*69*	*70*	*71*	*72*	*73*	*74*	*75*	*76*	*77*	*78*	*79*	*80*	*81*	*82*
234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248
F	**E**	**V**	**E**	**N**	**L**	**I**	**L**	**H**	**K**	**D**	**Y**	**S**	**A**	**D**
83	*84*	*85*	*86*	*87*	*88*	*89*	*90*	*91*	*92*	*93*	*94*	*95*	*96*	*97*
249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263
T	**L**	**A**	**H**	**H**	**N**	**D**	**I**	**A**	**L**	**L**	**K**	**I**	**R**	**S**
97A	*97B*	*98*	*99*	*100*	*101*	*102*	*103*	*104*	*105*	*106*	*107*	*108*	*109*	*110*
264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278

K	E	G	R	C	A	Q	P	S	R	T	I	Q	T	I
110A	*110B*	*110C*	*110D*	*111*	*112*	*113*	*114*	*115*	*116*	*117*	*118*	*119*	*120*	*121*

279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293
C	**L**	**P**	**S**	**M**	**Y**	**N**	**D**	**P**	**Q**	**F**	**G**	**T**	**S**	**C**
122	*123*	*124*	*125*	*126*	*127*	*128*	*129*	*130*	*131*	*132*	*133*	*134*	*135*	*136*

294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308
E	**I**	**T**	**G**	**F**	**G**	**K**	**E**	**N**	**S**	**T**	**D**	**Y**	**L**	**Y**
137	*138*	*139*	*140*	*141*	*142*	*143*	*144*	*145*	*146*	*147*	*148*	*149*	*150*	*151*

309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323
P	**E**	**Q**	**L**	**K**	**M**	**T**	**V**	**V**	**K**	**L**	**I**	**S**	**H**	**R**
152	*153*	*154*	*155*	*156*	*157*	*158*	*159*	*160*	*161*	*162*	*163*	*164*	*165*	*166*

324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338
E	**C**	**Q**	**Q**	**P**	**H**	**Y**	**Y**	**G**	**S**	**E**	**V**	**T**	**T**	**K**
167	*168*	*169*	*170*	*170A*	*170B*	*171*	*172*	*173*	*174*	*175*	*176*	*177*	*178*	*179*

339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353
M	**L**	**C**	**A**	**A**	**D**	**P**	**Q**	**W**	**K**	**T**	**D**	**S**	**C**	**Q**

180	*181*	*182*	*183*	*184*	*185*	*185 A*	*185 B*	*186*	*187*	*188*	*189*	*190*	*191*	*192*
354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
G	**D**	**S**	**G**	**G**	**P**	**L**	**V**	**C**	**S**	**L**	**Q**	**G**	**R**	**M**
193	*194*	*195*	*196*	*197*	*198*	*199*	*200*	*201*	*202*	*203*	*204*	*205*	*206*	*207*
369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383
T	**L**	**T**	**G**	**I**	**V**	**S**	**W**	**G**	**R**	**G**	**C**	**A**	**L**	**K**
208	*209*	*210*	*211*	*212*	*213*	*214*	*215*	*216*	*217*	*218*	*220*	*221*	*222*	*223*
384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398
D	**K**	**P**	**G**	**V**	**Y**	**T**	**R**	**V**	**S**	**H**	**F**	**L**	**P**	**W**
223 A	*224*	*225*	*226*	*227*	*228*	*229*	*230*	*231*	*232*	*233*	*234*	*235*	*236*	*237*
399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411		
I	**R**	**S**	**H**	**T**	**K**	**E**	**E**	**N**	**G**	**L**	**A**	**L**		
238	*239*	*240*	*241*	*242*	*243*	*244*	*245*	*246*	*247*	*248*	*249*	*250*		

Как используется в настоящем документе, k_{cat} измеряет каталитическую активность фермента; единицы k_{cat} представляют собой секунды в степени -1. Обратная активность k_{cat} представляет собой время, требуемое молекулой фермента, чтобы "включить" одну молекулу субстрата; k_{cat} измеряет число

молекул субстрата, повернутых на молекулу фермента в секунду. k_{cat} иногда называется числом оборотов. В энзимологии k_{cat} (также называемая числом оборотов) является максимальным количеством химических превращений молекул субстрата в секунду, которые один каталитический участок производит для данного фермента. Максимальная скорость реакции (Vmax), наблюдается тогда, когда все ферментные каталитические центры насыщены субстратом.

Как используется в настоящем документе, специфичность для целевой подложки относится к предпочтению для расщепления целевой подложки протеазой по сравнению с другой подложкой, называемой нецелевой подложкой. Специфичность отражается в константе специфичности (kcat/Km), которая является мерой аффинности протеазы для ее субстрата и эффективностью фермента. Kcat/Km представляет собой меру эффективности фермента; большое значение Kcat (быстрый оборот) или небольшое значение Km (высокое сродство к субстрату) делают Kcat/Km большим.

Как используется в настоящем документе, константа специфичности для расщепления составляет (Kcat/Km), где Km представляет собой константу Михаэлиса-Ментона и Kcat представляет собой $V_{max}/[E_T]$, где $/[E_T]$-конечная концентрация фермента. Параметры Kcat, Km и Kcat/Km могут быть вычислены посредством построения графика обратной зависимости концентрации субстрата от обратной скорости расщепления субстрата и подгонки к уравнению Линевивера-Бурка (1/скорость = (Km/Vmax) (1/[S]) + 1/Vmax; где $Vmax = [E_T]Kcat$).

Любой способ определения скорости увеличения расщепления в течение времени в присутствии различных концентраций субстрата может быть использован для расчета константы специфичности. Например, субстрат связан с флуорогенным фрагментом, который высвобождается при расщеплении протеазой. Посредством определения скорости расщепления при различных концентрациях фермента Kcat может быть определена для конкретной протеазы. Константа специфичности может быть использована для определения предпочтения протеазы для одной мишени по сравнению с мишенью на другой подложке.

Как используется в настоящем документе, специфичность субстрата относится к предпочтению протеазы для одной мишени по сравнению с другой. Специфичность субстрата может быть измерена как отношение констант специфичности.

Как используется в настоящем документе, специфичность к субстрату представляет собой отношение констант специфичности и может быть использована для сравнения специфичности двух или более протеаз или протеазы для двух или более субстратов. Например, субстратная специфичность протеазы для конкурирующих субстратов или конкурирующих протеаз для субстрата может быть сравнена путем сравнения Kcat/Km. Например, протеаза, которая имеет константу специфичности 2 X $10^6 M^{-1} sec^{-1}$ для целевой подложки и 2 X $10^4 M^{-1} sec^{-1}$ для нецелевой подложки, является более специфической для целевой подложки. Используя вышеприведенные константы специфичности, можно сказать, что протеаза имеет отношение специфичности к субстрату 100 для целевого субстрата.

Как используется в настоящем документе, предпочтение или субстратная специфичность для целевой подложки может быть выражена как отношение специфичности к субстрату. Конкретное значение отношения, которое отражает предпочтение, является функцией субстратов и протеаз при выпуске. Отношение специфичности к субстрату, которое больше 1, означает предпочтение для целевой подложки и специфичность субстрата менее 1 означает предпочтение для нецелевой подложки.

Как правило, отношение по меньшей мере или приблизительно 1 отражает достаточную разницу для протеазы, которая должна рассматриваться как возможный вариант лечения.

Используемый здесь термин "измененная специфичность" относится к изменению субстратной специфичности модифицированной протеазы по сравнению с исходной протеазой дикого типа. Как правило, изменение специфичности представляет собой отражение изменения предпочтения модифицированной протеазы для целевого субстрата по сравнению с

субстратом дикого типа протеазы (в настоящем документе называется нецелевой подложкой).

Как правило, модифицированные u-PA протеазы, представленные в настоящем документе, проявляют повышенную субстратную специфичность для белка C3 комплемента по сравнению с субстратной специфичностью u-PA протеазы дикого типа. Например, модифицированная протеаза, которая имеет отношение специфичности к субстрату 100 для целевой подложки по сравнению с нецелевой подложкой, проявляет 10-кратную повышенную специфичность по сравнению с матриксной протеазой с отношением специфичности к субстрату 10.

В другом примере модифицированная протеаза, которая имеет отношение специфичности к субстрату 1 по сравнению с соотношением 0,1, проявляет 10-кратное увеличение специфичности субстрата. Для того чтобы проявлять повышенную специфичность по сравнению с протеазой скаффолда, модифицированная протеаза имеет 1,5-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 50-кратное, 100-кратное, 200-кратное, 300-кратное, 400-кратное, 500-кратное или более высокое увеличение субстратной специфичности для любого из нескольких белков комплемента.

Используемый в настоящем документе термин "селективность" может быть использован взаимозаменяемо с специфичностью при обращении к способности протеазы выбрать и расщеплять одну целевую подложку из смеси конкурирующих субстратов. Повышенная селективность протеазы для целевой подложки по сравнению с любыми другими целевыми субстратами может быть определена, например, путем сравнения констант специфичности расщепления целевых субстратов с помощью протеазы.Например, если протеаза имеет константу специфичности расщепления $2 \times 10^{6} M^{-1} sec^{-1}$ для целевогосубстрата и $2 \times 10^{4} M^{-1} sec^{-1}$

субстрата и 2 X 104 M -1 сек -1 для любого другого из нескольких субстратов, то протеаза является более селективной для целевого субстрата.

Используемый здесь термин "ингибирующая активность" или "функциональная активность" полипептида, такого как протеаза, относится к любой активности, проявляемой полипептидом. Такие действия могут быть определены эмпирически. Примеры активностей включают, но не ограничиваются ими, способность взаимодействовать с биомолекулой, например, посредством связывания субстрата, связывания ДНК или димеризации, ферментативной активности, например, активности киназы или протеолитической активности. Для протеазы (включая фрагменты протеаз), активности включают, но не ограничиваются ими, способность специфически связывать конкретную подложку, аффинность и/илиспецифичность связывания субстрата (например, высокая или низкая аффинность и/или специфичность), эффекторные функции, такие как способность стимулировать образование субстрата (например, белка, те C3), нейтрализацию, расщепление или клиренс и активность invivo, такие как способность стимулировать расщепление белка или клиренс.Активность может быть оценена invitro или invivo с использованием известных анализов, таких как ELISA, проточная цитометрия, поверхностные плазмонные резонансные или эквивалентные анализы для измерения включения или выключения, иммуногистохимии и иммунофлюоресцентной гистологии и микроскопии, анализы на клеточной основе и анализы связывания.

Например, для протеазы, например, модифицированной протеазы u-PA, можно оценить активность путем измерения расщепления белка субстрата, оборота, остаточной активности, стабильности и/или уровней invitro и/или invivo.Результат таких анализов invitro, которые показывают, что полипептид проявляет активность, может быть коррелирован с активностью полипептида invivo, в котором активность invivo может упоминаться как терапевтическая активность или биологическая активность.

Активность модифицированного полипептида может быть иметь любой процент от активности немодифицированного полипептида, включая, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере 1% активности, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% или более активности по

сравнению с немодифицированным полипептидом. Анализы для определения функциональности или активности модифицированных (или вариантов) протеаз хорошо известны в данной области техники.

Функциональные активности включают, но не ограничиваются ими, биологическую активность, каталитическую или ферментативную активность, антигенность (способность связываться или конкурировать с полипептидом для связывания с антителом полипептида), иммуногенность, способность образовывать мультимеры, и способность специфически связываться с рецептором или лигандом для полипептида.

Как используется в настоящем документе, функциональная активность со ссылкой на белок комплемента относится к функции, опосредованной комплементом, включая, но не ограничиваясь этим, анафилаксию, опсонизацию, хемотаксис или лизис клеток. Примеры анализов для тестирования активности комплемента включают гемолиз эритроцитов и обнаружение молекул эффекторов, таких как ELISA или SDS-PAGE.

Как используется в настоящем документе, каталитическая активность или активность расщепления относится к активности протеазы, как определено в протеолитических анализах invitro, которые обнаруживают протеолиз выбранной подложки. Активность расщепления может быть измерена путем оценки каталитической эффективности протеазы.

Как используется в настоящем документе, активность в отношении целевой подложки относится к активности расщепления и/или функциональной активности или другому измерению, которое отражает активность протеазы на или в направлении целевой подложки. Функциональная активность субстрата комплемента с помощью протеазы может быть измерена путем оценки IC50 в

анализе комплемента, таком как лизис эритроцитов, или других таких анализов, известных специалисту в данной области или предоставленных в настоящем документе для оценки активности комплемента.

Активность расщепления может быть измерена путем оценки каталитической эффективности протеазы. В настоящем документе активность увеличивается, если протеаза проявляет больший протеолиз или расщепление целевой подложки и/или модулирует (те активирует или ингибирует) функциональную активность белка комплемента по сравнению с отсутствием протеазы.

Используемый в настоящем документе термин "повышенная активность" по отношению к модифицированному полипептиду u-PA означает, что при тестировании в тех же условиях модифицированный полипептид u-PA проявляет большую активность по сравнению с немодифицированным полипептидом u-PA, не содержащим замену (ы) аминокислоты.Например, модифицированный полипептид u-PA проявляет по меньшей мере или около 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% или более активности немодифицированного или эталонного полипептида u-PA.

Используемый в настоящем документе термин "идентичный", когда используется в отношении аффинности связывания антитела, означает, что константа EC50, константа ассоциации (Ka) или константа диссоциации (Kd) находится в пределах от примерно 1 до 100 раз или от 1 до 10 раз от того, что эталонное антитело (1-100 раз большее сродство или 1-100 раз меньшее сродство или любое численное значение или диапазон или значение в пределах таких диапазонов, чем эталонное антитело).

Используемый в настоящем документе термин "связывающая активность" относится к характеристикам молекулы, например, полипептида, относящегося к тому, связывает ли она или нет, и тому, как она связывает один или более партнеров по связыванию. Связывающие активности включают способность связывать партнер (- ы) связывания, аффинность, с которой он

связывается с партнером по связыванию (например, с высоким сродством), прочность связи со связывающим партнером и/или специфичностью для связывания с партнером по связыванию.

Как используется в настоящем документе, EC50, также называемый кажущимся Kd, представляет собой концентрацию (например, nM) протеазы, где 50% максимальной активности наблюдается на фиксированном количестве субстрата (например, концентрация модифицированного полипептида u-PA, требуемого для расщепления на 50% доступного hC3). Как правило, значения EC50 определяются из сигмоидальных кривых доза-ответ, где EC50 представляет собой концентрацию в точке перегиба.

Высокое сродство к протеазе для субстрата коррелирует с низким значением EC50, а низкое сродство соответствует высокому значению EC50.Константы аффинности могут быть определены стандартной кинетической методологией для реакций протеаз, например, иммуноанализов, таких как ELISA, с последующим анализом кривой.

Используемый здесь термин "константа аффинности" относится к константе ассоциации (Ka), используемой для измерения аффинности или молекулярной связывающей силе между протеазой и субстратом. Чем выше константа аффинности, тем больше сродство протеазы к субстрату. Константы аффинности выражены в единицах обратной молярности (M^{-1}) и могут быть рассчитаны по константе скорости для реакции ассоциации-диссоциации, измеренной с помощью стандартной кинетической методологии для реакций протеаза-субстрат (например, иммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или других методов кинетического взаимодействия, известных в данной области). Аффинность связывания протеазы также может быть выражена как константа диссоциации или Kd.

Константа диссоциации является обратной величиной константы ассоциации, Kd = 1/Ka.Следовательно, константа аффинности также может быть представлена Kd.

Константы аффинности могут быть определены стандартной кинетической методологией для реакций протеаз, например, иммуноанализ, поверхностный плазмонный резонанс (SPR) (RichandMyszka (2000) Curr. Opin. Biotechnol 11: 54; Englebienne (1998) Analyst.123: 1599), изотермической титровой калориметрией (ITC) или другими методами анализа кинетического взаимодействия, известными в данной области (см. например, Paul, ed, FundamentalImmunology, 2 nded, RavenPress, NewYork, pages 332-336 (1989)).Приборы и способы для обнаружения в реальном времени и мониторинга скоростей связывания известны и коммерчески доступны (например, BIAcore 2000, BIAcoreAB, Uppsala, SwedenandGEHealthcareLifeSciences; Malmqvist (2000) BiochemSocTrans.27: 335).

Способы вычисления аффинности хорошо известны, такие как способы определения значений EC50 или способы определения констант ассоциации/диссоциации, включая те, которые приведены в качестве примеров в данном документе. Например, в отношении EC50 высокая аффинность связывания означает, что протеаза специфически связывается с целевым белком с EC50, который составляет менее чем приблизительно 10 нг/мл, 9 нг/мл, 8 нг/мл, 7 нг/мл, 6 нг/мл, 5 нг/мл, 3 нг/мл, 2 нг/мл, 1 нг/мл или менее. Также может быть высокая аффинность связывания характеризующаяся равновесной константой диссоциации (Kd) 10^{-6}Мили ниже, такой как 10^{-7}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M, 10^{-11}M или 10^{-12}Мили ниже. С точки зрения равновесной константы ассоциации (Ka) высокая аффинность связывания, как правило, связана с значениями Ka больше или равными приблизительно $10^{6}M^{-1}$, больше или равными приблизительно $10^{7}M^{-1}$, больше или равными приблизительно$10^{8}M^{-1}$, или больше или равными приблизительно $10^{9}M^{-1}$, $10^{10}M^{-1}$, $10^{11}M^{-1}$or $10^{12}M^{-1}$.

Аффинность может быть оценена эмпирически или может быть определена сравнительно, например, путем сравнения аффинности двух или более антител для конкретного антигена, например, путем вычисления попарных отношений аффинности исследуемых антител.Например, такие аффинности могут быть легко определены с использованием обычных методик, таких как ELISA; равновесный диализ; поверхностный плазмонный резонанс;

радиоиммуноанализ с использованием радиоактивно меченного целевого антигена; или другим способом, известным специалисту в данной области.Данные аффинности могут быть проанализированы, например, методом Scatchardetal. AnnNYAcadSci, 51: 660 (1949) или путем анализа аппроксимации кривой, например, с использованием модели 4 параметра логистической нелинейной регрессии с использованием уравнения: y = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D, где A представляет собой минимальную асимптоту, B представляет собой коэффициент наклона, C представляет собой точку перегиба (EC50), и D представляет собой максимальную асимптоту.

Используемый здесь термин "ED50" представляет собой дозу (например, мг/кг или nM) протеазы (например, модифицированную u-PA), которая приводит к указанному результату (например, расщепление белка C3 комплемента) в 50% общей популяции (например, общее количество C3, присутствующего в образце).

Используемый здесь термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет проводить анализ взаимодействий в реальном времени посредством обнаружения изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, с использованием систем BIAcore (GEHealthcareLifeSciences).

Как используется в настоящем документе, человеческий белок кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, такой как ДНК, присутствующей в геноме человека, включая все аллельные варианты и их консервативные вариации. Вариант или модификация белка представляет собой человеческий белок, если модификация основана на диком типе или последовательности человеческого белка.

Как используется в настоящем документе, остатки встречающихся в природе альфа-аминокислот представляют собой остатки этих 20 альфа-аминокислот, встречающихся в природе, которые включены в белок

посредством специфического распознавания молекулы заряженных тРНК его родственным кодоном мРНК у человека.

В настоящем документе не встречающиеся в природе аминокислоты относятся к аминокислотам, которые не генетически кодируются.

В настоящем документе термин "нуклеиновая кислота" относится к по меньшей мере двум сцепленным нуклеотидам или производным нуклеотидов, включая дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК) и их аналоги, соединенные вместе, как правило, фосфодиэфирными связями. Также в термин "нуклеиновая кислота" включены аналоги нуклеиновых кислот, такие как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК), фосфоротиоатная ДНК и другие такие аналоги и производные или их комбинации.

Нуклеиновые кислоты также включают производные ДНК и РНК, содержащие, например, нуклеотидный аналог или "основную" связь, отличную от фосфодиэфирной связи, например, фосфотриэфирную связь, фосфорамидатную связь, фосфоротиоатную связь, тиоэфирную связь или пептидную связь (пептидную нуклеиновую кислоту). Термин также включает в качестве эквивалентов производные, варианты и аналоги любой РНК или ДНК, полученные из аналогов нуклеотидов, одиночных (смысловых или антисмысловых) и двухцепочечных нуклеиновых кислот.

Дезоксирибонуклеотиды включают дезоксиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин. Для РНК основание урацила представляет собой уридин. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. При обращении к зондам или праймерам, которые могут быть помечены, например, детектируемой меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка, рассматриваются одноцепочечные молекулы.Такие молекулы, как правило, имеют длину такую, что их мишень является статистически уникальной или с низким числом копий (обычно менее 5, или менее 3) для зондирования или праймирования библиотеки.

Обычно зонд или праймер содержит по меньшей мере 14, 16 или 30 смежных нуклеотидов последовательности, комплементарной или идентичной гену, представляющему интерес. Зонды и праймеры могут иметь длину 10,20,30, 50, 100 или более нуклеотидов.

Как используется в настоящем документе, "выделенная молекула нуклеиновой кислоты" является такой, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекул нуклеиновой кислоты. "Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может быть по существу свободна от другого клеточного материала или культуральной среды при продуцировании рекомбинантными методами, или по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, когда синтезируется химически.Примером молекул выделенной нуклеиновой кислоты являются молекулы, предложенные в настоящем документе, являются изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие u-PA протеазу.

В настоящем документе термин "синтетический" относится к молекуле нуклеиновой кислоты или молекуле полипептида, которая получена рекомбинантными способами и/или методами химического синтеза.

Используемый в настоящем документе термин "полипептид" относится к двум или более аминокислотам, ковалентно связанным. Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо в данном документе.

В настоящем документе термин "пептид" относится к полипептиду, который составляет от 2 до приблизительно 40 аминокислот в длину.

Как используется в настоящем документе, аминокислоты, которые имеются в различных последовательностях аминокислот, представленных в настоящем документе, идентифицируются в соответствии с их известными, трехбуквенными или однобуквенными аббревиатурами (таблица 2). Нуклеотиды, которые встречаются в различных фрагментах нуклеиновой

кислоты, обозначаются стандартными однобуквенными обозначениями, используемыми в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин "аминокислота" представляет собой органическое соединение, содержащее аминогруппу и группу карбоновой кислоты. Полипептид содержит две или более аминокислот. Для целей настоящего изобретения аминокислоты включают двадцать встречающиеся в природе аминокислоты (таблица 2), неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот (т.е. аминокислоты, где альфа-углерод имеет боковую цепь).

Как используется в настоящем документе, аминокислоты, которые встречаются в различных аминокислотных последовательностях полипептидов, указанные в данном документе, идентифицируются в соответствии с их хорошо известными, трехбуквенными или однобуквенными аббревиатурой (см. таблицу 2). Нуклеотиды, которые встречаются в различных молекулах и фрагментах нуклеиновой кислоты, обозначаются стандартными однобуквенными обозначениями, используемыми в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин "аминокислотный остаток" относится к аминокислоте, образующейся при химическом расщеплении (гидролизе) полипептида по его пептидным связям. Предполагается, что аминокислотные остатки, описанные в настоящем документе, находятся в L-изомерной форме. Остатки в D-изомерной форме, которые обозначаются таким образом, могут быть заменены на любой L-аминокислотный остаток при условии, что желательное функциональное свойство сохраняется полипептидом. NH2 относится к свободной аминогруппе, присутствующей на аминоконцеполипептида.COOH относится к свободной карбоксильной группе, присутствующей на карбоксильном конце полипептида.

В соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, описанной в JBiol.Chem, 243: 3557-3559 (1968) и принятой в 37 CFR § § 1.821-1.822,аббревиатуры для аминокислотных остатков представлены в Таблице 2:

Таблица 2– Таблица соответствия

СИМВОЛ		
1-буквенный	**3-буквенный**	**АМИНОКИСЛОТА**
Y	Tyr	Тирозин
G	Gly	Глицин
F	Phe	Фенилаланин
M	Met	Метионин
A	Ala	Аланин
S	Ser	Серин
I	Ile	Изолейцин
L	Leu	Лейцин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
P	Pro	Пролин
K	Lys	Лизин
H	His	Гистидин
Q	Gln	Глутамин
E	Glu	Глутамоваягислота
Z	Glx	Glu и/илиGln
W	Trp	Триптофан
R	Arg	Аргинин
D	Asp	Аспаргиновая кислота
N	Asn	Аспарагин
B	Asx	Asnи/или Asp
C	Cys	Цистеин
X	Xaa	Неизвестные или другие

Все последовательности аминокислотных остатков, представленных в настоящем документе по формуле, имеют левостороннюю ориентацию в традиционном направлении от амино-конца к карбоксильному концу. Фраза "аминокислотный остаток" включает аминокислоты, перечисленные в таблице соответствия (таблица 2), модифицированные, неприродные и необычные аминокислоты.Кроме того, в начале или конце аминокислотной последовательности остатка может быть пептидная связь с дополнительной последовательностью одного или более аминокислотных остатков или с аминоконцевой группой, такой как NH2, или с карбоксильной концевой группой, такой как COOH.

Как используется в настоящем документе, «встречающиеся в природе аминокислоты» могут относиться к 20 L-аминокислотам, которые встречаются в полипептидах. Как используется в настоящем документе, остатки встречающихся в природе альфа-аминокислот представляют собой остатки этих 20 альфа-аминокислот, встречающихся в природе, которые включены в белок посредством специфического распознавания молекул заряженных тРНК его родственным кодоном мРНК у человека.

В настоящем документе термин "неприродная аминокислота" относится к органическому соединению, которое имеет структуру, подобную природной аминокислоте, но модифицировано структурно для имитации структуры и реакционной способности природной аминокислоты. Не встречающиеся в природе аминокислоты включают, например, аминокислоты или аналоги аминокислот, отличные от 20 встречающихся в природе аминокислот, и включают, но не ограничиваются ими, D-стереоизомеры аминокислот.

Примеры неприродных аминокислот известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, пара-ацетилфенилаланин, пара-азидофенилаланин, 2-аминоадипиновую кислоту (Aad), 3-аминоадипиновую кислоту (bAad), b-аланин/b-аминопропионовую кислоту (Bala), 2-аминомасляную кислоту (Abu), 4-аминомасляную кислоту/пиперидиновую кислоту (4Abu), 6-аминокапроновую кислоту (Acp), 2-

аминогептановую кислоту (Ahe), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), 3-аминоизомасляную кислоту (Baib), 2-аминопимелиновую кислоту (Apm), 2, 4-диаминомасляной кислоты (Dbu), десмозин (Des), 2,2'- диаминопимелиновую кислоту (Dpm), 2,3-диаминопропионовую кислоту (Dpr), N-этилглицин (EtGly), N-этиласпарагин (EtAsn), гидроксилизин (Hyl), алло-гидроксилизин (Ahyl), 3-гидроксипролин (3Hyp), 4-гидроксипролина (4Hyp), изодесмозина (Ide), алло-изолейцина (Aile), N-метилглицин, саркозин (MeGly), N-метилизолейцин (Nva), норлейцин (Nle) и орнитин (Orn).Примеры неприродных аминокислот описаны в настоящем документе и известны специалистам в данной области техники.

В настоящем документе изокинетическая смесь представляет собой такую, в которой молярные соотношения аминокислот были отрегулированы на основании их имеющихся скоростей реакции (см. например, Ostreshetal. (1994) Biopolymers 34: 1681).

Как используется в настоящем документе, конструкт ДНК представляет собой одну или двухцепочечную, линейную или кольцевую молекулу ДНК, которая содержит сегменты ДНК, объединенные и наложенные способом, не обнаруживаемым в природе. Конструкты ДНК существуют в результате действий человека и включают клоны и другие копии созданных молекул.

Как используется в настоящем документе, сегмент ДНК представляет собой часть большей молекулы ДНК, имеющей заданные атрибуты. Например, сегмент ДНК, кодирующий указанный полипептид, представляет собой часть более длинной молекулы ДНК, такой как плазмида или фрагмент плазмиды, который при считывании с 5'- 3'направления кодирует последовательность аминокислот указанного полипептида.

В настоящем документе термин "ортолог" означает полипептид или белок, полученный из одного вида, который является функциональным

аналогом полипептида или белка из различных видов. Различия в последовательности среди ортологов являются результатом специализации.

Используемый здесь термин "полинуклеотид" означает одноцепочечный или двухцепочечный полимер дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидных оснований, считанных с 5'- конца 3'- конца. Полинуклеотиды включают РНК и ДНК и могут быть выделены из природных источников, синтезированных invitro, или получены из комбинации природных и синтетических молекул. Длина полинуклеотидной молекулы приведена в настоящем документе в терминах нуклеотидов (сокращенно nt) или пар оснований (сокращенно bp).

Термин "нуклеотиды" используют для одноцепочечных и двухцепочечных молекул, где контекст позволяет. Когда термин применяется к двухцепочечным молекулам, он используется для обозначения общей длины и следует понимать как эквивалентный термин " пары оснований ". Специалистам в данной области техники понятно, что две цепи двухцепочечногополинуклеотида могут немного отличаться по длине, и что их концы могут быть расположены в шахматном порядке. Таким образом, все нуклеотиды в двухцепочечной полинуклеотидной молекуле не могут быть спаренными. Такие неспаренные концы обычно не превышают 20 нуклеотидов в длину.

Как используется в настоящем документе, выравнивание (совмещение) последовательности относится к применению гомологии для выравнивания (совмещения) двух или более последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Обычно две или более последовательностей, которые связаны на 50% или более идентичности, выровнены. Выровненный набор последовательностей относится к 2 или более последовательностям, которые выровнены в соответствующих положениях и могут включать в себя выравнивающие последовательности, полученные из РНК, таких как EST и другие кДНК, выровненные с геномными последовательностями ДНК. Связанные или вариантные полипептиды или молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выровнены любым способом, известным специалистам в данной области техники.

Такие способы обычно включают в себя способы, такие как использование ручных выравниваний и использование многочисленных доступных программ выравнивания (например, BLASTP) и других, известных специалистам в данной области техники.Путем выравнивания последовательностей полипептидов или нуклеиновых кислот специалист в данной области может идентифицировать аналогичные участки или положения, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве направляющих.

Кроме того, специалист в данной области также может использовать аминокислотные или нуклеотидные остатки в качестве направляющих для нахождения соответствующих аминокислотных или нуклеотидных остатков между и среди человеческих и нечеловеческих последовательностей. Соответствующие положения также могут быть основаны на структурном выравнивании, например, с использованием компьютерно моделируемых выравниваний белковой структуры.

В других случаях могут быть идентифицированы соответствующие области. Специалист в данной области техники также может использовать аминокислотные остатки в качестве направляющих для нахождения соответствующих аминокислотных остатков между и среди человеческих и нечеловеческих последовательностей.

Используемый в настоящем документе термин "идентичность последовательностей" относится к числу идентичных или подобных аминокислот или нуклеотидных оснований в сравнении между тестированием и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. Идентичность последовательностей может быть определена с помощью выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот или белковых последовательностей для идентификации областей сходства или идентичности. Для целей настоящего изобретения идентичность последовательности обычно определяетс выравниванием для идентификации идентичных остатков. Выравнивание может быть локальным или глобальным.Спички, несовпадения и зазоры могут быть идентифицированы между сравниваемыми последовательностями. Зазоры

представляют собой нулевые аминокислоты или нуклеотиды, вставленные между остатками выровненных последовательностей, так что одинаковые или подобные символы выровнены.

Как правило, могут быть внутренние и концевые зазоры. Идентичность последовательностей может быть определена с учетом зазоров как числа идентичных остатков/длины кратчайшей последовательности x100. Альтернативно, идентичность последовательностей может быть определена без учета зазоров как числа идентичных положений/длины полной выровненной последовательности x 100.

Как используется в настоящем документе, «в положении, соответствующем...» или указанию, что нуклеотиды или положения аминокислот могут «соответствовать» нуклеотидам или положениям аминокислот в раскрытой последовательности, например, представленной в перечне последовательностей, относятся к нуклеотидам или аминокислотным позициям, идентифицированным при выравнивании с раскрытой последовательностью для максимизации идентичности с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP.

Для целей настоящего описания, выравнивание последовательности u-PA относится к аминокислотной последовательности протеазного домена u-PA человека, представленной в SEQIDNO: 2 или 5, в частности, эталонным человеческим u-PASEQIDNO: 5. Путем выравнивания последовательностей, специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, с использованием консервативных и идентичных аминокислотных остатков в качестве направляющих.

Вобщем, дляидентификациисоответствующихположений, последовательностиаминокислотвыровненытакимобразом, чтополучаютсоответствиенаивысшегопорядка (см. например: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and

Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo*et al.*(1988) *SIAMJAppliedMath* 48:1073).

В качестве альтернативы, специалист в данной области может определить количество остатков химотрипсином, тем самым идентифицировать соответствующие остатки. Для близкородственных последовательностей компьютерный алгоритм не требуется; выравнивание может быть выполнено визуально.

Используемый в настоящем документе термин "глобальное выравнивание" представляет собой выравнивание, которое выравнивает две последовательности от начала до конца, выравнивая каждую букву в каждой последовательности только один раз. Выравнивание получено, независимо от того, имеется или нет сходство или идентичность между последовательностями. Например, 50% идентичности последовательности, основанной на глобальном выравнивании, означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей каждый по 100 нуклеотидов в длину, 50% остатков являются одинаковыми.

Понятно, что глобальное выравнивание также может быть использовано при определении идентичности последовательности, даже когда длина последовательностей не является одинаковой. В общем, глобальное выравнивание используется на последовательностях, которые имеют значительное сходство по большей части их длины.

Примерные алгоритмы для выполнения глобального выравнивания включают в себя алгоритм Needleman-Wunsch (Needlemanetal. (1970) JMol. Biol.48: 443). Приведенные в качестве примера программы для выполнения глобальных выравниваний являются общедоступными и включают в себя Глобальный Инструмент Совмещения Последовательностей в Национальном центре Биотехнологической Информации (NCBI), сайт ncbi.nlm.nih.gov, и программу, доступную hadeepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

Используемый в настоящем документе термин "локальное выравнивание (совмещение)" представляет собой выравнивание (совмещение), которое выравнивает (совмещает) две последовательности, но только те части последовательностей, которые имеют сходство или идентичность. Следовательно, локальное выравнивание определяет, присутствуют ли подсегменты одной последовательности в другой последовательности. Если нет сходства, то нет необходимости в выравнивании. Локальные алгоритмы выравнивания включают в себя алгоритм BLAST и Smith-Waterman (Adv. Appl. Math.2: 482 (1981)).Например, 50%-ная идентичность последовательности на основе локального выравнивания означает, что при выравнивании полной последовательности двух сравниваемых последовательностей любой длиныобласть сходства или идентичность 100 нуклеотидов в длину имеет 50% остатков, которые являются одинаковыми в области сходства или идентичности.

Для целей настоящего документа идентичность последовательностей может быть определена стандартными программами алгоритма выравнивания, используемыми по умолчанию, установленными каждым поставщиком.

Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать в себя: матрицу сравнения (содержащую значение 1 для идентичности и 0 для неидентичности) и взвешенную матрицу сравнения Gribskovetal (1986) Nucl. Acids Re.14: 6745, какописанов Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp.353-358 (1979).

Независимо от того, имеют ли две молекулы нуклеиновой кислоты нуклеотидные последовательности или любые два полипептида имеют аминокислотные последовательности, которые составляют по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% "идентичных" или других подобных вариаций, процент идентичности может быть определен с использованием известных компьютерных алгоритмов на основе локального или глобального выравнивания (см. например,wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software, с предоставлением

ссылок на десятки известных и общедоступных баз данных выравнивания и программ). Как правило, идентичность последовательностей определяется с использованием компьютерных алгоритмов, основанных на глобальном выравнивании, таком как GlobalSequenceAlignmentдоступном в NCBI/BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&Page_TYPE=BlastHome); LAlign (*Adv. Appl. Math.* (1991) 12:337-357)); andи прогрммаXiaoquiHuang(см.deepc2.psi.iastate.edu/aat/align/align.html.

Локальное выравнивание также может быть использовано, когда сравниваемые последовательности имеют по существу одинаковую длину.

Используемый в настоящем документе термин "идентичность" представляет собой сравнение или выравнивание между тестируемым и эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В одном неограничивающем примере, по меньшей мере, 90% идентичны процентам, идентичным процентам от 90% до 100% относительно эталонного полипептида или полинуклеотида.

Идентичность на уровне 90% или более указывает на тот факт, что, предполагая, что в иллюстративных целях тестовый и эталонный полипептид или полинуклеотидная длина 100 аминокислот или нуклеотидов сравниваются, не более 10% (те 10 из 100) аминокислот или нуклеотидов в тестируемом полипептиде или полинуклеотиде отличаются от того, что имеется в эталонных полипептидах.

Аналогичные сравнения могут быть сделаны между тестируемым и эталонным полинуклеотидами.Такие различия могут быть представлены как точечные мутации, случайным образом распределенные по всей длине аминокислотной последовательности, или они могут быть кластерами в одном или более местоположениях переменной длины вплоть до максимально допустимого, например, 10/100 аминокислотных различий (приблизительно 90% идентичности).Различия также могут быть вызваны делециями или укорочением аминокислотных остатков. Различия определяются как замены нуклеиновой кислоты или аминокислот, инсерции или делеции.В зависимости от длины сравниваемых последовательностей, на уровне гомологии или идентичностей выше примерно 85-90%, результат может быть независимым от

набора параметров программы; такие высокие уровни идентичности могут быть легко оценены, часто без использования программного обеспечения.

В настоящем документе дисульфидная связь (также называемая связью S-S или дисульфидным мостиком) представляет собой одинарную ковалентную связь, полученную из соединения тиольных групп. Дисульфидные связи в белках образуются между тиольными группами цистеиновых остатков и стабилизируют взаимодействия между полипептидными доменами.

Используемый в настоящем документе термин "связанный" или "конъюгированный" означает присоединенный посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия. Конъюгаты, предложенные в настоящем документе, содержат модифицированный домен протеазы полипептида u-PA (называемый "SPD", см. например, Фигура 4), и весь или часть оставшегося полипептида u-PA, связанного непосредственно или через линкер с другим фрагментом, таким как полипептид, который придает свойство, такое как увеличенный период полужизни в сыворотке (т.е. человеческий сывороточный альбумин HSA), или облегчает экспрессию или очистку (те, SUMO, his-SUMO, TSG -6) или нацеливает белок на рецептор, такой как антитело, которое связывается с рецептором. Полипептид может быть связан непосредственно или через полипептидный линкер, обычно короткий, приблизительно 4-20 аминокислоты, такие как комбинации остатков Ser и Gly. Конъюгаты, которые содержат полипептид, как правило, представляют собой слитые белки. Конъюгаты также включают модифицированные полипептиды u-PA, в которых аминокислотные остатки связаны с фрагментами, такими как фрагменты ПЭГ, фрагменты гликозилирования и другие такие фрагменты.

Используемый в настоящем документе термин "праймер" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может действовать как точка инициации синтеза ДНК, при соответствующих условиях (например, в

присутствии четырех различных нуклеозидныхтрифосфатов и агента полимеризации, такого как ДНК-полимераза, РНК-полимераза или обратная транскриптаза) в соответствующем буфере и при подходящей температуре. Специалист в данной области техники понимает, что некоторые молекулы нуклеиновой кислоты могут служить в качестве "зонда" и в качестве «праймера».Однако праймер имеет 3'- гидроксильную группу для удлинения. Праймер может быть использован в различных способах, включая, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), обратную транскриптазу (RT)-ПЦР, РНК ПЦР, ЛЦР, мультиплексную ПЦР, экспрессионную ПЦР, 3'и 5 RACE, insitu ПЦР, опосредованную лигированием ПЦР и другие протоколы амплификации.

Используемый в настоящем документе термин "праймер" относится к олигонуклеотиду, содержащему два или более дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, обычно более трех, из которых может быть инициирован синтез продукта удлинения праймера. Экспериментальные условия, способствующие синтезу, включают присутствие нуклеозидныхтрифосфатов и агента для полимеризации и расширения, таких как ДНК-полимераза, и подходящий буфер, температуру и pH.

Используемый в настоящем документе термин "пара праймеров" относится к набору праймеров, который включает праймер 5' (выше), который гибридизуется с 5'- концом последовательности, которая должна быть амплифицирована (например, с помощью ПЦР), и 3' (ниже) праймера, который гибридизуется с комплементом 3'- конца последовательности, которая должна быть амплифицирована.

Как используется в настоящем документе, "специфически гибридизуется" относится к комплементарному спариванию оснований молекулы нуклеиновой кислоты (например, олигонуклеотида) с молекулой нуклеиновой кислоты-мишенью. Специалисты в данной области техники

знакомы с параметрами invitro и invivo, которые влияют на специфическую гибридизацию, такую как длина и состав конкретной молекулы.Параметры, в частности релевантные для гибридизации invitro, дополнительно включают температуру промывки, состав буфера и концентрацию соли.Примеры условий промывки для удаления неспецифически связанных молекул нуклеиновой кислоты при высокой жесткости составляют 0,1 × SSPE, 0,1% SDS, 65° C, а при средней жесткости-0,2 × SSPE, 0,1% SDS, 50° C.Эквивалентные условия жесткости известны в данной области техники. Специалист в данной области может легко регулировать эти параметры для достижения специфической гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты с молекулой-мишенью нуклеиновой кислоты, подходящей для конкретного применения.

Как используется в настоящем документе, «по существу идентично продукту», является достаточно сходным, так что свойство, представляющее интерес, является достаточно неизменным, так что по существу идентичный продукт может быть использован вместо данного продукта.

Как используется в настоящем документе, также понятно, что термины "по существу идентичные" или "подобные" относятся к контексту, как понятно специалистам в соответствующей области техники.

Как используется в настоящем документе, форма дикого типа полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты представляет собой форму, кодируемую геном или кодирующей последовательностью, кодируемой геном. Обычно форма дикого типа гена или молекулы, кодируемой таким образом, не содержит мутаций или других модификаций, которые изменяют функцию или структуру. Термин "дикий тип" также охватывает формы с аллельным изменением, как это происходит среди и между видами.

Как используется в настоящем документе, преобладающая форма полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты относится к форме молекулы, которая является основной формой, полученной из гена. Преобладающая форма может изменяться от источника к источнику. Например, различные типы клеток или тканей могут продуцировать различные формы полипептидов, например,

путем альтернативного сплайсинга и/или посредством альтернативной обработки белка. В каждой клетке или типе ткани свой полипептид может быть преобладающей формой.

Как используется в настоящем документе, аллельный вариант или аллельное изменение относятся к любой из двух или более альтернативных форм гена, занимающего тот же хромосомный локус. Аллельное изменение возникает в природе посредством мутации, и может приводить к фенотипическому фенотипическому полиморфизму в популяциях. Мутации генов могут быть молчащими (без изменения в кодированном полипептиде) или могут кодировать полипептиды, имеющие измененную аминокислотную последовательность.

Термин "аллельный вариант" также используется здесь для обозначения белка, кодируемого аллельным вариантом гена. Как правило, эталонная форма гена кодирует форму дикого типа и/или преобладающую форму полипептида из популяции или одного эталонного элемента вида. Как правило, аллельные варианты, которые включают варианты между и среди видов, имеют по меньшей мере 80%, 90% или более аминокислотную идентичность с диким типом и/или преобладающей формой из тех же видов; степень идентичности зависит от гена и от того, является ли сравнение межвидовым или внутривидовым.Как правило, внутривидовые аллельные варианты имеют по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90% или 95% идентичности или более с диким типом и/или преобладающей формой, включая по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с диким типом и/или преобладающей формой полипептида.

Используемый в настоящем документе термин "аллель", используемый в настоящем документе взаимозаменяемо с «аллельным вариантом», относится к альтернативным формам гена или его частей. Аллели занимают один и тот же локус или положение на гомологичных хромосомах. Когда субъект имеет два идентичных аллеля гена, субъект является гомозиготным по данному гену или

аллелю. Когда субъект имеет два различных аллеля гена, считается, что субъект должен быть гетерозиготным по гену.

Аллели конкретного гена могут отличаться друг от друга в одном нуклеотиде или нескольких нуклеотидах и могут включать замены, делеции и вставки нуклеотидов. Аллель гена также может быть формой гена, содержащего мутацию.

Как используется в настоящем документе, разновидности вариантов относятся к вариантам полипептидов среди различных видов, включая различные виды млекопитающих, такие как мышь и человек. Как правило, разновидности видов имеют приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательностей.Соответствующие остатки между и среди видовых вариантов могут быть определены путем сравнения и выравнивания последовательностей для максимизации количества совпадающих нуклеотидов или остатков, например, так что идентичность между последовательностями равна или больше чем 95%, равна или больше чем 96%, равна или больше чем 97%, равна или больше чем 98% или равна более чем 99%.

Положение, представляющее интерес, представляет собой число, назначенное в контрольной молекуле нуклеиновой кислоты.Выравнивание можно осуществлять вручную или глазом, в частности, когда идентичность последовательности превышает 80%.

Как используется в настоящем документе, вариант сплайсинга относится к варианту, полученному путем дифференциальной обработки первичного транскрипта геномной ДНК, которая приводит к более чем одному типу мРНК.

Как используется в настоящем документе, модификация в отношении модификации первичной последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты включает делеции, инсерции и замены аминокислот и нуклеотидов, соответственно.Это отличается от модификаций самого полипептида, которые включают посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование,

фарнизилирование, пегилирование и слияния, такие как слияния с другими полипептидами, для изменения свойства, такого как период полужизни в сыворотке, такие как посредством альболюминирования, слияния с альбумином, таким как сывороточный альбумин человека, и другие такие модификации полипептида. Таким образом, ссылка на модификации последовательности аминокислот относится к инсерциям, делециям, замещениям/заменам и их комбинациям. Модификация полипептида относится к модификациям, которые добавляют к полипептиду, которые не изменяют его последовательность.

Для целей настоящего изобретения аминокислотные замены, делеции и/или вставки могут быть выполнены в любом полипептиде u-PA или его каталитически активном фрагменте, при условии, что полученный белок проявляет протеазную активность или другую активность (или, при желании, такие изменения могут быть сделаны для устранения активности). Модификации могут быть получены путем выполнения консервативных замен аминокислот, а также неконсервативных замен аминокислот.

Например, могут быть получены аминокислотные замены, которые желательно или преимущественно изменяют свойства белков. В одном варианте осуществления могут быть получены мутации, которые предотвращают деградацию полипептида. Многие протеазы расщепляют после основных остатков, таких как R и K; для устранения такого расщепления основной остаток заменяется неосновным остатком.Взаимодействие протеазы с ингибитором можно блокировать при сохранении каталитической активности путем осуществления неконсервативного изменения в месте взаимодействия ингибитора с протеазой. Другие действия также могут быть изменены. Например, связывание рецептора может быть изменено без изменения каталитической активности.

Предполагаемые замены аминокислот включают консервативные замены, такие как представленные в табл. 3, которые не удаляют протеолитическую активность. Как описано в настоящем документе, предусмотрены замены, которые изменяют свойства белков, такие как удаление

сайтов расщепления и других подобных сайтов; такие замены, как правило, являются неконсервативными, но могут быть легко осуществлены специалистами в данной области техники.

Как используется в настоящем документе, подходящие консервативные замены аминокислот известны специалистам в данной области и могут быть сделаны, как правило, без изменения биологической активности полученной молекулы. Специалисты в данной области техники признают, что, в общем, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см. например, Watsonetal. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, the Benjamin/Cumings Pub. Co, p.224).

Замены могут быть сделаны в соответствии с изложенными в таблице 3 следующим образом:

Таблица 3

Первоначальный остаток	Пример консервативной замены
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser

Таблица 3	
Первоначальный остаток	Пример консервативной замены
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Другие замены также являются допустимыми и могут быть определены эмпирически или в соответствии с известными консервативными заменами.

Используемый здесь термин промотор означает часть гена, содержащего последовательности ДНК, которые обеспечивают связывание РНК-полимеразы и инициирование транскрипции. Промоторные последовательности обычно, но не всегда, обнаруживаются в 5'- некодирующей области генов.

Используемый в настоящем документе выделенный или очищенный полипептид или белок или его биологически активная часть по существу не содержит клеточного материала или других загрязняющих белков из клетки ткани, из которой получен белок, или по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, когда синтезируется химически.

Препараты могут быть определены как по существу свободные, если они являются свободными от легко детектируемых примесей, как определено стандартными способами анализа, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), гель-электрофорез и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), используемая специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты или достаточно чистые так, что дальнейшая очистка не обнаружила бы изменения физических и химических свойств, таких как ферментативная и биологическая активность вещества.

Способы очистки соединений с получением по существу химически чистых соединений известны специалистам в данной области техники. Однако по существу химически чистое соединение может представлять собой смесь

стереоизомеров. В таких случаях дополнительная очистка может повышать удельную активность соединения.

Термин, по существу не содержит клеточного материала, включает препараты белков, в которых белок отделен от клеточных компонентов клеток, из которых он выделен или рекомбинантно получен. В одном варианте осуществления термин, по существу не содержит клеточного материала, включает в себя препараты протеазных белков, имеющие менее чем приблизительно 30% (по сухому весу) непротеазных белков (также упоминаемых в настоящем документе как загрязняющий белок), как правило, менее чем приблизительно 20% непротеазных белков, или 10% непротеазных белков, или менее, чем приблизительно 5% непротеазныхбелков.Когдапротеазный белок или его активная часть рекомбинантно продуцируется, она также по существу не содержит культуральной среды, то есть культуральная среда представляет собой меньше чем приблизительно или равна 20%, 10% или 5% от объема препарата протеазного белка.

Используемый здесь термин, по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, относится к препаратам протеазных белков, в которых белок отделяется от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Термин включает в себя препараты протеазных белков, имеющие менее приблизительно 30% (по сухому весу), 20%, 10%, 5% или менее химических предшественников или непротеазных химических веществ или компонентов.

Как используется в настоящем документе, продуцирование рекомбинантными способами с использованием рекомбинантных ДНК методов относится к применению хорошо известных методов молекулярной биологии для экспрессии белков, кодируемых клонированной ДНК.

Как используется в настоящем документе, термин "экспрессия" относится к процессу, с помощью которого полипептиды продуцируются транскрипцией и трансляцией полинуклеотидов. Уровень экспрессии

полипептида может быть оценен с использованием любого способа, известного в данной области техники, включая, например, способы определения количества полипептида, полученного из клетки-хозяина.Такие способы могут включать, но не ограничиваются ими, количественное определение полипептида в клеточном лизате с помощью ELISA, окрашивания Кумасси синего после гель-электрофореза, анализа белка Lowry и анализа белка Bradford.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" представляет собой клетку, которая используется для приема, поддержания, воспроизведения и/или амплификации вектора. Клетки-хозяева также могут быть использованы для экспрессии полипептида, кодируемого вектором. Нуклеиновая кислота, содержащаяся в векторе, реплицируется, когда клетка-хозяин делит, тем самым усиливая нуклеиновые кислоты.

Используемый здесь термин "вектор" или "плазмида" представляет собой реплицируемую нуклеиновую кислоту, из которой можно экспрессировать один или несколько гетерологичных белков, когда вектор трансформирован в соответствующую клетку-хозяина. Ссылка на вектор включает в себя дискретные элементы, которые используются для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетки для их экспрессии или репликации.

Ссылка на вектор также включает те векторы, в которые можно вводить нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид или его фрагмент, как правило, путем рестрикционного расщепления и лигирования. Ссылка на вектор также включает те векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую протеазу, такую как модифицированный u-PA. Вектор используется для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в клетку-хозяина для амплификации нуклеиновой кислоты или для экспрессии/отображения полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой.

Векторы, как правило, остаются эписомальными, но могут быть сконструированы для осуществления интеграции гена или его части в хромосому генома. Также предусмотрены векторы, которые представляют

собой искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы дрожжей и искусственные хромосомы млекопитающих. Выбор и использование таких носителей хорошо известны специалистам в данной области техники. Вектор также включает виральные векторы и вирусные векторы. Виральные векторы представляют собой сконструированные вирусы, которые функционально связаны с экзогенными генами для переноса (в качестве носителей или челноков) экзогенных генов в клетки.

Используемый здесь термин "вектор экспрессии" включает векторы, способные экспрессировать ДНК, которая функционально связана с регуляторными последовательностями, такими как промоторные области, которые способны осуществлять экспрессию таких фрагментов ДНК. Такие дополнительные сегменты могут включать в себя последовательности промотора и терминатора и могут включать в себя один или более источников репликации, один или более селектируемых маркеров, энхансер, сигнал полиаденилирования и т.п.

Векторы зкспрессии обычно получают из плазмиды или вирусной ДНК или могут содержать элементы обоих. Таким образом, вектор экспрессии относится к рекомбинантной ДНК или РНК конструкции, такой как плазмида, фаг, рекомбинантный вирус или другой вектор, который при введении в соответствующую клетку-хозяин приводит к экспрессии клонированной ДНК. Подходящие векторы экспрессии хорошо известны специалистам в данной области и включают те, которые реплицируются в эукариотических клетках и/или прокариотических клетках, и те, которые остаются эписомными или те, которые интегрируются в геном клетки-хозяина.

Как используется в настоящем документе, вектор также включает в себя вирусные векторы или виральные векторы. Виральные векторы представляют собой сконструированные вирусы, которые функционально связаны с экзогенными генами для переноса (в качестве носителей или челноков) экзогенных генов в клетки.

Как используется в настоящем документе, аденовирус относится к любому из группы ДНК-содержащих вирусов, которые вызывают инфекции конъюнктивита и верхних дыхательных путей у людей. Как используется в настоящем документе, оголенная ДНК относится к не содержащей гистон ДНК, которая может быть использована для вакцин и генной терапии. Оголенная ДНК представляет собой генетический материал, который переходит от клетки к клетке во время переноса гена. При трансформации очищенная или оголенная ДНК воспринимается клеткой-реципиентом, которая дает клетке-реципиенту новую характеристику или фенотип.

Используемый в настоящем документе термин " функционально связанный со ссылкой на последовательности нуклеиновой кислоты, области, элементы или домены означает, что области нуклеиновой кислоты функционально связаны друг с другом. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая лидерный пептид, может быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, где нуклеиновые кислоты могут транскрибироваться и транслироваться для экспрессии функционального слитого белка, где лидерный пептид влияет на секрецию слитого полипептида.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид (например, лидерный пептид), функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, и нуклеиновые кислоты транскрибируются в качестве единственного транскрипта мРНК, но трансляция транскрипта мРНК может приводить к экспрессии одного из двух полипептидов.Например, стоп-кодон может быть расположен между нуклеиновой кислотой, кодирующей первый полипептид, и нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, таким образом, что при введении в суппрессорную клетку полученный в результате единственный транскрипт мРНК может транслироваться для получения либо слитого белка, содержащего первый и второй полипептиды, либо может транслироваться для получения только первого полипептида.В другом примере промотор может быть функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид,

посредством чего промотор регулирует или опосредует транскрипцию нуклеиновой кислоты.

В настоящем документе термин "первичная последовательность" относится к последовательности аминокислотных остатков в полипептиде или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты.

Как используется в настоящем документе, последовательность связывания белка относится к белку или пептидной последовательности, которая способна к специфическому связыванию с другими белками или пептидными последовательностями, как правило, с набором белковых или пептидных последовательностей или с конкретным белком или пептидной последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин "тег" или "маркер эпитопа" относится к последовательности аминокислот, обычно добавляемых к N-или C-концу полипептида, такого как u-PA в данном документе. Включение тегов, слитых с полипептидом, может облегчать очистку и/или обнаружение полипептида.

Как правило, тег или тег полипептида относится к полипептиду, который имеет достаточное количество остатков для обеспечения распознавания эпитопа антителом, или может служить для обнаружения или очистки, но является достаточно коротким, так что он не мешает активности полипептида, к которому он привязан.

Тег полипептида обычно является достаточно уникальным, так что антитело, которое специфически связывается с ним, по существу не взаимодействует с эпитопами в полипептиде, с которым он связан. Меченые эпитопом белки могут быть аффинно очищены с использованием высокоспецифичных антител против тегов.

Подходящие теги обычно содержат по меньшей мере 5 или 6 аминокислотных остатков и обычно между примерно 8-50 аминокислотными остатками, обычно между 9-30 остатками.

Теги могут быть связаны с одним или несколькими белками и позволяют обнаруживать белок или его восстановление из образца или смеси.

Такие теги хорошо известны и могут быть легко синтезированы и разработаны.Примеры тегов включают те, которые используются для аффинной очистки и включают в себя теги SUMO, теги FLAG, His, полипептид тега гемагглютинина вируса гриппа (HA) и его антитело 12CA5, (Fieldetal. (1988) Mol. Cell.Biol.8: 2159-2165); тег c-mycантитела 8F9, 3C7, 6E10, g4, B7 и 9E10 к ним (см. например, Evanetal.(1985) MolecularandCellularBiology 5: 3610-3616); и тег гликопротеинаD (gD) вируса простого герпеса и его антитело (Paborskyetal. (1990) ProteinEngineering 3: 547-553). Антитело, используемое для обнаружения эпитопно-меченого антитела, обычно упоминается в данном документе как вторичное антитело.

Как используется в настоящем документе, связывающая металл последовательность относится к белку или пептидной последовательности, которая способна к специфическому связыванию с ионами металлов, как правило, с набором ионов металлов или с конкретным ионом металла.

Используемый здесь термин "оценка" предназначен для включения количественного и качественного определения в смысле получения абсолютного значения активности протеазы или ее домена, присутствующего в образце, а также получения индекса, соотношения, процента, визуального или другого значения, указывающего уровень активности.

Оценка может быть прямой или косвенной, и фактически обнаруженные химические вещества не обязательно должны представлять собой сам продукт протеолиза, но могут, например, представлять собой его производное или некоторое другое вещество. Например, обнаружение продукта расщепления белка комплемента, такой как SDS-PAGE, и окрашивание белка Coomassieblue.

Как используется в настоящем документе, биологическая активность относится к активности invivo соединения или физиологических реакций, которые приводят к введению invivo соединения, композиции или другой смеси. Таким образом, биологическая активность охватывает терапевтические эффекты и фармацевтическую активность таких соединений, композиций и смесей. Биологическая активность может наблюдаться в системах invitro, предназначенных для тестирования или использования таких активностей. Таким образом, для целей данного документа биологическая активность протеазы представляет собой ее каталитическую активность, в которой полипептид гидролизуется.

Как используется в настоящем документе, эквивалент, когда относится к двум последовательностям нуклеиновых кислот, означает, что эти две рассматриваемые последовательности кодируют одну и ту же последовательность аминокислот или эквивалентных белков.

Когда эквивалент используется в отношении двух белков или пептидов, это означает, что два белка или пептиды имеют по существу одну и ту же аминокислотную последовательность с только аминокислотными заменами (такими как, но не ограничиваясь ими, консервативные изменения, такие как те, которые представлены в таблице 3, выше), которые по существу не изменяют активность или функцию белка или пептида.

Когда эквивалент относится к свойству, свойство не обязательно должно присутствовать в той же степени (например, два пептида могут проявлять разные скорости одного и того же типа ферментативной активности), но активности обычно являются по существу одинаковыми.Комплементарность, если обратиться к двум нуклеотидным последовательностям, означает, что две последовательности нуклеотидов способны к гибридизации, как правило, с менее чем 25%, 15% или 5% ошибочных совпадений между противоположными нуклеотидами. При необходимости определяют процент комплементарности. Обычно две молекулы выбраны так, что они будут гибридизироваться в условиях высокой жесткости.

Как используется в настоящем документе, агент, который модулирует активность белка или экспрессию гена или нуклеиновой кислоты, либо уменьшается, либо увеличивается, либо иным образом изменяет активность белка или, каким-либо образом, понижает или понижает регуляцию или иным образом изменяет экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке.

Используемый в настоящем документе термин "химерный белок" или "слитая протеаза" относится к полипептиду, оперативно сцепленному с другим полипептидом. Химерный или слитый белок, предусмотренный в данном документе, может включать одну или более протеаз или их часть, такую как их одноцепочечные протеазные домены, и один или более других полипептидов для любого одного или более из сигналов управления транскрипцией/трансляцией, сигнальными последовательностями, меткой для локализации, меткой для очистки, частью домена иммуноглобулина G и/или нацеливающим агентом.

Эти химерные или слитые белки включают те, которые продуцируются рекомбинантными средствами в качестве слитых белков, которые продуцируются химическими средствами, такими как химическая связь, посредством, например, связывания с сульфгидрильными группами, и те, которые получены любым другим способом, в результате чего по меньшей мере одна протеаза или ее часть связана, прямо или косвенно через линкер (ы) с другим полипептидом.

В контексте настоящего документа, функционально связанный при обращении к слитому белку, относится к протеазному полипептиду и непротеазному полипептиду, которые слиты друг с другом. Непротезный полипептид может быть слит с N-концом или С-концом полипептида протеазы.

Как используется в настоящем документе, нацеливающий агент представляет собой любой агент, такой как белок или его эффективная часть, которая обеспечивает специфическое связывание конъюгата с рецептором клеточной поверхности, который в некоторых случаях может интернализировать связанные конъюгаты или их части. Нацеливающий агент

также может быть таким, который способствует или облегчает, например, выделение аффинности или очистку конъюгата; прикрепление конъюгата к поверхности; или обнаружение конъюгата или комплексов, содержащих конъюгат.

Используемый в настоящем документе термин "линкер" относится к коротким последовательностям аминокислот, которые соединяют два полипептида (или нуклеиновую кислоту, кодирующую такие полипептиды). "Пептидный линкер" относится к короткой последовательности аминокислот, соединяющей две полипептидные последовательности.

Примерами полипептидных линкеров являются линкеры, соединяющие две цепи антител в синтетическом фрагменте антитела, таком как фрагмент scFv. Линкеры хорошо известны и любые известные линкеры могут быть использованы в предоставленных способах. Примеры полипептидных линкеров представляют собой (Gly-Ser)n- аминокислотные последовательности, с несколькими остатками Glu или Lys, диспергированными на всем протяжении для увеличения растворимости. Другие примерные линкеры описаны в данном документе; любой из этих и других известных линкеров может быть использован с предоставленными композициями и способами.

При использовании в настоящем документе производное или аналог молекулы относится к части, полученной из или модифицированной версии молекулы.

Используемый в настоящем документе термин "заболевание или нарушение" относится к патологическому состоянию организма, получаемому в результате причины или состояния, включая, но не ограничиваясь этим, инфекции, приобретенные условия, генетические условия, состояния, связанные с воздействиями окружающей среды и поведения человека, и условия, характеризующиеся идентифицируемыми симптомами.

Заболевания или нарушения включают клинически диагностируемое заболевание, а также нарушения нормального состояния организма, которые не были диагностированы в качестве клинического заболевания.

Заболевания и нарушения, представляющие интерес, являются такими, которые включают активацию комплемента, включая клетки, опосредованные активацией комплемента, и те, в которых активация комплемента играет роль в этиологии или патологии. Заболевания и расстройства, представляющие интерес, включают те, которые характеризуются активацией комплемента (например, возрастная макулярная дегенерация и отложенная функция почек).

Как используется в настоящем документе, макулярнаядегенерация происходит, когда небольшая центральная часть сетчатки, известная как макула, ухудшается. Существует два типа AMD: сухой (атрофичный) и влажный (неоваскулярный или экссудативный). Большая часть AMD начинается в виде сухого типа и в 10-20% индивидуумов, она переходит во влажный тип. Возрастная макулярная дегенерация всегда двусторонняя (те происходит в обоих глазах), но не обязательно прогрессирует в одном и том же темпе в обоих глазах.

Как используется в настоящем документе, возрастная макулярная дегенерация (AMD) представляет собой воспалительное заболевание, которое вызывает нарушение зрения и слепоту у людей в возрасте. Белки системы комплемента являются центральными для развития данного заболевания. Местное и системное воспаление в AMD опосредовано дерегуляционным действием альтернативного пути системы комплемента.

Как используется в настоящем документе, запаздывающая функция трансплантата (DGF) представляет собой проявление острого повреждения почек (AKI) с признаками, уникальными для процесса трансплантации. Это происходит после операции по трансплантации. Функция отсроченного трансплантата (DGF) представляет собой общее осложнение, часто определяемое как потребность в диализе в течение первой недели после пересадки.

Внутренний синтез почек третьего компонента C3 (C3) комплемента вносит вклад в острое отторжение путем Т-клеточно-опосредованного ответа.

Как используется в настоящем документе, опосредованное комплементом заболевание или нарушение представляет собой любое нарушение, в котором любой один или более белков комплемента играет роль в заболевании, либо из-за отсутствия или присутствия белка комплемента или связанного с комплементом белка, либо активации или инактивации комплементсодержащего белка или связанного с комплементом белка. В некоторых вариантах осуществления, опосредованное комплементом расстройство происходит вследствие дефицита белка (ов) комплемента.

В других вариантах осуществления, как описано в настоящем документе, опосредованное комплементом расстройство является таким, которое обусловлено активацией или переактивацией белка (ов) комплемента. Опосредованное комплементом нарушение также является таким, которое происходит вследствие присутствия любого одного или более белков комплемента и/или продолжающейся активации пути комплемента.

Используемый в настоящем документе термин "нарушение, связанное с макулярной дегенерацией" относится к любому из ряда состояний, в которых макулы сетчатки дегенерируют или становятся дисфункциональными (например, вследствие уменьшения роста клеток макулы, повышенной гибели или перегруппировки клеток макулы (например, клетки RPE), потери нормальной биологической функции или комбинации этих событий).

Макулярная дегенерация приводит к потере целостности гистоструктуры клеток и/или внеклеточной матрицы нормальной макулы и/или потере функции клеток макулы. Примеры связанного с макулярной дегенерацией расстройства включают возрастную макулярную дегенерацию (AMD), географическую атрофию (GA), макулярнуюдистрофию Северной Каролины, дистрофию глазного дна Сорсби, болезнь Старгардта, мышечную дистрофию.

Расстройство, связанное с макулярной дегенерацией, также охватывает внемакулярные изменения, которые происходят до или после дисфункции и/или дегенерации макулы.Таким образом, термин "расстройство, связанное с макулярной дегенерацией" также в широком смысле включает любое условие,

которое изменяет или повреждает целостность или функцию макулы (например, повреждения РПЭ или мембраны Бруха). Например, термин охватывает отслоение сетчатки, хориоретинальные дегенерации, дегенерацию сетчатки, дегенерации фоторецептора, RPE дегенерации, мукополисахаридозы.

Расстройство, связанное с макулярной дегенерацией, описанное в настоящем документе, включает дегенерацию желтого пятна, такую как, например, макулярная дегенерация AMD. Расстройство, связанное с макулярнойдегенерацией, включает расстройства, обработанные анти-VEGF, такие как, например, антитела против VEGF, или лазерной обработкой, или имплантируемым телескопом.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" субъекта с заболеванием или состоянием означает, что симптомы субъекта частично или полностью облегчаются или остаются статическими после лечения. Следовательно, лечение включает профилактику, терапию.

Профилактика относится к предотвращению потенциального заболевания и/или предупреждению ухудшения симптомов или прогрессирования заболевания. Лечение также включает в себя любое фармацевтическое применение модифицированного полипептида u-PA и композиций, представленных в настоящем документе.

В настоящем документе термин "профилактика" или "предотвращение" относится к способам, в которых снижается риск или вероятность развития заболевания или состояния.

Используемый в настоящем документе термин "терапевтический агент", "терапевтический режим", "радиопротекторы" или "химиотерапевтические" означают традиционные лекарственные средства и лечебные средства, включая вакцины, которые известны специалистам в данной области техники. Радиотерапевтические агенты хорошо известны в данной области техники.

В настоящем документе термин "лечение" означает любой способ, в котором симптомы состояния, расстройства или заболевания облегчаются или иным образом изменяются. Лечение также включает любое фармацевтическое применение композиций в данном документе.

Используемый в настоящем документе термин "улучшение симптомов" конкретного заболевания или расстройства посредством лечения, такого как введение фармацевтической композиции или другого терапевтического средства, относится к любому уменьшению, постоянному или временному, затяжному или переходному, симптомов, которые могут быть приписаны или связаны с введением композиции или терапевтического средства.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически эффективное средство" включает любой терапевтический агент или биологически активные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, анестетики, сосудосуживающие средства, диспергирующие агенты и обычные терапевтические лекарственные средства, включая низкомолекулярные лекарственные средства и терапевтические белки.

Как используется в настоящем документе, эффективное количество соединения или композиции для лечения конкретного заболевания представляет собой количество, которое является достаточным для облегчения или, некоторым образом, уменьшения симптомов, связанных с заболеванием.

Такое количество можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в соответствии с режимом, в силу чего оно является эффективным. Это количество может излечивать заболевание, но, как правило, его вводят с целью облегчения симптомов заболевания.Как правило, повторное введение требуется для достижения желаемого облегчения симптомов.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащих соединение,

которое, по меньшей мере, является достаточным для получения терапевтического эффекта после введения субъекту. Следовательно, это количество, необходимое для предотвращения, облегчения, купирования или частичного купирования симптома заболевания или расстройства.

Используемый в настоящем документе термин "терапевтический эффект" означает эффект, полученный в результате лечения субъекта, который изменяет, как правило, улучшает или облегчает симптомы заболевания или состояния, или купирует заболевание или состояние.

В настоящем документе термин "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная доза" относится к количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащих соединение, которое при введении субъекту, имеет предполагаемый профилактический эффект, например, предотвращение или замедление возникновения, или повторного возникновения заболевания или симптомов, снижение вероятности возникновения или повторного возникновения заболевания или симптомов, или уменьшение частоты возникновения вирусной инфекции.Полный профилактический эффект не обязательно происходит путем введения одной дозы и может происходить только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество можно вводить один или несколько раз.

Используемый в настоящем документе термин "введение некомплементной протеазы", такой как модифицированная u-PA протеаза, относится к любому способу, в котором некомплементная протеаза контактирует с ее субстратом. Введение может осуществляться invivo или exvivo или invitro. Например, для введения exvivo жидкость тела, такую как кровь, удаляют из субъекта и приводят в контакт вне организма с модифицированной некомплементной протеазой, такой как модифицированная u-PA протеаза.Для введения invivo модифицированная некомплементная протеаза, такая как модифицированная u-PA протеаза, может быть введена в организм, например, местным, местным, системным и/или другим способом

введения. Введение invitro охватывает способы, такие как способы культивирования клеток.

Используемый в настоящем документе термин "форма дозы" относится к физически дискретным единицам, подходящим для людей и животных и упакованным по отдельности, как известно в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин "пациент" или "субъект", подлежащий лечению, включает людей или животных, не являющихся человеком. Млекопитающие включают; приматы, такие как люди, шимпанзе, гориллы и обезьяны; домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, свиньи, козы и коровы; и грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и герофилы.

В настоящем документе термин "комбинация" относится к любой ассоциации между двумя или более элементами. Ассоциация может быть пространственной или относится к применению двух или более элементов для общего назначения. Комбинация может быть двумя или более отдельными элементами, такими как две композиции или две совокупности, их смесью, такой как единая смесь двух или более изделий, или любое их изменение. Элементы комбинации, как правило, функционально связаны или связаны друг с другом.

Используемый в настоящем документе термин "композиция" относится к любой смеси двух или более продуктов или соединений (например, агентов, модуляторов, регуляторов и тд). Может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водные или неводные составы или любую их комбинацию.

Как используется в настоящем документе, стабилизирующий агент относится к соединению, добавленному в состав для защиты либо антитела, либо конъюгата, например, в условиях (например, температуры), при которых композиции в данном документе хранятся или используются. Таким образом, включены агенты, которые предотвращают деградацию белков из других

компонентов в композициях. Примерами таких агентов являются аминокислоты, производные аминокислот, амины, сахара, полиолы, соли и буферы, поверхностно-активные вещества, ингибиторы или субстраты и другие агенты, как описано в настоящем документе.

Используемый здесь термин "жидкость" относится к любой композиции, которая может течь. Таким образом, жидкости охватывают композиции, которые находятся в форме полутвердых веществ, паст, растворов, водных смесей, гелей, лосьонов, кремов и других подобных композиций.

Используемый в настоящем документе термин "изделие" представляет собой изделие, которое изготовлено и продается. Используемый в настоящей заявке термин предназначен для охвата терапевтического агента с модифицированным полипептидом u-PA или молекулой нуклеиновой кислоты, содержащейся в тех же или отдельных изделиях упаковки.

Используемый в настоящем документе термин "набор" относится к упакованной комбинации, которая может включать реагенты и другие продукты и/или компоненты для применения способов с использованием элементов комбинации. Например, наборы, содержащие модифицированный полипептид протеазы, такой как модифицированная u-PA протеаза, предоставленная в данном документе, или молекула нуклеиновой кислоты, предложенной в данном документе, и другой элемент для цели, включая, но не ограничиваясь этим, введение, диагностику и оценку биологической активности или свойства. Наборы могут включать в себя инструкции для использования.

Используемый в настоящем документе термин "клеточный экстракт" относится к препарату или фракции, которая изготовлена из лизированной или разрушенной клетки.

Используемый в настоящем документе термин "животное" включает любое животное, такое как, но не ограничиваясь этим; приматы, включающие людей, гориллы и обезьяны; грызуны, такие как мыши и крысы; цыплята; жвачные животные, такие как козы, коровы, олени, овцы; свиньи, и другие

животные. Нечеловеческие животные исключают человека, как рассматриваемое животное. Протеазы, представленные в настоящем документе, относятся к любому источнику, животному, растению, прокариотическому и грибковому. Большинство протеаз животного происхождения, включая млекопитающих.

Используемый в настоящем документе термин "однократная доза" относится к композиции, содержащей однократную дозу терапевтического агента для прямого введения. Однократные дозы обычно не содержат каких-либо консервантов.

Как используется в настоящем документе, многодозовый препарат относится к композиции, которая содержит множество доз терапевтического агента и которая может быть непосредственно введена для обеспечения нескольких единичных доз терапевтического агента. Дозы можно вводить в течение минут, часов, недель, дней или месяцев. Многодозовые составы могут обеспечить возможность регулирования дозы, объединения дозы и/или разделения дозы. Поскольку многодозовые составы используются во времени, они обычно содержат один или более консервантов для предотвращения роста микроорганизмов.

В настоящем документе термин "контрольный" или "стандартный" относится к образцу, который представляет собой по существу идентичный испытуемому образцу, за исключением того, что он не обработан исследуемым параметром, или, если он представляет собой образец плазмы, он может взят у нормального волонтера, не подверженных влиянию интереса. Контроль также может быть внутренним контролем. Например, контрольным может быть образец, такой как вирус, который имеет известное свойство или активность.

В настоящем документе формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на агент включает один или более агентов.

Используемый здесь термин "или" используется для обозначения "и/или", если явно не указано, чтобы ссылаться только на альтернативы или если альтернативы являются взаимоисключающими.

Как используется в настоящем документе, диапазоны и количества могут быть выражены как близкое к конкретному значению или диапазону. Приблизительно также включает точное количество. Следовательно, «около 5 оснований» означает около 5 оснований, а также 5 оснований.

Используемый в настоящем документе термин "необязательно" означает, что последующее описанное событие или обстоятельство происходит или не происходит, и что описание включает в себя случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит и случаи, когда оно не происходит. Например, необязательно замещенная группа означает, что группа является незамещенной или замещена.

Как используется в настоящем документе, аббревиатуры для любых защитных групп, аминокислот и других соединений, если не указано иное, применяются в соответствии с их общим использованием, узнаваемой аббревиатурой или комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре (см. (1972) Biochem.11: 1726).

Для ясности описания, а не в качестве ограничения, подробное описание разделено на подсекции, которые следуют далее.

B. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ U-PA

Активатор плазминогенаурокиназного типа (u-PA, также называемый урокиназой или урокиназнымактиватором плазминогена) представляет собой сериновуюпротеазу, которая катализирует гидролизплазминогена в плазмин. u-PA обнаруживается в моче, крови, семенных жидкостях и во многих раковых тканях. Он участвует в различных биологических процессах, которые связаны с преобразованиемплазминогена в плазмин, который сам является сериновой протеазой.

Плазмин играет роль в различных нормальных и патологических процессах, включая, например, миграцию клеток и разрушение ткани путем ее расщепления множества молекул, включающих фибрин, фибронектин, протеогликаны и ламинин.u-PA участвует в перестройке тканей во время заживления ран, миграции воспалительных клеток, неоваскуляризации и инвазии опухолевых клеток. u-PA также расщепляет и активирует другие субстраты, включая, но не ограничиваясь этим, фактор роста/фактор разброса гепатоцитов (HGF/SF), латентную форму матриксной металлопротеазы типа 1 (MT-SP1), тромбоцитарные факторы роста и другие.

В настоящем документе предложены модифицированные полипептиды активатора плазминогенаурокиназного типа (u-PA), которые модифицированы таким образом, что они расщепляют ингибирующие последовательности в C3, так что активация C3 в фрагменты C3a и C3b подавляется. Активность/специфичность модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, такова, что они расщепляют C3 с большей активностью и/или специфичностью или k_{cat}/k_mпо сравнению с немодифицированным полипептидом u-PA, в частности любой из SEQIDNO: 1-6. Модифицированные полипептидыu-PA также могут иметь пониженную активность или специфичность или обе из них для нативного физиологического субстрата плазминогенанемодифицированного полипептида u-PA. Таким образом, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, ингибируют активацию комплемента в пути комплемента.

Модифицированные полипептиды u-PA также проявляют повышенную селективность по расщеплению C3 по сравнению с другими субстратами u-PA, такими как плазминоген.Таким образом, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, не проявляют нежелательных эффектов расщепления против физиологических нативных субстратов u-PA, так что они не проявляют нежелательных побочных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный u-PA полипептид представляет собой протеазную область или одноцепочечную форму; в таких случаях свободный цистеин (положение остатка 122

посредством нумерации химотрипсина) заменен серином, чтобы уменьшить или устранить агрегацию при получении белка. В вариантах осуществления, в которых модифицированный полипептид u-PA имеет полную длину или другую форму, в которой он активируется расщеплением, остаток в положении 122 (посредством нумерации химотрипсина), как правило, не заменен S таким образом, что дисульфидная связь может образовывать двухцепочечный активированный полипептид.

1. Сериновые протеазы

Сериновые протеазы (SP), которые включают секретируемые ферменты и ферменты, секвестрированные в цитоплазматических органеллах, имеют множество физиологических ролей, включая свертывание крови, заживление ран, переваривание, иммунные ответы и опухолевую инвазию и метастазирование. Например, химотрипсин, трипсин и эластазная функция в пищеварительном тракте; Фактор 10, Фактор 11, тромбин и плазмин вовлечены в свертывание и заживление ран; и C1r, C1s и C3-конвертазы играют роль в активации комплемента.

Ошибка! Закладка не определена.Класс белков клеточной поверхности, обозначенный как трансмембранныесериновые протеазы типа II, представляет собой протеазы, которые являются мембранно-заякоренными белками с внеклеточными доменами. В качестве белков клеточной поверхности они играют роль в трансдукции внутриклеточного сигнала и в опосредовании протеолитическими событиями клеточной поверхности. Другие сериновые протеазы являются мембранами, связанными и функционирующими аналогичным образом. Другие секретируются.Многие сериновые протеазы проявляют свою активность при связывании с рецепторами клеточной поверхности и, следовательно, действуют на поверхности клеток. Протеолиз клеточной поверхности является механизмом для генерации биологически активных белков, которые опосредуют множество клеточных функций.

Сериновые протеазы, включая секретируемые и трансмембранные сериновые протеазы, вовлечены в процессы, которые включают в себя неопластическое развитие и прогрессирование.

Хотя точная роль этих протеаз не была полностью выяснена, сериновые протеазы и их ингибиторы вовлечены в контроль многих интра-и внеклеточных физиологических процессов, включая деградативные действия при инвазии раковых клеток и метастазирование и неоваскуляризацию опухолей, которые вовлечены в прогрессирование опухоли. Протеазы вовлечены в деградацию и ремоделирование внеклеточной матрицы (ECM) и вносят вклад в перестройку тканей и необходимы для инвазии и метастазирования рака. Было показано, что активность и/или экспрессия некоторых протеаз коррелируют с прогрессированием и развитием опухоли.

Были идентифицированы более 20 семейств (обозначенных S1-S27) сериновой протеазы, и они сгруппированы в 6 кланов (SA, SB, SC, SE, SF и SG) на основе структурного сходства и других функциональных доказательств (RawelsNDetal. (1994) MethEnzymol.244: 19-61). Существует сходство в реакционных механизмах нескольких сериновых пептидаз. Кланы химотрипсина, субтилизина и карбоксипептидазаы С имеют каталитические триады серина, аспартата и гистидина в общем виде: серин действует в качестве нуклеофила, аспартат в качестве электрофила и гистидина в качестве основания. Геометрические ориентации каталитических остатков одинаковы между семействами, несмотря на различные складки белка. Линейные компоновки каталитических остатков обычно отражают взаимосвязи.Например, каталитическая триада в химотрипсиновомклане (SA) является упорядоченной HDS, но является упорядоченной DHS в субтилизиновомклане (SB) и SDH в карбоксипептидазном клане (SC).

Примеры сериновых протеаз суперсемейства химотрипсина включают тканеподобный активатор плазминогена (tPA), трипсин, трипсиноподобную протеазу, химотрипсин, плазмин, эластазу, урокиназу (или активатор плазминогена, u-PA), активированный белок С, С1 эстеразу, катепсинG, химазу и протеазы каскада свертывания крови, включая калликреин, тромбин и

факторы VIIa, IXa, XIa, XIa и XIIa(Barret, A.J., In: *ProteinaseInhibitors*, Ed. Barrett, A.J., *et al.*, Elsevier, Amsterdam, Pages 3-22 (1986); Strassburger, W. *et al.*, (1983) *FEBS Lett.*, 157 :219-223; Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol 5, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md. (1972); andRosenberg, R.D. *etal.* (1986) *Hosp. Prac.*, 21: 131-137).

Активность протеаз в семействе сериновых протеаз зависит от набора аминокислотных остатков, которые образуют их активный участок. Один из остатков всегда представляет собой серин; следовательно, их обозначение как сериновые протеазы. Например, химотрипсин, трипсин и эластаза имеют сходную структуру, а их активный сериновый остаток находится в одном и том же положении (Ser195) во всех трех.Несмотря на их сходство, они имеют различные субстратные специфичности; они расщепляют различные пептидные связи во время переваривания белка.

Например, химотрипсин предпочитает ароматическую боковую цепь на остатке, чей карбонильный углерод является частью пептидной связи, подлежащей расщеплению. Трипсин предпочитает положительно заряженный остаток Lys или Arg в этом положении.

Сериновые протеазы заметно различаются по своим свойствам распознавания субстрата: некоторые из них являются высокоспецифичными (т.е. протеазами, вовлеченными в свертывание крови и иммунную систему комплемента); некоторые являются лишь частично специфическими (т.е. протеазами млекопитающих); и другие, такие как субтилизин, бактериальная протеаза, являются полностью неспецифическими.Несмотря на эти различия в специфичности, каталитический механизм сериновых протеаз хорошо сохраняется.

Механизм расщепления целевого белка сериновой протеазой основан на нуклеофильной атаке целевой пептидной связи серином. Цистеин, треонин или молекулы воды, связанные с аспартатом или металлами, также могут играть эту

роль. Во многих случаях нуклеофильное свойство группы улучшается в присутствии гистидина, удерживаемого в "состоянии акцептора протонов" аспартатом. Выровненные боковые цепи серина, гистидина и аспартата образуют каталитическую триаду, общую для большинства сериновых протеаз. Например, остатками активного сайта химотрипсина и сериновых протеаз, которые являются членами того же семейства, что и химотрипсин, такие как, например, MTSP -1, являются Asp102, His57 и Ser195.

Каталитические домены всех сериновых протеаз суперсемейства химотрипсина имеют гомологию последовательностей и структурную гомологию. Гомология последовательностей включает консервацию: 1) характеристических активных остатков сайта (например, Ser195, His57 и Asp102 в случае трипсина); 2) оксианионного отверстия (например, Gly193, Asp194 в случае трипсина); и 3) остатков цистеина, которые образуют дисульфидные мостики в структуре (Hartley, B.S., (1974) Symp. SocGenMicrobiol. 24: 152-182). Структурная гомология включает в себя 1) общую складку, характеризующуюся двумя ключевыми структурами Greek (Richardson, J. (1981) Adv. Prot. Chem, 34: 167-339); 2) общее расположение каталитических остатков; и 3) детальное сохранение структуры внутри ядра молекулы (Stroud, R.M. (1974) Sci.Am., 231: 24-88).

Во всем семействе химотрипсиновых протеаз взаимодействие остова между субстратом и ферментом является полностью консервативным, но взаимодействия боковой цепи значительно изменяются. Идентичность аминокислот, которые содержат S1-S4 карманы активного участка, определяет субстратную специфичность этого конкретного кармана. Прививка аминокислот одной сериновой протеазы к другой из одной и той же складки модифицирует специфичность одного к другому. Обычно аминокислоты протеазы, которые содержат S1-S4 карманы, представляют собой те, которые имеют боковые цепи в пределах от 4 до 5 ангстрем субстрата. Взаимодействия этих аминокислот с субстратом протеазы обычно называют взаимодействиями первой оболочки, поскольку они непосредственно контактируют с субстратом.

Тем не менее, может быть, однако, взаимодействия второй оболочки и третьей оболочки, в конечном счете, позиционируют первые аминокислоты оболочки.

Эффекты связывания первой оболочки и второй оболочки определяются, главным образом, петлями между доменами бета-цилиндра.
Поскольку эти петли не являются стержневыми элементами белка, целостность складки поддерживается, в то время как варианты петли с новыми специфичностями субстрата могут быть выбраны в ходе эволюции для выполнения необходимых метаболических или регуляторных ниш на молекулярном уровне.Как правило, для сериновых протеаз следующие аминокислоты в первичной последовательности представляют собой детерминанты специфичности: 195, 102, 57 (каталитическая триада); 189,190,191, 192 и 226 (S1); 57, петля между 58 и 64 и 99 (S2); 192, 217, 218 (S3); петля между Cys168 и Cys180, 215 и 97-100 (S4); и 41 и 151 (S2') на основе нумерации химотрипсина, где аминокислота в положении S1 влияет на специфичность P1, аминокислота в положении S2 влияет на специфичность P2 Аминокислота в положении S3 влияет на специфичность P3, и аминокислота в положении S4 влияет на специфичность P4.

Позиция 189 в сериновой протеазы представляет собой остаток, заглубленный в нижней части кармана, который определяет специфичность S1. Структурные детерминанты для u-PA приведены в таблице 4, при этом протеазные домены для каждой из указанных протеаз совпадают с протеазными доменами химотрипсина.Число под заголовками Cys168-Cys182 и 60 указывает на количество аминокислот в петле между двумя аминокислотами и в петле. Обозначение "да/нет" под заголовками Cys191-Cys220 указывает, присутствует ли дисульфидный мостик в протеазе. Эти области являются переменными в пределах семейства химотрипсиноподобныхсериновых протеаз и представляют собой структурные детерминанты сами.

2. Структура

2. Структура

кДНК u-PA клонировалиизмножествавидовмлекопитающих. Примерыполипептидов-предшественников u-PA илиполипептидовпрепро-урокиназывключают, нонеограничиваютсяими, u-PA полипептидычеловеческие (SEQ ID NO: 1 и кодируемые SEQ ID NO: 7), мыши (SEQ ID NO: 52), крысы (SEQ ID NO: 53), бычий (SEQ ID NO: 54), свиньи (SEQ ID NO: 55), кролика (SEQ ID NO: 56), курицы (SEQ ID NO: 57), орангутангаСуматры (SEQ ID NO: 59), собаки (SEQ ID NO: 60), барана (SEQ ID NO: 61), (SEQ ID NO: 62), обезьяны (SEQ ID NO: 63), северногобеловчантногогиббона (SEQ ID NO: 64) и шимпанзе (SEQ ID NO: 65). Транскрипт мРНК, как правило, транслируют для получения белка-предшественника, содержащего 20 аминокислотную сигнальную последовательность на N-конце. После транспортировки к ER сигнальный пептид удаляют с получением полипептида проурокиназы.

Примеры полипептидов проурокиназы включают, но не ограничиваются ими, u-PA полипептиды человека (SEQIDNO: 3), мыши (SEQIDNO: 66), крысы (SEQIDNO: 67), бычий (SEQIDNO: 68), свиньи (SEQIDNO: 69), кролика (SEQIDNO: 70), курицы (SEQIDNO: 71), орангутанга Суматры (SEQIDNO: 73), собаки (SEQIDNO: 74). Например, транскрипт мРНК u-PA человека обычно транслируется с образованием 431 аминокислотного предшественника белка (SEQIDNO: 1), содержащего 20 аминокислотную сигнальную последовательность на N-конце MetArgAlaLeuLeuAlaArgLeuLeuLeuCysValLeuValSerAspSerLysGly (аминокислотные остатки 1-20 SEQIDNO: 1).

Таким образом, после транспортировки к ER и удаления сигнального пептида получают 411 аминокислотный проурокиназный полипептид с последовательностью аминокислот, представленной в SEQIDNO: 3.Как более подробно описано ниже, проурокиназа представляет собой зимоген или профермент, который далее обрабатывается протеолитическим расщеплением для получения двухцепочечного зрелого полипептида u-PA.

Таким образом, например, со ссылкой на зрелый u-PA (SEQIDNO: 3) цепь u-PA дикого типа содержит первую цепь (A цепь), остатки 1-158, связанные дисульфидом с остатками 159-411 (B цепи) через дисульфидную связь между

Cys148 (нумерация химотрипсина C97a) и Cys279 (нумерация химотрипсина C122).Следовательно, в модифицированных полипептидах u-PA, приведенных здесь, когда образуется домен протеазы, он содержит замену C122S, но когда образуется активированная форма, которая представляет собой двухцепную форму, остаток 122(по нумерации химотрипсина) представляет собой C, так что он образует дисульфидную связь с другим C, обычно в последовательности активации (см. обсуждение ниже и пример 15).

Предшественник человеческой u-PA имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQIDNO: 1 и кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQIDNO: 7. Человеческая pro-u-PA, также называемая зрелой u-PA, лишенная сигнальной последовательности, представлена в SEQIDNO: 3. Существуют две изоформы u-PA человека, полученные альтернативным сплайсингом. Изоформа 1 u-PA человека представляет собой каноническую форму, описанную выше в SEQIDNO:1 В изоформе 2 человеческой u-PA аминокислоты 1-29 SEQIDNO: 1 заменены аминокислотами 1-12 SEQIDNO: 51, и полученный белок содержит 414 аминокислот (представленно в SEQIDNO: 51). Известны аллельные варианты и другие варианты u-PA человека. Например, известен вариант uPA, содержащий аминокислотную модификацию V15L в последовательности аминокислот, представленной в SEQIDNO: 1.

В другом примере известен модифицированный полипептид u-PA, содержащий аминокислотную модификацию C299S (C122S по нумерации химотрипсина) в последовательности аминокислот, представленной в SEQIDNO: 1 (соответствующей последовательности аминокислот, представленной в SEQIDNO: 4).Дополнительные варианты включают те, которые содержат аминокислотные модификации P121L, D130G, C131W, I194M, K211Q, G366c и A410V в зрелой u-PA, представленной в SEQIDNO: 3 (соответствующие аминокислотным модификациям P141L, D150G, C151W, I214M, K231Q, G386C и A430V в SEQIDNO: 1).

Полипептиды u-PA синтезируются и секретируются в виде одноцепочечных молекул зимогена (также называемых проурокиназами или одноцепочечными

урокиназами), которые превращаются в активные двухцепочечныеu-PA с помощью различных протеаз, включая, например, плазмин, калликреин, катепсин B, матриптазу и фактор роста нервов-гамма. Расщепление с образованием двухцепочечной формы происходит между остатками 158 и 159 (SEQIDNO: 3) в последовательности проурокиназы человека (соответствующей аминокислотным остаткам 178 и 179 в SEQIDNO: 1).

Две полученные цепи связаны дисульфидной связью между Cys148 и Cys279, тем самым образуя двухцепочечную форму u-PA, при этом двухцепочечная форма u-PA также называется высокоймолекулярнойu-PA (HMW-u-PA).HMW-u-PA можно дополнительно перерабатывать в низкомолекулярную u-PA (LMW-u-PA) путем расщепления цепи в короткую цепь A (A1, аминокислоты 136-157 SEQIDNO: 3) и аминоконцевой фрагмент 21-178 связанного дисульфида с 179-411, связанным Cys, соответствующим Cys148 и Cys279 (SEQIDNO: 3).

Активатор плазминогенаурокиназного типа, u-PA, представляет собой классическую сериновую протеазу, содержащую каталитическую триаду His-Asp-Ser, которая расщепляет конкретную связь Arg-Val в плазминогене с образованием плазмина. Плазмин, в свою очередь, может расщеплять u-PA на Lys158-Ile159 SEQIDNO: 3 (соответствующий Lys15-Ile16 по нумерации химотрипсина), образуя двухцепочечную форму, описанную выше. Каталитическая триада u-PA человека включает аминокислоты His204, Asp255 и Ser356 SEQIDNO: 3 (соответствующие His57, Asp102 и Ser195 по нумерации химотрипсина).

Остатки Ser138 и Ser303 uPA человека, представленной в SEQIDNO: 3, фосфорилированы (Francoetal. (1997) JCellBiol 137: 779-791). u-PA человека содержит O-связанное гликозилирование, например фукозилирование, при аминокислотном остатке Thr18 SEQIDNO: 3 (Bukoetal. (1991) ProcNatlAcadSciUSA 88: 3992-3996) и N-связанное гликозилирование при аминокислотном остатке Asn302 SEQIDNO: 3.Зрелый человеческий u-PA содержит внутриклеточные дисульфидные связи между остатками C11-C19, C13-C31, C33-C42, C50-C131, C71-C113, C102-C126, C189-C205, C197-C268,

C293-C362, C325-C341 и C352-C380 SEQIDNO: 3 и межцепочечную дисульфидную связь между остатками C148-C279 SEQIDNO: 3 Зрелая форма u-PA представляет собой белок с 411 остатками (соответствующие аминокислотным остаткам 21-431 в последовательности аминокислот, представленной в SEQIDNO: 1, которая является формой предшественника, содержащей 20 аминокислотный сигнальный пептид). u-PA содержит три домена, включая домен сериновой протеазы и домен фактора роста.В зрелой форме u-PA человека аминокислоты 1-158 представляют собой N-концевую A цепь, включающую домен фактора роста (аминокислоты 1-49), домен с аминокислотами 50-131 и междоменнуюсвязывающую область (аминокислоты 132-158). Аминокислоты 159-411 представляют C-концевой домен сериновойпротеазы или B цепь.

u-PA синтезируется и секретируется в виде одноцепочечной зимогенной молекулы, которая преобразуется в активную двухцепочечнуюu-PA множеством протеаз, включая, например, плазмин, калликреин, катепсин B и фактор роста нервов-гамма. Расщепление в две цепи происходит между остатками 158 и 159 в зрелой последовательности u-PA (соответствующей аминокислотным остаткам 178 и 179 в SEQIDNO: 3).Две результирующие цепи удерживаются вместе дисульфидной связью, образуя тем самым двухцепочечную форму u-PA

Активаторы плазминогенаурокиназного типа содержат три домена, включая доменсериновой протеазы и домен фактора роста. В зимоген или профермentной форме u-PA человека аминокислоты 1-158 SEQIDNO: 3 представляют собой N-концевую цепь (или длинную цепь A), включающую домен эпидермального фактора роста (аминокислоты 1-49), кольцевой домен (аминокислоты 50-131) и междоменную связывающую область (аминокислоты 132-158) и аминокислоты 159-411 представляют каталитически активный C-концевой домен сериновойпротеазный или B цепь. Домен эпидермального фактора роста отвечает за связывание u-PA с заякоренным на поверхности клеткиu-PA-рецептором (uPAR).

Во внеклеточной матрице u-PA привязан к клеточной мембране посредством связывания с u-PA рецептором. LMW-u-PAпротеолитически активен, но не связывается с u-PAрецептором.Домен сериновой протеазы содержит расположенные на поверхности петли вокруг остатков 37,60,96, 110, 170 и 185 посредством нумерации химотрипсина. При активации или расщеплении аминоконцевые вставки в гидрофобную связывающую щель домена каталитической протеазы образуют гидрофобные взаимодействия и солевой мостик с боковым карманом Asp194, который стабилизирует карман для связывания субстрата и оксианионное отверстие в каталитически продуктивной конформации.

Asp194, в соответствии с нумерацией химотрипсина, участвует в водородном соединении с аминогруппой основной цепи Gly142 и карбонильной группой основной цепи Lys143 (Bluseetal. (2009) JBiolChem 284: 4647-4657). Конформационные изменения после расщепления включают четыре неупорядоченные области домена активации, включая петлю активации (остатки 16-21), петлю автолиза (остатки 142-152), контур стабилизации оксианиона (остатки 184-194) и входную рамку S1 (остатки 216-223), все нумерация в соответствии с нумерацией химотрипсина (см. Blouse et al. (2009) J Biol Chem 284: 4647-4657; Hedstrom (2002) Chem Rev 102: 4501-4524; Huber and Bode (1978) Acc Chem Res 11: 114-122; Madison et al. (1993) Science 262: 419-421).

Структурные детерминанты для u-PA представлены в таблице 4 ниже с нумерацией на основе нумерации зрелого химотрипсина. Число под заголовками цикла Cys168-Cys182 и 60 указывает на количество аминокислот в петле между двумя аминокислотами и в петле. Обозначение "да" под заголовками Cys191-Cys220 указывает на наличие дисульфидногомостика.Эти области являются переменными в пределах семейства химотрипсиноподобныхсериновых протеаз и представляют собой структурные детерминанты сами. Модификация полипептида u-PA для изменения одной или более аминокислот в кармане S1-S4 влияет на специфичность или селективность полипептида u-PA для целевой подложки.

Расширенная субстратная специфичность (P1-P4) показывает, что u-PA имеет высокую специфичность к расщеплению после P1 Arg, предпочтение для малых аминокислот в положении P2, предпочтение для малых полярных аминокислот (Thr и Ser) в положении P3 и отсутствие предпочтения в положении P4 (Keetal. (1997) J Biol. Chem, 272: 16603-16609; Harris et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97: 7754-7759).

Таблица 4. Структурные детерминантыдля распадаu-PA (нумерация химотрипсина)

Остатки, определяющие специфичность													
S4					**S3**		**S2**			**S1**			
171	**174**	**180**	**215**	**Cys168 Cys182**	**192**	**218**	**99**	**57**	**60 петля**	**189**	**190**	**226**	**Cys191 Cys220**
H	S	M	W	15	Q	R	H	H	11	D	S	G	Да

3. Функция/активность

Активатор плазминогенаурокиназного типа представляет собой сериновую протеазу, которая катализирует гидролиз плазминогена в плазмин. Плазмин действует непосредственно на деградацию внеклеточных матричных белков (Andreasenetal (2000) cell. Моль. LifeSci.57: 25-40). u-PA играет важную роль в клеточной адгезии, миграции и инвазии, ремоделирования ткани и рака (Blasietal (2002) RevMolCellBiol 3: 932; Andreasenetal (2000) Cell. Mol. Life Sci 57 : 25-40; Mondino и Blasi (2004) Trends Immunol 25: 450; Ploug (2003) Curr Pharm Des 9: 1499).Аномальная экспрессия u-PA связана с ревматоидным артритом, аллергическим васкулитом, ксеродермией и инвазивной способностью злокачественных опухолей.

u-PA регулируется связыванием с высокоаффинным рецептором клеточной поверхности uPAR. Связывание u-PA с uPAR увеличивает скорость активации плазминогена и усиливает деградацию внеклеточного матрикса и инвазию клеток. Бинарный комплекс, образованный между uPAR и u-PA,

взаимодействует с ассоциированным с мембраной плазминогеном с образованием комплексов активации более высокого порядка, которые снижают Km (те кинетическую константу скорости приблизительного сродства к субстрату) при активации плазминогена (Bassetal.(2002) BiochemSocTrans. 30: 189-194).

Связывание u-PA с uPAR защищает протеазу от ингибирования узнающим ингибитором, те PAI -1. Это обусловлено тем, что одиночная цепь u-PA, обычно присутствующая в плазме, не подвержена ингибированию PAI -1, и любая активная u-PA в плазме ингибируется PAI -1. Activeu-PA, которая является связанной с рецептором, является полностью доступной для ингибирования PAI -1, однако PAI -1 не способен осуществлять доступ к связанной активной молекуле (Bassetal. (2002) BiochemSocTrans., 30: 189-194). В результате, u-PA, главным образом, функционирует на клеточной поверхности, и ее функции коррелированы с активацией плазмино-зависимого перицеллюлярного протеолиза.

u-PA также расщепляет фактор роста/разброса гепатоцитов (HGF/SF), латентную форму матриксной металлопротеазы типа 1 мембраны (MT-SP1; матриптазы), тромбоцитарный фактор роста C (PDGF-C), тромбоцитарный фактор роста D (PDGF-D), тромбоцитарный фактор роста DD (PDGF-DD) и другие белки (см. например, Hurstetal (2012) BiochemJ 441: 909-918; UstachandKim (2005) MolCellBiol 5: 6279-6288; Ehmanetal (2009) Oncogene 28 (4): 534-544). Плазмин разрушает фибриновые сгустки, расщепляет фибрин, фибронектин, тромбоспондин, ламинин и фактор фон Виллебранда, протелизирует медиаторы системы комплемента и активирует коллагенозы.По существу, плазмин участвует в тромболизисе или деградации внеклеточного матрикса, что связывает плазмин с сосудистыми заболеваниями и раком.

Например, компоненты системы активации плазминогена, как было обнаружено, сильно экспрессируется в злокачественных опухолях. Фактор роста/разбросагепатоцитов регулирует рост клеток, подвижность клеток и морфогенез путем связывания активированного HGF с HGF-рецептором c-Met и

его способностью стимулировать митогенез, подвижность клеток и инвазию матрикса к ангиогенезу, онкогенезу и регенерацию тканей.Тромбоцитарные факторы роста регулируют рост и деление клеток и играют важную роль в ангиогенезе, что, когда нерегулируется, является характеристикой рака. После активации протеолитическим расщеплением PDGF связывают рецепторные тирозинкиназыPGDF, приводящие к фосфорилированию, и ряду нисходящих сигнальных путей, вовлеченных в рак.Вследствие роли u-PA и вышеуказанных белков в сосудистых заболеваниях полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, изменяются таким образом, что они снижают избирательность к к этим белкам.

Благодаря изменениям их специфичности и активности, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, демонстрируют пониженную или отсутствие активности или отсутствие значительной активности на нативных субстратах и высокую активность по сравнению с немодифицированнойu-PA на белке C3 комплемента.В результате, при терапевтических дозировках, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, специфически ингибируют активацию комплемента, но не имеют или имеют только немногие побочные эффекты от расщепления природных u-PA-мишеней.

B. ИНГИБИРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА ПОСРЕДСТВОМ НАЦЕЛИВАНИЯ C3

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, проявляют повышенную специфичность и/или активность для ингибирующей последовательности расщепления в белке C3 комплемента по сравнению с u-PA, не содержащей аминокислотных модификаций (например, человека дикого типа u-PA (см. SEQIDNO: 1 или 3)) или его каталитического домена или его протеазного домена (см. SEQIDNO: 2) или соответствующих немодифицированных полипептидов u-PA, которые включают замену C122S, по нумерации химотрипсина.

Замена на S в остатке 122 не изменяет специфичность или активность C3, но уменьшает агрегацию. Поскольку C3 вовлечен в 3 пути инициации комплемента (см. например, фиг.1), нацеливание C3 протеолитическим ингибированием обеспечивает общую и широкую терапевтическую мишень для инактивации каскада комплемента. Расщепление инактивацией C3 блокирует терминальную активность комплемента, а также альтернативный путь амплификации.

Все три пути сходятся на C3 (см. например, фиг. 1).Благодаря способности ингибировать активацию комплемента, такие модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы для лечения различных заболеваний, состояний и патологий, связанных с активацией комплемента, таких как воспалительные ответы и аутоиммунные заболевания.

Активация комплемента связана с развитием заболеваний и состояний за счет стимулирования локального воспаления и повреждения тканей, вызванных частью генерации эффекторных молекул и комплекса мембранной атаки.В одном из примеров, таких как во многих аутоиммунных заболеваниях, комплемент продуцирует повреждение тканей, поскольку он активируется при несоответствующих обстоятельствах, таких как антитело к ткани хозяина. В других ситуациях комплемент может быть активирован нормально, например, септицемией, но все еще вносит вклад в прогрессирование заболевания, например, при респираторном дистресс-синдроме.

Патологически, комплемент может вызвать значительное повреждение кровеносных сосудов (васкулит), базальной мембраны почки и прикрепленных эндотелиальных и эпителиальных клеток (нефрит), синовиального сустава (артрит) и эритроцитов (гемолиз), если они не управляются надлежащим образом. Роль C3 в активации комплемента обсуждается более подробно ниже.

1. Белок комплемента C3 и его роль в инициировании комплемента

Система комплемента включает в себя более 30 растворимых и связанных с клеточной мембраной белков, которые функционируют не только в

опосредованном антителом иммунном ответе, но и в врожденном иммунном ответе для распознавания и уничтожения патогенов, таких как бактерии, инфицированные вирусом клетки и паразиты. Активация комплемента инициируется на поверхностях патогена посредством трех различных путей: классического пути, альтернативного пути и лектинового пути.

Эти пути отличаются тем, что компоненты, необходимые для их инициирования, различны, но пути в конечном счете формируют один и тот же набор эффекторных молекул (например, С3-конвертаз), которые расщепляют белок С3 комплемента для инициирования образования комплекса мембранной атаки МАС (см. например, фиг. 1). Таким образом, белок С3 комплемента является привлекательной мишенью для терапии, поскольку модуляция С3 приводит к модуляции различных опсонинов, анафилатоксинов и МАС. Кроме того, встречающиеся в природе белки-ингибиторы комплемента, включая фактор H (FH), CR1, рецептор комплемента Ig (CR1g), DAF и MCP ингибируют на уровне С3.

Существует три (3) пути активации комплемента (см. Фигуру 1, которая изображает эти пути). Пути комплемента различаются; каждый основан на различных молекулах и механизмах для инициации. Пути аналогичны тем, что они сходятся с образованием одного и того же набора эффекторных молекул, те С3-конвертаз.

В классических и лектиновых путях C4b2b действует как С3 конвертаза; в альтернативном пути C3bBb представляет собой С3 конвертазу (см. таблицу 5). Расщепление С3 генерирует C3b, который действует как опсонин и в качестве основной эффекторной молекулы системы комплемента для последующих реакций комплемента и С3а, который является пептидным медиатором воспаления.

Добавление C3b в каждую С3 конвертазу образует конвертазу С5, которая генерирует С5а и С5b. С5а, подобно С3а, представляет собой пептидный медиатор воспаления.С5b опосредует «поздние» события активации комплемента, инициирующие последовательность реакций, способствующих образованию комплекса мембранной атаки (МАС).

Несмотря на то, что три пути продуцируют различные конвертазы C3 и C5, все пути продуцируют расщепленные продукты C3 и C5 и образуют MAC. Альтернативно, C3 может расщепляться и активироваться примесными протеазами, такими как лизосомные ферменты и эластаза (MarkiewskiandLabrais (2007) AmJPathology 171: 715-727; RicklinandLabrais (2007) NatBiotechnol 25: 1265-1275).

Таблица 5. Каскады комплемента

	Альтернативный путь	**Классический путь**	**Лектиновый путь**
Активаторы	Молекулы поверхностного патогена, LPS, техоевая кислота, зимозан	связанные с антигеном IgMиIgG; неиммунные молекулы	Патогены посредством распознавания углеводов на поверхности
C3 конвертаза	C3bBb	C4b2b	C4b2b
C5 конвертаза	C3bBb3b	C4b2b3b	C4b2b3b
MAC	C5678poly9	C5678poly9	C5678poly9
анафилатоксины	C3a, C5a	C3a, C4a, C5a	C3a, C4a, C5a

a. Классический путь

C1q является первым компонентом классического пути комплемента. C1q представляет собой зависимый от кальция связывающий белок, связанный с семейством белков коллектина из-за общей общей структурной гомологии (Malhotraetal. (1994) ClinExpImmuno.97 (2): 4-9; Holmskovetal (1994) ImmunolToday 15 (2): 67-74). Коллектины, часто называемые молекулами распознавания образов, обычно функционируют в качестве опсонинов к целевым патогенам для фагоцитоза иммунными клетками. В отличие от

традиционных коллектинов, таких как MBL, карбоксиконцевой глобулярный домен распознавания C1q не обладает лектиновой активностью, но может служить в качестве незаряженной молекулы распознавания образов вследствие отмеченных различий в электростатическом поверхностном потенциале его глобулярных доменов (Gaboraudetal. (2003) JBiol. Chemie 278 (47): 46974-46982).

C1q инициирует классический путь комплемента двумя различными способами. Во-первых, классический путь активируется взаимодействием C1q с иммунными комплексами (те комплексы антиген-антитело или агрегированное антитело IgG или IgM), таким образом связывая опосредованный антителом гуморальный иммунный ответ с активацией комплемента.

Когда Fab-участок (вариабельная область) IgM или IgG связывает антиген, конформация Fc (константной) области изменяется, позволяя C1q связываться. C1q должен связывать по меньшей мере 2Fc-области, подлежащие активации. Однако C1q также может активировать комплемент в отсутствие антитела, тем самым функционируя при врожденном или немедленном иммунном ответе на инфекцию.

Помимо инициации антителом, активация комплемента также достигается взаимодействием C1q с неиммунными молекулами, такими как полианионы (бактериальные липополисахариды, ДНК и РНК), некоторые небольшие полисахариды, вирусные мембраны, С-реактивный белок (CRP), сывороточный амилоидный Р-компонент (SAP) и бактериальные, грибковые и вирусные мембранные компоненты.

C1q представляет собой часть C1-комплекса, которая содержит одну молекулу C1q, связанную с двумя молекулами, каждая из зимогенов C1r и C1s. Связывание более чем одного из глобулярных доменов C1q с целевой поверхностью (такой как агрегированное антитело или патоген) вызывает конформационное изменение в комплексе (C1r: C1s) 2, что приводит к активации C1r протеазы для расщепления C1s для получения активной сериновой протеазы.Активный C1s расщепляет последующие компоненты комплемента C4 и C2 с образованием C4b и C2b, которые вместе образуют C3

конвертазу по классическому пути. С3 конвертаза расщепляет С3 на С3в, который ковалентно присоединяется к поверхности патогена и действует как опсонин и С3а, который стимулирует воспаление. Некоторые молекулы С3b связываются с С4b2b комплексами, давая С4b2b3b, который представляет собой классическую каскадную С5 конвертазу. Таблица 6 суммирует белки, вовлеченные в классический путь комплемента.

Таблица 6. Белки классического пути

Нативный компонет	**Активная форма**	**Функция активной формы**
C1 (C1q:(C1r: C1s)$_2$)	C1q	Присоединяется непосредственно к поверхности патогена или непрямо к антителу, связанному с патогенами
	C1r	РасщепляетС1 до активной протеазы
	C1s	Расщепляет С4 и С2
C4	C4b	Присоединяется к патогену и действует как опсонин; присоединяетС2 для расщепления посредством С1
	C4a	Пептидный медиатор воспаления
C2	C2b	Активный фермент классического путиС3/С5 конвертазы; расщепляетС3 иС5
	C2a	Предшественник вазоактивного С2 кинина
C3	C3b	Присоединяется к поверностям патогена и действует как опсонин; инициирует амплификацию по альтернативному пути; присоединяетС5 для расщепления посредством С2b
	C3a	Пептидный медиатор воспаления

b. Альтернативный путь.

Альтернативный путь инициируется посторонними патогенами в отсутствие антитела. Инициирование комплемента по альтернативному пути происходит посредством самопроизвольного гидролиза C3 в C3b. Небольшое количество C3b всегда присутствует в жидкостях организма, из-за активности сыворотки и протеазной активности ткани. Клетки-хозяева обычно содержат высокие уровни мембранной сиаловой кислоты, которые инактивируют C3b, если он связывается, но бактерии содержат низкие уровни внешней сиаловой кислоты и, таким образом, связываются с C3b без инактивации его. C3b на поверхностях патогена распознается протеазой Factor B Фактор B расщепляется фактором D. Фактор D представляет собой только активирующую протеазу системы комплемента, которая циркулирует в качестве активного фермента, а не в качестве зимогена, но поскольку фактор b представляет собой только субстрат для фактора D, присутствие низких уровней активной протеазы в нормальной сыворотке, как правило, является безопасным для хозяина. Расщепление фактора B факторомD дает активный продукт Bb, который может ассоциироваться с C3b с образованием C3bBb, C3-конвертазы альтернативного пути. Подобно классическому пути, C3 конвертаза продуцирует больше C3b и C3a из C3. C3b ковалентно присоединяется к поверхности патогена и действует как опсонин и дополнительно инициирует альтернативный путь, тогда как C3a стимулирует воспаление. Часть C3bприсоединяет комплекс с образованием C3Bb3b, альтернативного пути C5-конвертазы.C3Bb3b стабилизируется с помощью пропердина или фактора P плазменного белка, который связывается с микробными поверхностями и стабилизирует конвертазу. Таблица 7 суммирует белки, вовлеченные в альтернативный путь комплемента.

Таблица 7. Белки альтернативного пути		
Нативный компонент	**Активная форма**	**Функция активной формы**

Таблица 7. Белки альтернативного пути		
Нативный компонент	**Активная форма**	**Функция активной формы**
C3	C3b	Присоединяется к поверхности патогена, присоединяетфактор Вдля расщеплениямфакторомD
Фактор B	Ba	Небольшой фрагмент фактора B, неизвестная функция
	Bb	Активный фермент C3 конвертазы иC5 конвертазы
Фактор D	D	Плазменная сериновая протеаза, расщепляетфакторВкогда он присоединяется к C3bкВаиBb
Фактор P (проперди н)	P	Плазменные белки с афинностью кC3bBbконвертазе на бактериальных клетках; стабилизирует конвертазу

c. Лектиновый путь

Лектиновый путь (также упоминаемый как путь MBL) инициируется после распознавания и связывания связанных с патогеном молекулярных паттернов

(PAMP; те углеводы) с помощью лектиновых белков. Примеры лектиновых белков, которые активируют лектиновый путь комплемента, включают лектин, связывающий маннозу (MBL) и фиколины (те L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин).

MBL является членом коллективного семейства белков и, таким образом, существует в виде олигомера субъединиц, состоящих из идентичных полипептидных цепей, каждая из которых содержит богатый цистеином, коллаген-подобный, шейку и углеводсодержащий или лектиновыйдомен.

MBL действует как молекула распознавания образов для распознавания углеводных фрагментов, в частности нейтральных сахаров, таких как манноза или N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) на поверхности патогенов через его глобулярный лектиновый домен зависимым от кальция способом.

MBL также действует как опсонин для облегчения фагоцитоза бактериальных, вирусных и грибковых патогенов посредством фагоцитарных клеток. Дополнительные инициаторы лектинового пути включают фиколины, включающие L-фиколин, M-фиколин и H-фиколин (см. например, Liuetal.(2005) JImmunol. 175: 3150-3156). Аналогично MBL, фиколины распознают углеводные фрагменты, такие как, например, N-ацетилглюкозамин и маннозные структуры.

Активация альтернативного пути MBL или фиколинами аналогична активации классического пути C1q, в результате чего одна молекула лектина взаимодействует с двумя протеазными зимогенами. В случае лектиновых белков зимогены представляют собой MBL-ассоциированные сериновые протеазы, MASP -1 и MASP -2, которые тесно гомологичнызимогенам C1r и C1s классического пути.При распознавании PAMP с помощью лектинового белка, например, путем связывания с поверхностью патогена, MASP -1 и MASP -2 активируются для расщепления C4 и C2 с образованием каскада каскадаMBL C3 конвертазы. После этого C3b присоединяется к комплексу для образования каскада конвертазыMBLC5.

Активация MASP вовлечена не только в ответ на микроорганизмы, но в любой ответ, который включает воздействие нейтральных сахаров, включая, но не ограничиваясь этим, повреждение тканей, такое как наблюдаемое в трансплантатах органов. Подобно альтернативному каскаду, каскад MBL активируется независимо от антитела; подобно классическому каскаду, каскад MBL использует C4 и C2 с образованием C3 конвертазы. В таблице 8 суммированыбелки, вовлеченные в лектиновыйпутькомплемента.

Таблица 8. Белки лектинового пути

Нативный компонент	Активная форма	Функция активной формы
MBL	MBL	Распознает PAMP, на поверхностях патогена (т.*е.*, посредством распознавания углеводов)
Фиколины	L-фиколин; M-фиколин, orH-фиколин	Распознает PAMP, на поверхностях патогена (т.*е.*, посредством распознавания углеводов)
MASP-1	MASP-1	Расщепляет C4 и C2
MASP-2	MASP-2	Расщепляет C4 и C2

d. Опосредованные комплементом эффекторные функции

Независимо от того, какой путь инициации используют, конечным результатом является образование активированных фрагментов белков комплемента (например, C3a, C4a и C5a анафилатоксины и C5b -9 мембранные комплексы атаки), которые действуют как эффекторные молекулы для того, чтобы опосредовать различные эффекторные функции.

Распознавание эффекторных молекул комплемента клетками для инициации эффекторных функций (например, хемотаксиса и опсонизации) опосредуется разнообразной группой рецепторов комплемента. Рецепторы комплемента распределены в широком диапазоне типов клеток, включая эритроциты, макрофаги, b-клетки, нейтрофилы и тучные клетки. При связывании компонента комплемента с рецептором рецепторы инициируют внутриклеточный сигнальный каскад, что приводит к ответам клеток, таким как стимулирующий фагоцитоз бактерий и секретирующие воспалительные молекулы из клетки.

Например, рецепторы CR1 и CR2 комплемента, которые распознают C3b, C4b, и их продукты важны для стимуляции хемотаксиса. CR3 (CD11b/CD18) и CR4 (CD11c/CD18) являются интегринами, которые аналогично являются важными в

фагоцитарных реакциях, но также играют роль в адгезии и миграции лейкоцитов в ответ на iC3b. Рецепторы C5a и C3a представляют собой связанные cG-белком рецепторы, которые играют роль во многих провоспалительно-опосредованных функциях C5a и C3a анафилатоксинов. Например, рецепторы C3a, C3aR, существуют на тучных клетках, эозинофилах, нейтрофилах, базофилах и моноцитах и непосредственно вовлечены в провоспалительные эффекты C3a.

Таким образом, через рецепторы комплемента эти фрагменты эффекторных молекул комплемента опосредуют несколько функций, включая хемотаксис лейкоцитов, активацию макрофагов, проницаемость сосудов и клеточный лизис (Frank, M. andFries, L. Complement. InPaul, W. (ed.) FundamentalImmunology, RavenPress, 1989).Краткое описание некоторых эффекторных функций продуктов комплемента приведено в таблице 9.

Таблица 9: Эффекторные молекулы комплемента и функции

Продукт	**Активность**
C2b (прокинин)	накопление жидкости тела
C3a (анафилатоксин)	базофильная и клеточная дегрануляция; повышенная васкулярная проницаемость; мышечное сжатие; индукция суппрессорныхТклеток
C3b и его продукты	опсонизация; активация фагоцитов
C4a (анафилатоксин)	базофильная и клеточнаяактивация; мышечное сжатие; повышеннаяваскулярная проницаемость
C4b	опсонизация
C5a (анафилатоксин; хемотактический фактор)	базофильная и клеточная дегрануляция; повышенная васкулярная проницаемость; мышечное сжатие;хемотаксис; агрегация нейрофилов; стимуляция окислительного метаболизма,индукция хелперныхТ-клеток
C5b67	хемотаксис; присоединение к другим клеточным мембранам и лизис клеток

C5b6789 (C5b-9)	лизис целевых клеток

i. Опосредованный комплементом лизис: Комплекс мембранной атаки

Конечная стадия каскада комплемента по всем трем путям представляет собой образование комплекса мембранной атаки (MAC) (фиг. 1). C5 может расщепляться любой C5 конвертазой в C5a и C5b. C5b соединяется с C6 и C7 в растворе, и C5b67 комплекс связывается с липидной мембраной патогена посредством гидрофобных участков на C7. C8 и несколько молекул C9, которые также имеют гидрофобные участки, соединяются с образованием комплекса мембранной атаки, также называемого C5b6789 или C5b -9.C5b -9 образует поры в мембране, через которую может проходить вода и растворенные вещества, что приводит к осмотическому лизису и гибели клеток. Если комплемент активируется на антиген без липидной мембраны, к которой может прикрепляться C5b67, комплекс C5b67 может связываться с близлежащими клетками и инициировать лизис. Единственный MAC может лизировать эритроцит, но ядросодержащие клетки могут энтоцитозироватьMAC и восстановить повреждение, если присутствует несколько MAC. Грамотрицательные бактерии, с их открытой внешней мембраной и оболочечными вирусами, как правило, восприимчивы к лизису, опосредованному комплементом. Менее восприимчивыми являются грамположительные бактерии, плазменная мембрана которых защищена их толстым пептидогликановым слоем, бактерии с капсулой или слоем вокруг их клеточной стенки, или вирусы, которые не имеют липидной оболочки. Аналогично, MAC может быть разрушен белками, которые связываются с комплексом до введения к мембране, такими как стрептококковый ингибитор комплемента (SIC) и кластерин. Как правило, MAC помогает уничтожать грамотрицательные бактерии, а также клетки человека, отображающие чужеродные антигены (инфицированные вирусом клетки, опухолевые клетки и тд), вызывая их лизис, а также может повредить оболочку оболочечных вирусов.

ii. Воспаление

Воспаление представляет собой процесс, в котором кровеносные сосуды становятся более проницаемыми, таким образом позволяя клеткам защиты организма и защитным химическим веществампокинуть кровь и проникать в ткани. Активация комплемента приводит к образованию нескольких провоспалительных медиаторов, таких как C3a, C4a и C5a. Интактные анафилатоксины в сыворотке или плазме быстро превращаются в более стабильную, менее активную C3a-desArg, C4a-desArg или C5a-desArg форму, с помощью карбоксипептидазыN. C3a, C4a и C5a и в меньшей степени их производные desArg являются сильными биологически активными полипептидами, называемыми анафилатоксинами из-за их воспалительной активности.Анафилатоксины связываются с рецепторами на различных типах клеток для стимуляции сокращения гладкой мускулатуры, увеличения проницаемости сосудов и активации тучных клеток для высвобождения медиаторов воспаления.

C5a, наиболее мощный анафилатоксин, главным образом, действует на белые клетки крови, в частности нейтрофилы.C5a стимулирует прилипание лейкоцитов к стенкам кровеносного сосуда в месте инфекции путем стимуляции повышенной экспрессии молекул адгезии таким образом, что лейкоциты могут выдавливаться из кровеносных сосудов и в ткани, процесс, называемый диапедез. C5a также стимулирует нейтрофилы для получения активных форм кислорода для внеклеточного уничтожения, протеолитических ферментов и лейкотриенов. C5a также может усиливать воспалительный процесс косвенно посредством индуцирования продуцирования хемокинов, цитокинов и других провоспалительных медиаторов. C5a также взаимодействует с клетками для высвобождения вазодилататоров, таких как гистамин, так что кровеносные сосуды становятся более проницаемыми.

C3a также взаимодействует с белыми клетками крови, с основными эффектами эозинофилов, свидетельствующих о роли для C3a при аллергическом воспалении. C3a индуцирует плавное сокращение мышц, повышает проницаемость сосудов и вызывает дегрануляцию базофилов и высвобождение гистамина и других вазоактивных веществ. C2a может быть превращен в C2 кинин, который регулирует кровяное давление, вызывая расширение кровеносных сосудов.

Хотя технически не рассматривается анафилатоксин, iC3b, неактивное производное C3b, функционирует для индуцирования адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов и индуцирует продуцирование провоспалительного цитокина IL -1 посредством связывания с его рецепторами интегрина клеточной поверхности. C5b -9 также косвенно стимулирует адгезию лейкоцитов, активацию и хемотаксис, индуцируя экспрессию молекул клеточной адгезии, таких как E-селектин, и индуцирования секреции интерлейкина -8 (Bholeetal. (2003) CritCareMed 31 (1): 97-104). C5b -9 также стимулирует высвобождение вторичных медиаторов, которые вносят вклад в воспаление, таких как, например, простагландин E2, лейкотриен в4 и тромбоксан.

Превращение компонентов C3 и C5 комплемента человека с получением соответствующих продуктов анафилатоксина участвует в определенных природных патологических состояниях, включая: аутоиммунные расстройства, такие как системная красная волчанка эритема, ревматоидный артрит, злокачественная опухоль, инфаркт миокарда, ретинопатия Пуртшера, сепсис и синдром взрослого респираторного дистресса. Повышенные циркулирующие уровни C3a и C5a были обнаружены в определенных условиях, связанных с ятрогенной активацией комплемента, такими как: сердечно-легочная шунтирующая хирургия, почечный диализ и лейкафорез нейлонового волокна.

iii. Хемотаксиз

Хемотаксис представляет собой процесс, с помощью которого клетки мигрируют в ответ на химические вещества в их среде. В иммунном ответе множество хемокинов направляет движение клеток, таких как фагоцитарные

клетки, к сайтам инфекции. Например, C5a является основным хемотаксическим фактором для циркулирующих нейтрофилов, но также может индуцировать хемотаксис моноцитов.Фагоциты двигаются в сторону увеличения концентраций C5a и впоследствии прикрепляются через свои рецепторы CR1 к молекулам C3b, прикрепленным к антигену. Хемотаксический эффект C5a, наблюдаемый с базофилами, эозинофилами, нейтрофилами и мононуклеарными фагоцитами, активен при концентрациях, таких как 10^{-10}M.

iii. Опсонизация

Важным действием комплемента является облегчение захвата и разрушения патогенов фагоцитарными клетками. Это происходит посредством процесса, называемого опсонизацией, посредством чего компоненты комплемента, связанные с целевыми бактериями, взаимодействуют с рецепторами комплемента на поверхности фагоцитарных клеток, таких как нейтрофилы или макрофаги. В этом случае молекулы эффекторов называются опсонинами. Опсонизация патогенов является основной функцией C3b и C4b. iC3b также функционирует в качестве опсонина.C3a и C5a увеличивают экспрессию рецепторов C3b на фагоцитах и повышают их метаболическую активность.C3b и, в меньшей степени, C4b помогают удалять вредные иммунные комплексы из организма. C3b и C4b прикрепляют иммунные комплексы к CR1 рецепторам на эритроцитах. Затем эритроциты доставляют комплексы к фиксированным макрофагам в селезенке и печени дляразрушени. Иммунные комплексы могут приводить к вредной гиперчувствительности III типа.

v. Активация гуморального иммунного ответа

Активация B-клеток требует лигирования B-клеточного рецептора (BCR) антигеном. Однако было показано, что комплемент играет роль в снижении порога для B-клеточных ответов на антиген до 1000 раз. Это происходит посредством связывания C3d или C3dg, продуктов комплемента, полученных из фрагментов распада C3, с рецепторами CR2 на B-лимфоцитах, которые могут совместно лигировать с BCR. Совместное лигирование происходит, когда

антигенные частицы, такие как, например, иммунные комплексы, опсонизированы с C3d, связывают рецептор CR2 через C3d, а также BCR через антиген. Совместное лигирование комплексов антигена также может происходить, когда C3d связывается с антигенами, усиливающими их поглощение антиген предоставляющими клетками, такими как дендритные клетки, которые затем могут представлять антиген в В-клетки для усиления ответа антитела. Мыши с дефицитом CR2 проявляют дефекты в функции В-клеток, что приводит к снижению уровней естественного антитела и нарушении гуморальных иммунных ответов.

2. C3 – Структура и функция

Вариантные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, расщепляют белок C3 комплемента или его протеолитические фрагменты, тем самым ингибируя комплемент. Белок C3 комплемента человека (UniprotAccessionnoP01024) представляет собой одноцепочечный препропротеинс 1663 аминокислотами, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQIDNO: 47. Белок кодируется геном 41kb , расположенным на хромосоме 19 (нуклеотидная последовательность, приведенная в SEQIDNO: 46).”Этот пре-белок содержит 22 аминокислотный сигнальный пептид (аминокислоты 1-22 SEQIDNO: 47) и последовательность тетра-аргинина (аминокислоты 678-681 SEQIDNO: 47), которую удаляют фуранодобным ферментом, в результате чего образуется зрелый двухцепочечный белок, содержащий бета-цепь (аминокислоты 23-667 SEQIDNO: 47) и альфа-цепь (аминокислоты 672-1663 SEQIDNO: 47), которые связаны между собой дисульфидной связью между аминокислотными остатками Cys559 и Cys816.Зрелый белок 2 цепи имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQIDNO: 77.

Во время каскада комплемента белок C3 комплемента дополнительно обрабатывают протеолитическим расщеплением с образованием различных C3-протеолитических фрагментов. Как описано выше, все три пути инициации комплемента сходятся на C3 конвертазахC4b2b и C3bBb. C3-конвертазы

расщепляют C3 между остатками 748 и 749 SEQIDNO: 47 (см. таблицу 10 ниже), генерирующую анафилатоксин C3a (аминокислоты 672-748 SEQIDNO: 47) и опсонин C3b (C3в альфа- цепь; аминокислоты 749-1663 SEQIDNO: 47).C3a участвует в воспалении и C3b образует C5 конвертазы, в конечном счете приводящие к C5a анафилатоксину и MAC. Вариантные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, ингибируют комплемент, и, таким образом, не расщепляют C3 на этом сайте расщепления GLAR.

C3b имеет сайты связывания для различных компонентов комплемента, включая C5, пропердин (P), факторы H, B и I, рецептор комплемента 1 (CR1) и мембранный кофактор (MCP) (см. SahuandLabrais (2001) ImmunologicalReviews 180: 35-48). Связывание фактора I, плазменной протеазы, в присутствии кофакторов H, CR1 и MCP приводит к инактивации C3b, тогда как связывание Фактор I расщепляет c3b в присутствии кофакторов между остатками 1303-1304, 1320-1321 и 954-955 SEQIDNO: 47 (см. таблицу 10 ниже), генерируя фрагменты iC3b (аминокислоты 749-1303 SEQIDNO: 47) и C3f (аминокислоты 1304-1320 SEQIDNO: 47).

Затем фактор I расщепляет iC3b, генерирующий C3c (C3сальфа- цепь, фрагмент 1; аминокислоты 749-954 SEQIDNO: 47) и c3dg (аминокислоты 955-1303 SEQIDNO: 47).Конечный результат состоит в том, чтоC3b постоянно инактивирован (см. SahuandLabrais (2001) ImmunologicalReviews 180: 35-48). Поскольку фактор I инактивирует C3b, сайты расщепления фактора I являются кандидатами на расщепление вариантными полипептидами u-PA, представленными в настоящем документе. Дополнительные протеолитические фрагменты C3b включают C3g (аминокислоты 955-1001 SEQIDNO: 47), C3d (аминокислоты 1002-1303 SEQIDNO: 47) и фрагмент 2 альфа-цепи C3c (аминокислоты 1321-1663 SEQIDNO: 47).

Последовательности расщепления в белке C3 комплемента представлены в таблице 10 ниже, которая перечисляет остатки P4-P1, аминокислотные остатки сайта расщепления (сайт P1-P1') и протеазу, ответственную за расщепление. Модифицированные u-PA полипептиды, представленные в настоящем документе, не расщепляются на этих сайтах.

Таблица 10: Последовательности расщепления белка комплемента C3			
P4-P1 остатки	**Сайт расщепления (вSEQIDNO:47) Между остатками**	**Протеаза**	**SEQ ID NO.**
GLAR	748-749	C3 конвертаза	78
RLGR	954-955	Фактор I	79
LPSR	1303-1304	Фактор I	80
SLLR	1320-1321	Фактор I	81

a. C3a

C3a (аминокислоты 672-748 SEQIDNO: 47) представляет собой анафилатоксин, который вовлечен в воспаление, дегрануляцию базофилов и тучных клеток, повышенную проницаемость сосудов, сокращение гладких мышц и индукцию суппрессорных Т-клеток.

b. C3b

C3b (аминокислоты 749-1663 SEQIDNO: 47) имеет различные роли в каскаде комплемента. C3b является опсонином, который облегчает поглощение и уничтожение патогенов фагоцитарными клетками. Кроме того, C3b соединяется с C3 конвертазами, чтобы сгенерировать C5 конвертазы, которые активируют белок C5, таким образом генерируя C5a анафилатоксин и C5b, который соединяется с C6, C7, C8 и C9 с образованием комплекса мембранной атаки. Кроме того, как описано в разделе 1b выше, C3b вовлечен в альтернативный путь инициации комплемента. C3b регулируется регуляторным белком I комплемента, плазменной протеазой, которая расщепляет C3b на различные фрагменты, включая iC3b, C3c, C3d, C3f и C3dg тем самым постоянно инактивируя C3b.

C3b играет решающую роль в эффекторных функциях, опосредованных комплементом, благодаря своей способности связываться с C3 конвертазамиC4b2b и C3bBb, тем самым генерируя C5 конвертазыC4b2b3b и C3bBb3b. C5-конвертазы расщепляют зимоген C5 на его активные фрагменты, а именно C5a анафилатоксин и C5b. C5a вовлечен в хемотаксис и воспаление и C5b вовлечен в образование MAC.

c. ИнгибиторыC3b

C3b имеет сайты связывания для различных компонентов комплемента, включая C5, пропердин (P), факторы H, B и I, рецептор комплемента 1 (CR1) и мембранный кофактор (MCP) (см. SahuandLabrais (2001) ImmunologicalReviews 180: 35-48). Связывание фактора I, плазменной протеазы, в присутствии кофакторов H, CR1 и MCP приводит к инактивации C3b, тогда как связывание факторов B и P в присутствии фактора D приводит к усилению C3-конвертазы и инициации MAC.Фактор I расщепляет C3b в присутствии кофакторов между остатками 1303-1304, 1320-1321 и 954-955 SEQIDNO: 47, генерирующими фрагменты iC3b (аминокислоты 749-1303 SEQIDNO: 47) и C3f (аминокислоты 1304-1320 SEQIDNO: 47).

Хотя технически не рассматривается анафилатоксин, iC3b, неактивное производное C3b, функционирует для индуцирования адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов и индуцирует продуцирование провоспалительного цитокина IL -1 посредством связывания с его рецепторами интегрина клеточной поверхности. Белок iC3b функционирует как опсонин.Затем фактор I расщепляет iC3b, генерируя фрагменты C3c (C3c альфа- цепи фрагмент 1: аминокислоты 749-954 SEQ ID NO: 47 и C3c альфа- цепи фрагмент 2: аминокислоты 1321-1663 SEQ ID NO: 47) и C3dg (аминокислоты 955-1303 SEQ ID NO: 47). Конечный результат состоит в том, что c3b постоянно инактивирован (см. SahuandLamilis (2001)*ImmunologicalReviews* 180:35-48). C3dg можно дополнительно расщеплять для получения фрагментов C3g (аминокислоты 955-1001 SEQIDNO: 47) и C3d (аминокислоты 1002-1303 SEQIDNO: 47).

D.МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ U-PA, КОТОРЫЕ РАСЩЕПЛЯЮТ C3

В настоящем документе предложены модифицированные или вариантные полипептиды активатора плазминогенаурокиназного типа (u-PA). Также предложены конъюгаты, такие как слитые белки, которые содержат модифицированные полипептиды u-PA, так что полученные в результате активированные формы расщепляют C3. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, проявляют измененную активность или свойства по сравнению с полипептидом дикого типа, нативным или эталонным полипептидом u-PA.

Например, полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, содержат модификации по сравнению с полипептидом дикого типа, нативным или опорным полипептидом u-PA, представленным в любом из SEQIDNO: 1-6, или в полипептиде, который имеет по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, особенно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQIDNO: 1-6, такой как эталонный протеазный домен u-PA в SEQIDNO: 5. Среди модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, имеются те, которые оказывают ингибируют активацию комплемента посредством ингибирующего расщепления белка C3 комплемента. Сюда включены те, которые производят ингибирующее расщепление C3 с большей активностью или специфичностью, Kcat/Km, по сравнению с соответствующей формой u-PA, которая не содержит модификацию (замена, делеция и/или вставка) или по сравнению с соответствующей формой немодифицированнойu-PA, последовательности которой указаны в любой из SEQIDNO: 1-6.Модифицированные полипептиды u-PA также могут иметь пониженную специфичность и/или селективность по субстратам и мишеням, расщепленным или распознаваемым немодифицированнымu-PA, включая расщепление плазминогена и/или связывание с uPAR, по сравнению с

соответствующим u-PA полипептидом, не содержащим аминокислотную модификацию(и).

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, ингибируют или инактивируют комплемент посредством ингибирования или инактивации путем расщепления белка C3 комплемента. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, ингибируют или инактивируют комплемент путем расщепления белка C3 комплемента в сайте расщепления, что приводит к ингибированию или инактивации C3.Инактивация или ингибирование расщеплением белка C3 комплемента может быть в любой последовательности в C3 до тех пор, пока результирующее расщепление C3 приводит к инактивации или ингибированию активации комплемента.

Поскольку модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, ингибируют активацию комплемента, модифицированные полипептиды u-PA не влияют на расщепление зимогенной формы C3, чтобы сгенерировать активированные фрагменты C3a и C3b.Таким образом, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, не расщепляют C3 между остатками 748-749 SEQIDNO: 47, что приводит к образованию C3a и C3b. Ингибирующие или инактивирующие сайты расщепления белка C3 комплемента могут быть эмпирически определены или идентифицированы. При необходимости модифицированный полипептид u-PA может быть протестирован на его способность ингибировать комплемент, как описано в разделе E ниже и как показано в примерах.

Модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе, катализируют ингибирующее или инактивирующее расщепление белка C3 комплемента. Модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе, расщепляют белок C3 комплемента в любой последовательности расщепления до тех пор, пока полученные C3 фрагменты не активны или не способны активировать опосредованную комплементом эффекторную функцию.

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, имеют измененные (т.е., сниженные) специфичности и/или селективности для природных мишеней u-PA, включая плазминоген и uPAR. В одном примере модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают пониженной специфичностью для расщепления плазминогена. В другом примере модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают пониженной селективностью для связывания с uPAR.

В некоторых примерах модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают пониженной специфичностью для расщепления плазминогена и пониженной селективностью для связывания с uPAR.В других примерах модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают повышенной специфичностью для расщепления белка C3 комплемента и пониженной специфичностью для расщепления плазминогена. В других примерах модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают повышенной селективностью для белка C3 комплемента и пониженной селективностью для плазминогена и/или uPAR.

Модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе и описанные в примерах, представляют собой, например, выделенные протеазные домены u-PA. Меньшие части их, которые сохраняют протеазную активность, также рассматриваются. Модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе, представляют собой мутанты домена протеазы u-PA, в частности модифицированные полипептиды u-PA, в которых остаток Cys в протеазном домене, который свободен (те, не образует дисульфидных связей с любым другим остатком Cys в белке) замещен посредством другой аминокислотной замены, предпочтительно консервативной аминокислотной замены или замены, которая не устраняет активность, такую как, например, замена серином, и модифицированные полипептиды u-PA, в которых устранены сайт (ы) гликозилирования.

Также рассматриваются модифицированные полипептиды u-PA, в которых сохраняются другие консервативные аминокислотные замены, в которых сохраняется каталитическая активность (см. например, таблицу 3, например, аминокислотные замены).

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, содержат одну или несколько модификаций аминокислот, так что они расщепляют белок C3 комплемента таким образом, что приводит к инактивации или ингибированию комплемента.

Модификации могут представлять собой одну аминокислотную модификацию, такую как одиночные аминокислотные замены ,инсерции или делеции, или множественные аминокислотные модификации, такие как множественные аминокислотные замены, инсерции или делеции.

Примеры модификаций представляют собой аминокислотные замены, включая однократные или множественные аминокислотные замены. Замена аминокислоты может представлять собой консервативное замещение, такое как изложено в таблице 3, или неконсервативное замещение, такое как любое описанное здесь. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере или 1,2,3, 4,5,6, 7,8,9, 10,11,12, 13,14,15, 16,17,18, 19, 20 или более модифицированных положений по сравнению с полипептидом u-PA, не содержащим модификацию.

Модификации, описанные в данном документе, могут быть сделаны в любом полипептиде u-PA. Например, модификации могут быть выполнены в человеческом u-PA полипептиде, имеющем последовательность аминокислот, включая или представленную в SEQIDNO: 1, SEQIDNO: 2, SEQIDNO: 3, SEQIDNO: 4, SEQIDNO: 5 или SEQIDNO: 6, или их аллельные варианты; полипептид u-PA мыши, имеющий последовательность аминокислот, включая или изложенную в SEQIDNO: 52 или 66; полипептид u-PA крысы, имеющий последовательность аминокислот, включающую в себя или изложено в SEQIDNO: 53 или 67; полипептид u-PA коровы, имеющий последовательность аминокислот, включая или представленный в SEQIDNOS: 54 или 68; полипептид u-PA свиньи, имеющий последовательность аминокислот, включая

или изложенную в SEQIDNOS: 55 или 69; полипептид u-PA кролика, имеющий последовательность аминокислот, включая или изложенную в SEQIDNO: 56 или 70; полипептид куриный u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включая или представленную в SEQIDNO: 57 или 71; полипептид, имеющий последовательность аминокислот, включающую или приводимую в SEQIDNO: 58 или 72; полипептид орангутанга Суматры u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включающую в себя или изложено в SEQIDNOS: 59 или 73; полипептид u-PA собаки, имеющий последовательность аминокислот, включая или изложенную в SEQIDNO: 60 или 74; полипептид u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включающую в себя или представленный в SEQIDNO: 61 или 75; полипептид мамора u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включающую в себя или изложенный в SEQIDNO: 62; полипептид обезьяны u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включающую в себя или изложенный в SEQIDNO: 63; полипептид гиббона u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включая или изложенную в SEQIDNO: 64; и полипептид шимпанзе u-PA, имеющий последовательность аминокислот, включая или изложено в SEQIDNO: 65; или варианты последовательности или каталитически активные фрагменты, которые проявляют по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из SEQIDNO: 1-6 и 52-75.

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть модифицированы в любой области или домене полипептида u-PA, предусмотренного здесь, до тех пор, пока модифицированный u -PA полипептид сохраняет свою способность к инактивации или ингибированию расщепления белка C3 комплемента. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут представлять собой одноцепочечные или двухцепочечные полипептиды, видовые варианты, аллельные варианты, изоформы или их каталитически активные фрагменты, такие как, например, их протеазная область. Полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе, могут представлять собой

полноразмерные или усеченные полипептиды u-PA.Модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе, могут представлять собой протеазную область u-PA или модифицированную форму протеазного домена u-PA

Предполагаемыми для использования в настоящем документе являются зимоген, прекурсор или зрелые формы модифицированных полипептидов u-PA, при условии, что полипептиды u-PA сохраняют свою способность подавлять расщепление или инактивацию белка C3 комплемента. Модификации полипептида u-PA также могут быть внесены в полипептид u-PA, который также содержит другие модификации, включая модификации первичной последовательности и модификации, не находящиеся в первичной последовательности полипептида.Например, модификация, описанная в настоящем документе, может представлять собой полипептид u-PA, который является слитым полипептидом или химерным полипептидом. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, также включают полипептиды, которые конъюгированы с полимером, таким как ПЭГ-реагент.

Для целей настоящего изобретения ссылка на положения и аминокислоты для модификации, включая замену или замены аминокислот, в данном документе относится к полипептиду u-PA, представленному в любой из SEQIDNO: 1-6. В пределах уровня специалиста в данной области техники сделать любую из модификаций, представленных в данном документе в другом полипептиде u-PA, путем идентификации соответствующего аминокислотного остатка в другом полипептиде u-PA, таком как полипептид u-PA, представленный в любой из SEQIDNO: 1-6 или его вариант, который характеризуется по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с полипептидом u-PA, изложенным в любой из SEQIDNO: 1-6. Соответствующие положения в другом полипептиде u-PA можно идентифицировать путем выравнивания (сравнения) полипептида u-PA с контрольным полипептидом u-PA, изложенным в любой из SEQIDNO: 1-6. Для

целей модификации (например,замены аминокислот), соответствующий аминокислотный остаток может представлять собой любой аминокислотный остаток и не обязательно идентичен остатку, представленному в любой из SEQIDNO: 1-6.

Обычно соответствующий аминокислотный остаток, идентифицированный посредством выравнивания (сравнения) с, например, остатками в SEQIDNO: 5, представляет собой аминокислотный остаток, который идентичен SEQIDNO: 5, или представляет собой консервативный или полуконсервативный аминокислотный остаток. Также следует понимать, что приведенные здесь примерные замены могут быть сделаны в соответствующем остатке в полипептиде u-PA, таком как протеазная область u-PA, при условии, что замена отличается от того, что существует в немодифицированной форме полипептида u-PA, такого как домен протеазы u-PA. На основе этого описания и описания где-либо в другом месте настоящего документа, в пределах уровня специалиста в данной области техники получить модифицированный полипептид u-PA, содержащий любую одну или более из описанных мутаций, и тестировать каждое из свойств или активности, как описано в настоящем документе.

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, изменяют активность комплемента посредством ингибирования протеолиза или инактивации белка C3 комплемента. Кроме того, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают пониженной специфичностью для расщепления плазминогена и/или связывания с uPAR. Например, модифицированные u-PA полипептиды, предложенные в настоящем документе, демонстрируют менее 100% активности дикого типа полипептида u-PA для расщепления плазминогена, т.е. менее 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или менее активности для расщепления плазминогена дикого типа или эталонного полипептида u-PA, такого как соответствующий полипептид, не содержащий аминокислотную модификацию.

В другом примере модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, демонстрируют менее 100% связывающей активности полипептида u-PA дикого типа для uPAR, т.е. менее 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или менее активности для связывания с uPAR дикого типа или эталонного полипептида u-PA, такого как соответствующий полипептид, не содержащий аминокислотную модификацию.

В настоящем документе также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют любые модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе. В некоторых примерах кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, также могут быть модифицированы чтобы они содержали гетерологичную сигнальную последовательность для изменения (например, увеличения) экспрессии и секреции полипептида.

Модифицированные полипептиды u-PA и кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, предложенные в настоящем документе, могут быть получены или выделены любым способом, известным в данной области, включая выделение из природных источников, выделение рекомбинантно продуцируемых белков в клетках, тканях и организмах, и рекомбинантными способами и способами, включающими в себя стадии *insilico*, синтетические способы и любые способы, известные специалистам в данной области техники.

Модифицированные полипептиды и кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем документе, могут быть получены стандартными методами рекомбинантной ДНК, известными специалисту в данной области техники. Любой способ, известный в данной области техники, для осуществления мутации любой одной или более аминокислот в целевом белке может быть использован.

Способы включают стандартный сайт-направленный или случайный мутагенез кодирующих молекул нуклеиновой кислоты или способы синтеза полипептида твердой фазы.Например, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид u-PA, могут быть подвергнуты мутагенезу, такому как случайный мутагенез кодирующей нуклеиновой кислоты, подверженный ошибкам ПЦР,

сайт-направленный мутагенез, перекрывание ПЦР, перестановка генов или другие рекомбинантные способы.

Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды, затем может быть введена в клетку-хозяина, которая должна экспрессироваться гетерологично. Следовательно, в настоящем документе также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любой из модифицированных полипептидов, представленных в данном документе.В некоторых примерах модифицированные полипептиды u-PA получают синтетически, например, с использованием твердофазного или жидкофазного пептидного синтеза. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть представлены в векторах генной терапии, таких как векторы AAV или аденовируса, для экспрессии кодируемого модифицированного полипептида u-PAinvivo, например, в глазу или для системного введения. Кодируемый полипептид u-PA может представлять собой полноразмерный полипептид или протеазную область или другую форму, которая является активной или которая может быть активирована.

Полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, были модифицированы, чтобы иметь повышенную специфичность и/или селективность для расщепления ингибирующей или инактивирующей последовательности расщепления белка C3 комплемента. Полипептиды u-PA могут быть модифицированы любым способом, известным в данной области техники для модификации белков. Такие способы включают сайт-направленный и случайный мутагенез.

Анализы, такие как анализы биологической функции активации комплемента, предусмотренные в данном документе и известные в данной области, могут быть использованы для оценки биологической функции модифицированного полипептида u-PA для определения, нацелен ли модифицированный полипептид u-PA на белок C3 комплемента для расщепления и инактивации. В настоящем документе представлены примеры способов идентификации полипептида u-PA и модифицированных полипептидов u-PA.

1. Примеры модифицированных полипептидов u-PA

В настоящем документе предложены модифицированные полипептиды u-PA, которые содержат одну или более, включая 2,3,4, 5,6,7, 8,9,10, 11,12,13, 14, 15 и более аминокислотных модификации в полипептиде u-PA и которые расщепляют белок C3 комплемента, так что комплемент ингибируется или инактивируется. Модификации находятся в первичной аминокислотной последовательности и включают замены, делеции и вставки аминокислотных остатков.

Модификация изменяет специфичность/активность полипептида u-PA, когда он находится в активной форме. Модифицированные полипептиды u-PA в данном документе выбраны для распознавания и расщепления участка-мишени в белке комплемента, в частности C3, для его инактивации.

Они также могут быть дополнительно модифицированы и подвергнуты скринингу, чтобы иметь пониженную специфичность/активность в субстратах invivo, таких как плазминоген. Они могут быть выбраны и идентифицированы любым подходящим способом.Модифицированные полипептиды u-PA первоначально были идентифицированы с использованием способа скрининга, описанного в патенте США № 8,211,428, в котором библиотека модифицированных протеаз взаимодействует с когнатом или другим ингибирующим серпином, который модифицирован так, чтобы включать последовательность-мишень в петле реактивного сайта для захвата модифицированных протеаз, которые могли бы расщеплять такую мишень.

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, проявляют повышенную активность или специфичность или Kcat/Km для белка C3 комплемента в сайте, который инактивирует C3, а также может иметь пониженную активность или специфичность для плазминогена и/или проявляют повышенную селективность, специфичность и/или активность

для целевого белка комплемента C3, в результате чего модифицированный полипептид u-PA инактивирует C3.

Модифицированные полипептиды u-PA проявляют повышенную активность для расщепления и инактивации C3 по сравнению с соответствующей формой дикого типа или дикого типа с заменой C122S (посредством нумерации химотрипсина). В частности, домен протеазы модифицированного полипептида u-PA проявляет повышенную активность расщепления инактивации C3 по сравнению с доменом протеазы u-PASEQIDNO: 5 (домен протеазы u-PA с C122S).Увеличение активности может составлять 10%, 20%, 50%, 100%, 1-кратное, 2-кратное, 3-кратное,4,5, 6,7,8,9, 10-кратное и более по сравнению с немодифицированнымu-PA.

Модифицированный полипептид u-PA может иметь пониженную активность для нативного субстрата, такого как плазминоген. Например, модифицированные полипептиды u-PA могут проявлять от 0 до 99% активности u-PA дикого типа или эталонного полипептида u-PA, такого как полипептид u-PA, представленный в SEQIDNO: 5, для плазминогена и по меньшей мере 0,5-кратного, 1-кратного, 2-кратного, 3-кратного или более для расщепления C3 для его инактивации.

Например, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, демонстрируют меньше или меньше чем приблизительно 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или менее активности u-PA дикого типа или эталонного полипептида u-PA, такого как соответствующий полипептид, не содержащий аминокислотную модификацию (например, замену аминокислоты), например, домен протеазы u-PA, представленный в SEQIDNO: 5.

Например, примеры положений, которые могут быть модифицированы, например, путем замены или замены аминокислот, включают, но не ограничиваются ими, любое из положений, соответствующих положению 173,178,179, 180,181,185, 186,187,188, 208,209,249, 250,252,306, 314 или 353 относительно последовательности аминокислот, представленной в SEQIDNO: 3(соответствующие положениям 30,35,36, 37, 37a,38,39, 40, 41, 60a, 60b, 97a,

97b,99,149, 157 или 192 в соответствии с нумерацией химотрипсина).Например, аминокислотные положения могут быть заменами в положениях, соответствующих замене фенилаланина (F) в одном или нескольких положениях 173, R178, R179, H180, R181, V185, T186, Y187, V188, D208, Y209, T249, L250, H252, Y306, M314 или Q353 со ссылкой на положения аминокислот, представленные в SEQIDNO: 3 (соответственноF30, R35, R36, H37, R37a, V38, T39, Y40, V41, D60a, Y60b, T97a, L97b, H99, Y149, M157 и Q192 в соответствии с нумерацией химотрипсина).

Иллюстративные аминокислотные замены в любом из вышеуказанных положений представлены в Таблице 11. Ссылка на соответствующее положение в таблице 11 приведена со ссылкой на положения, показанные в SEQIDNO: 3 (см. также примеры, ниже). Понятно, что замены могут быть выполнены в соответствующем положении в другом полипептиде u-PA путем сравнения с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 3, в результате чего соответствующее положение представляет собой выровненное положение.

Например, замена может быть выполнена в домене протеазы u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 2 или в домене протеазы u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 5. В некоторых примерах, замена (ы) аминокислоты может находиться в соответствующем положении в полипептиде u-PA, как изложено в SEQIDNO:5 или их вариантах с по меньшей мере, приблизительно 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, в частности, 95% или более идентичностью последовательности, при условии, что полученный модифицированный полипептид u-PA проявляет измененную (те повышенную) специфичность в отношении белка C3 комплемента по сравнению с активностью u-PA в отношении плазминогена и/или измененную селективность для белка C3 комплемента. В одном примере любая одна или более замен находятся в любой из SEQIDNO: 1-6, так что полученный модифицированный полипептид u-PA проявляет измененную (те, повышенную) специфичность к белку C3 комплемента по сравнению с активностью u-PA в

отношении плазминогена и/или измененную селективность для белка С3 комплемента.

Таблица 11. Примеры мутаций, которые приводят к повышению активности при расщеплении С3		
Соответствующее положение (вSEQIDNO:3)	**Соответствующее положение (нумерация химотрипсина)**	**Замена**
173	30	Y
178	35	W Y Q
179	36	H
180	37	E P D N G K Y
181	37a	Q P E N S
185	38	D E
186	39	W Y F
187	40	H F Q
188	41	R L
208	60a	P T
209	60b	Q H S A T L
249	97a	E I
250	97b	A G
252	99	Q
279	122	S
306	149	K R
314	157	K
353	192	H

Примеры модификаций аминокислот в модифицированных полипептидах u-PA, приведенных здесь, включают, но не ограничиваются ими,

замену тирозином (Y) в положении, соответствующем положению 173 (30 посредством нумерации химотрипсина); W в положении, соответствующем положению 178 (35 посредством нумерации химотрипсина); Y в положении, соответствующем положению 178; Q в положении, соответствующем положению 178; H в положении, соответствующем положению 179 (36 посредством нумерации химотрипсина); E в положении, соответствующем положению 180 (37 посредством нумерации химотрипсина); P в положении, соответствующем положению 180; D в положении, соответствующем положению 180; N в положении, соответствующем положению 180;G в положении, соответствующем положению 180; K в положении, соответствующем положению 180; Y в положении, соответствующем положению 180; Q в положении, соответствующем положению 181 (37a посредством нумерации химотрипсина); P в положении, соответствующем положению 181; E в положении, соответствующем положению 181; N в положении, соответствующем положению 181; S в положении, соответствующем положению 181; D в положении, соответствующем положению 185 (38 посредством нумерации химотрипсина); E в положении, соответствующем положению 185; W в положении, соответствующем положению 186 (39 посредством нумерации химотрипсина); Y в положении, соответствующем положению 186; F в положении соответствующем положению 186; H в положении, соответствующем положению 187 (40 посредством нумерации химотрипсина); F в положении, соответствующем положению 187; Q в положении, соответствующем положению 187; R в положении, соответствующем положению 188 (41 посредством нумерации химотрипсина); L в положении, соответствующем положению 188; P в положении, соответствующем положению 208; T в положении, соответствующем положению 208 (60a посредством нумерации химотрипсина); Q в положении, соответствующем положению 209 (60b посредством нумерации химотрипсина);

H в положении, соответствующем положению 209; S в положении, соответствующем положению 209; S в положении, соответствующем

положению 209; T в положении, соответствующем положению 209; L в положении, соответствующем положению 209; E в положении, соответствующем положению 249 (97a посредством нумерации химотрипсина); I в положении, соответствующем положению 249; A в положении соответствующем положению 250 (97b посредством нумерации химотрипсина); G в положении, соответствующем положению 250; Q в положении, соответствующем положению 252 (99 посредством нумерации химотрипсина); K в положении, соответствующем положению 306 (149 посредством нумерации химотрипсина); R в положении, соответствующем положению 306; K в положении, соответствующем положению 314 (157 посредством нумерации химотрипсина); или H в положении, соответствующем положению 353 (192 посредством нумерации химотрипсина) ;

каждое со ссылкой на положения аминокислот согласно SEQIDNO:3. Sв положении, соответствующем положению 279 (122S) по нумерации химотрипсина, замещает свободныйCys, посредством чего снижается тенденция к агрегации.

Примеры модифицированных полипептидов u-PAсодержащих 2 или более аминокислотных модификаций, приведены в Таблице12 ниже, и их активность в расщеплении C3 описанав Таблице 14. ПоследовательностьIDNO. содержит примерыu-PAпротеазных доменов, которые содержат такие замены, включающие замены в C122Sдля снижения или исключения агрегации. C122 представляет собой свободный цистеин, который может приводить к сшивкам в протеазных полипептидах. Понятно, что протеазный домен является примером, и молекулы полной длины и молекулы предшественников, и также другие каталитически активные части протеазных доменов, полипептиды полной длины и предшественники могут включать такие замены, с образованием активированных модифицированных u-PAполипептидов полной длины и других форм.

Таблица 12. Модифицированные u-PAполипептиды		
Нумерация зрелой u-PA	**Нумерация химотрипсина**	**Примеры SEQ ID NO**
F173Y/V185D/Y187H/V188R/L250A/H252Q/C279S/M314K	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8
F173Y/R178W/R179H/H180E/V185E/T186W/Y187H/V188R/Y209Q/T249E/L250A/H252Q/C279S/Y306K/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9
F173Y/R178W/R179H/H180D/V185E/T186Y/Y187F/V188R/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10
R178W/R179H/H180N/V185E/T186F/Y187F/V188R/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K/Q353H	R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	11
F173Y/R178Y/R179H/H180K/V185E/T186F/Y187F/V188R/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12
F173Y/R178W/R179H/H180N/V185E/T186Y/Y187F/V188R/Y209S/T249E/L250A/H252Q/C279S/Y306K/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	13
F173Y/R178W/R179H/H180P/V185E/T186Y/Y187F/V188R/Y209S/T249E/L250A/H252Q/C279S/Y306K/M314K	F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	14
V185E/Y187Q/V188L/Y209L/L250A/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	15
F173Y/R178Q/R179H/H180G/R181E/V185E/T186F/Y187F/V188R/D20	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP	16

Таблица 12. Модифицированные u-PAполипептиды		
Нумерация зрелой u-PA	**Нумерация химотрипсина**	**Примеры SEQ ID NO**
8P/Y209S/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	
F173Y/R178Y/R179H/H180P/R181Q/V185E/T186Y/Y187F/V188R/Y209H/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R/M314K	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208T/Y209T/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18
R178W/H180P/R181N/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209L/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19
R178W/H180D/R181P/V185E/T186W/V188R/Y209A/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21
H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22
R178Q/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23
R178Q/H180Y/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24

Таблица 12. Модифицированные u-PAполипептиды		
Нумерация зрелой u-PA	**Нумерация химотрипсина**	**Примеры SEQ ID NO**
R178Q/H180Y/R181E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25
R178Q/H180Y/R181E/V185E/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/T249I/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/L250A/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/H252Q/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R	31
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/C279S/Y306R	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	32
R178Q/H180Y/R181E/V185E/T186Y/V188R/D208P/Y209Q/T249I/L250A/H252Q/C279S	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	33

Таблица 12. Модифицированные u-PAполипептиды		
Нумерация зрелой u-PA	**Нумерация химотрипсина**	**Примеры SEQ ID NO**
Y187Q/V188L/Y209L/ L250A/H252Q/ C279S	Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34
V185E/Y187Q/ Y209L/L250A/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35
V185E/Y187Q/ V188L/L250A/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36
V185E/Y187Q/ V188L/Y209L/H252Q/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	37
V185E/Y187Q/ V188L/ Y209L/L250A/ C279S	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	38
Y187Q/ V188L/L250A/H252Q/C279S	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	39
Y187Q/ V188L/L250A/ C279S	Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40
R181S/ V188R/ L250G/ H252Q/C279S	R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41
T186Y/ V188R/ L250A/ H252Q/C279S	T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42
T186Y/V188R/Y209Q/L250A/H252Q/C279S	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43
T186Y/V188R/D208P/L250A/H252Q/C279S	T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	44

2. Дополнительнвемодификации

Любой из модифицированных полипептидов u-PA, предусмотренных в настоящем документе, может содержать любую одну или более дополнительных модификаций. Дополнительные модификации могут включать, например, любую аминокислотную замену, делецию или вставку, известную в

данной области техники, обычно любую, которая повышает специфичность к белку C3 комплемента по сравнению с активностью u-PA в отношении плазминогена и/или изменения селективности для белка C3 комплемента.

Также предусмотрены модификации, которые изменяют любую другую интересующую активность.В данной области техники известно, что аминокислотные модификации первичной последовательности представляют собой добавку (см. например, Wells (1990) Biochem 29: 8509-8517). Любой модифицированный полипептид u-PA, предусмотренный в настоящем документе, может содержать 1,2,3, 4,5,6, 7,8,9, 10,11,12, 13,14,15, 16,17,18, 19, 20 или более дополнительных аминокислотных модификаций для обеспечения дополнительной активности или изменения активности.

Примеры дополнительных модификаций, которые могут быть включены в модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в патенте США № № 4, 997,766; 5,126,134; 5,129,569; 5,275,946; 5,571,708; 5,580559; 5,648,253; 5728564; 5759542; 5811,252; 5,891,664; 5,932,213; 5,980,886;6, 248,712; 6,423,685; 7,070925; 7,074,401; 7,807,457; 7,811,771; 8,211,428; публикация патента США № 2002/0106775; 2004/0265298; 2004/0146938; 2009 /0010916; 2011/0055940; 2008/0020416; 2006/0142195; публикации международных заявок WO1988/008451; WO1989/010401; WO1990/004635;WO1996/013160; WO 2002/40503; Petersenetal. (2001) Eur J Biochem 268: 4430-4439; Skeldal et al (2006) FEBS J 273: 5143-5149; Sun et al. (1997) J Biol Chem 272: 23818-23823; Bluse et al. (2009) J Biol Chem 284: 4647-4657; Nelles et al. (1987) JBC 262: 5682-5689; Crowley et al. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 5021-5025; Zesclaska et al. (2000) J Mol Biol 301: 465-475; Zesclaska et al (2003) J Mol Biol 328: 109-118; Quax et al.(1998) ArterioscIerThrombVasc Biol 18: 693-701; Homandberg and Wai (1990) Trombin Res 58: 403-412; Zaitsev et al. (2010) Blood 115: 5241-5248; Yang et al. (1994) Biochemistry 33: 606-612; Davidow et al. (1991) Protein Eng 4: 923-928; Boutad and Castellino (1993) Arch BiochemBiophys 303: 222-230; Tsujikawa et al. (1996) Yeast 12: 541-553; Carriero et al. (2002) Biol Chem 383: 107-113; Stopelli et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA

82: 4939-4943; Stopelli et al.(1987) J Biol Chem 262: 4437-4440; Franco et al. (1998) J Biol Chem 273: 27734-27740; Franco et al. (1997) J Cell Biol 137: 779-791; Li et al. (1995) J Biol Chem 270: 30282-30285; Botkjaer et al (2009) Biochemistry 48: 9606-9617; Bdeir et al. (2003) Blood 102: 3600-3608; Eguchi et al (1990) J Biochem. 108: 72-79; Miyake et al. (1988) J Biochem 104: 643-647; Bergstrom et al. (2003) Biochem 42: 5395-5402; Sun и Liu (2005) Proteins 61: 870-877; Sun et al (1998) Biochemistry 37: 2935-2940; Anderson et al (2008) Biochem J 412: 447-457; Li et al (1992) BiochimBiophys Acta 1159: 37-43; Lijnen et al (1988) Eur J Biochem 177: 575-582; Lijnen et al (1988) Eur J Biochem 172: 185-188; Lijnen et al. (1992) Eur J Biochem 205: 701-709; Lijnen et al (1994) Eur J Biochem 224: 567-574; Lijnen et al.(1990) J Biol Chem 265: 5232-5236; Yoshimoto et al. (1996) BiochimBiophys Acta 1293: 83-89; Magdolen et al. (1996) Eur J Biochem 237: 743-751; Niquener et al. (2000) J Biol Chem 275: 7239-7248; Gurewich et al (1988) J Clin Invest 1956-1962; Liu et al. (1996) Biochemistry 35: 14070-14076; Liu et al (2002) Circ Res 90: 757-763; Mukhina et al (2000) J Biol Chem 275: 16450-16458; Peng et al. (1997) Biochem Mol Biol Int 41: 887-894; Turkmen et al. (1997) Electrophoresis 18: 686-689; Peng et al. (1999) Biotechnol Lett 21: 979-985; Ueschema et al. (1994) ThrombHaemost 71: 134-140; и Melnick et al. (1990) J Biol Chem 265: 801-807. Неограничивающиепримерывозможныхмодификацийаминокислот, описанныхвданнойобластитехники, включаютлюбойодинилиболееизS9A, C13A, T18A, C19A, V20A, S21A, N22Y, N22A, N22Q, N22R, K23A, K23H, K23Q, K23E, Y24A, F25A, S26A, S26F, N27A, N27R, I28A, H29A, H29R, W30A, W30R, W30F, N32S, K35A, G38R, E43A, I44A, D45A, K46A, S47A, S47G, K48A, K48P, T49A, Y51A, N54A, L80H, Q81R, Q82P, T83R, H99Y, P105A, D106A, N107A, R108A, R108D, R109A, R110A, G118N, L119R, K120R, K120A, P121L, L122T, L122R, V123Y, V123W, Q124A, E125A, H129A, D130G, C131W, K135G, K135S, K135Y, K135Q, K136P, S138E, C148S, C148A, K151E, T152A, R154G, R154P, R154A, P155R, P155L, P155A, P155N, P155S, P155G, P155Q, R156P, R156A, R156H, R156S, R156Y, R156E, R156G, R156L, F157L, F157T, F157G, F157Q, F157D, F157E, K158R, K158E, K158A, K158H, K158S, K158Y, K158G, K158W, K158V, K158M, I159R, I159A, I159P, I159G, I160A, I160K, G162R, E163A, F164V, F164A, F164V, I167L, P171L, F173I, F173V, F173L, F173T, F173G, F173M,

A175S, Y177A, R178A, R179A, H180A, R181A, S184A, T186A, T186E, T186D, Y187A, Y187H, V188A, S192N, I194M, S195A, H204A, H204Q, F206A, D208A, Y209A, P210A, K211A, K211Q, K212A, E213A, D214A, Y215A, I216A, Y218A, R221A, S222L, R223G, R223A, L224A, L224P, N225A, S226P, N227A, Q229A, E231G, K233E, K233A, F234A, E235K, E235A, E237A, I240V, K243E, K243A, D244A, Y245A, D255A, R262A, K264A, E265A, R267A, C268Y, C279S, C279A, F289L, G290D, E294G, I295T, G297D, F298A, G299A, G299H, K300A, K300H, K300W, E301D, E301A, E301H, N302A, N302Q, N302V, N302L, N302I, N302S, N302T, S303E, S303A, S303E, T304A, T304V, T304M, D305A, Y306A, Y306G, Y306V, Y306H, L307A, Y308A, P309A, P309S, P309T, P309V, P309G, P309N, P309L, P309D, P309R, P309H, P309F, P309W, E310A, Q311A, L312P, L312V, L312M, K313Y, K313T, K313A, K313H, T315A, T315I, V316A, V317A, Y330H, A343T, D344A, Q346A, W347A, K348A, K348E, T349I, D350A, S351A, Q353A, G354R, D355A, S356A, G357E, G366C, R378C, R378A, K383A, K385A, R400A, H402A, K404A, E405A, E406A G408A, или A410V,

согласнопоследовательностиаминокислот, представленной в SEQ ID NO: 3. Дополнительные модификации включают аминокислотные замены, которые вводят в сайт гликозилирования.

Модифицированные полипептиды u-PA включают те, которые содержат химические или посттрансляционные модификации. В некоторых примерах модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, не содержат химических или посттрансляционных модификаций.

Химические и посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, пегилирование, сиалирование, альбуминирование, гликозилирование, фарнизилирование, карбоксилирование, гидроксилирование, PASилирование, HESилирование, фосфорилирование, связывание с мультимеризационным доменом (ами), таким как Fcи другие полипептидные модификации, известные в данной области техники. В дополнение к любой одной или более модификаций аминокислот, таких как аминокислотные замены, инсерции, делеции и их комбинации, предложенные в настоящем документе, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем

документе, могут быть конъюгированы или слиты с любым фрагментом с использованием любого способа, известного в данной области техники, включая химические и рекомбинантные способы, предоставляющие полученный полипептид, который, когда находится в активной форме, сохраняет способность влиять на ингибирующее или инактивирующее расщепление белка C3 комплемента.

Например, в дополнение к любому одному или более модификациям аминокислот, таким как аминокислотные замены, предложенные в настоящем документе, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, также могут содержать другие модификации, которые являются или не находятся в первичной последовательности полипептида, включая, но не ограничиваясь этим, модификацию углеводной части, фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), силилирующий фрагмент, Fc-домен, иммуноглобулин G или любой другой домен или фрагмент. Например, такие дополнительные модификации могут быть сделаны для повышения стабильности или периода нахождения белка в сыворотке.

a. Пониженная иммуногенность

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть модифицированы, чтобы иметь пониженную иммуногенность. Пониженная иммуногенность может быть осуществлена посредством изменений в последовательности, которые устраняют антигенные эпитопы из полипептида или путем изменения посттрансляционных модификаций. Специалисту в данной области известны способы идентификации антигенных эпитопов в полипептиде (см. например, Liangetal. (2009) BMCBioinformatics, 10: 302; Yangetal (2009) Rev. Med. Virol. 19: 77-96).В некоторых примерах одна или более аминокислот могут быть модифицированы для удаления или изменения антигенного эпитопа. В другом примере изменение гликозилирования белка также может влиять на иммуногенность. Например, предполагается изменение гликозилирования пептида, при условии, что полипептиды сохраняют способность подавлять или инактивировать

расщепление белка C3 комплемента. Сайты гликозилирования можно удалить с помощью одиночных мутаций.Сайты гликозилирования можно добавлять посредством введения канонической последовательности, такой как вставка одной или нескольких мутаций, таких как NXS (T), где X не является пролином. Сайты гликозилирования также могут увеличивать период полужизни в сыворотке.

b. Домен Fc

Модифицированныеu-PAполипептидымогут связываться с Fcобластью иммуноглобулинового полипептида. Обычно такое слияние сохраняет по крайней мере функционально активное соединение, домены C_H2 иC_H3 постоянной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, полная FcпоследовательностьIgG1 содержит аминокислоты 99-330 последовательности вSEQIDNO: 45 ниже.

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser GlyGlyThr Ala Ala Leu GlyCys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser TrpAsn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His ThrPhe Pro Ala Val Leu Gln Ser SerGly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val ValThr Val Pro Ser SerSer Leu GlyThrGlnThr
65 70 75 80

Tyr Ile CysAsn Val Asn His Lys Pro Ser AsnThr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His ThrCys Pro ProCys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu LeuGlyGly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser ArgThr Pro Glu Val ThrCys
130 135 140

Val ValVal Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys PheAsnTrp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu AsnGly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys AsnGln Val Ser Leu ThrCys Leu Val Lys GlyPhe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser AsnGlyGln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys ThrThr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser PhePhe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser ArgTrpGlnGlnGlyAsn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys.
325 330

ПримерFcпоследовательностиhIgG1 приведен вSEQIDNO: 50:

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His ThrCys Pro ProCys Pro Ala Pro
1 5 10 15
Glu Leu LeuGlyGly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30
Asp Thr Leu Met Ile Ser ArgThr Pro Glu Val ThrCys Val ValVal
35 40 45
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys PheAsnTrp Tyr Val Asp

50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu GluGln Tyr

65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu AsnGly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys GlyGln Pro Arg

115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

130 135 140

AsnGln Val Ser Leu ThrCys Leu Val Lys GlyPhe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser AsnGlyGln Pro Glu AsnAsn Tyr Lys

165 170 175

ThrThr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser PhePhe Leu Tyr Ser

180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser ArgTrpGlnGlnGlyAsn Val Phe Ser

195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr ThrGln Lys Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

Она содержит почти всю шарнирную последовательность, соответствующую аминокислотам 100-110 SEQIDNO: 45; полную последовательность для домена C_H2 andC_H3, как изложено в SEQIDNO: 45.

Другой примерный полипептид Fc представлен в публикации PCT № WO 93/10151 и представляет собой одноцепочечный полипептид, проходящий от N-концевой к нативному C-концу Fc-области антитела IgG1 человека (SEQIDNO: 50).Точный участок, на котором выполнено связывание, не является критическим:конкретные сайты хорошо известны и могут быть выбраны для

оптимизации биологической активности, секреции или характеристик связывания полипептида HABP. Например, другие примеры полипептидных последовательностей Fc начинаются с аминокислоты C109 или P113 последовательности, представленной в SEQIDNO: 45 (см. например, публикацию США № 2006/0024298).

В дополнение к hIgG1 Fc могут быть использованы другие Fc-области и другие мультимеризационные домены. Например, когда эффекторные функции, опосредованные взаимодействиями Fc/FcγR, должны быть минимизированы, рассматриваются слияние с изотипамиIgG, которые плохо рекрутируют клетки комплемента или эффекторные клетки, такие как, например, FcIgG2 или IgG4 Кроме того, слияния Fc могут содержать последовательности иммуноглобулина, которые по существу кодируются генами иммуноглобулина, принадлежащими любому из классов антител, включая, но не ограничиваясь ими, IgG (включая подклассы IgG1 человека, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2 человека), IgD, IgE и IgM классы антител. Линкеры могут быть использованы для ковалентного связывания Fc с другим полипептидом с образованием Fc-химеры.

Модифицированные домены Fc также хорошо известны. В некоторых примерах Fc-область модифицирована таким образом, что она проявляет измененное связывание с FcR, чтобы приводить к изменению (т.е. больше или меньше) эффекторной функции, чем эффекторная функция Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа. Таким образом, модифицированный домен Fc может иметь измененное сродство, включая, но не ограничиваясь этим, повышенное или низкое сродство к Fc-рецептору.Например, различные подклассы IgG имеют различные аффинности к FcγRs, при этом IgG1 и IgG3, как правило, связываются по существу лучше с рецепторами, чем IgG2 и IgG4. Различные FcγRs опосредуют различные эффекторные функции. FcγR1, FcγRIIa/c, и FcγRIIIa являются положительными регуляторами активации иммунного комплекса, характеризуются наличием внутриклеточного домена, который имеет иммунорецепторное звено активации на основе тирозина (ITAM). Однако FcγRIIb, имеет звено ингибирования иммунорецептора на

основе тирозина (ITIM) и, следовательно, является ингибирующим. Изменение аффинности Fc-области для рецептора может модулировать эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства, связанные с Fc-доменом. Модифицированные домены Fc известны специалисту в данной области техники и описаны в литературе, см. например, патент США No 5, 457,035; патентная публикация США № 2006/0024298; и международная патентная публикация № WO 2005/063816.

Полученные химерные полипептиды, содержащие фрагменты Fc, и мультимеры, образованные из них, могут быть легко очищены аффинной хроматографией на колонках белка A или белка G.

В другом примере модифицированный полипептид u-PA может быть связан с человеческим сывороточным альбумином (HSA), таким как остатки 25-608 HSA, или полной длины, или их частью:

10 20 30 40 50
MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR**DAHK**SEVAHRFKDLGEENFKALVLIA
60 70 80 90 100
FAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT
110 120 130 140 150
VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA
160 170 180 190 200
FHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA
210 220 230 240 250
CLLPKLDELRDEGKASSAKQGLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA
260 270 280 290 300
EFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
310 320 330 340 350
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVGSKDVCKNYAEAKDVF
360 370 380 390 400
LGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE
410 420 430 440 450
FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV

460 470 480 490 500

SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDCLSVFLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC

510 520 530 540 550

CTESLVNGRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ

560 570 580 590 600

TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLV

AASQ**AALG**L

c. Связывание с полимерами

В некоторых примерах модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, конъюгированы с другими полимерами. Полимеры могут увеличивать размер полипептида, чтобы уменьшить клиренс почек и, таким образом, увеличить период полужизни или модифицировать структуру полипептида для увеличения периода полужизни или снижения иммуногенности. Примеры полимеров, которые могут быть конъюгированы с полипептидами u-PA, включают природные и синтетические гомополимеры, такие как полиолы (те поли-OH), полиамины (те поли-NH2) и поликарбоновые кислоты (iE. поли-COOH) и другие гетерополимеры, те полимеры, содержащие одну или более различных групп сцепления, например, гидроксильную группу и аминогруппы.

Примеры подходящих полимерных молекул включают полимерные молекулы, выбранные из полиалкиленоксидов (ПАО), таких как полиалкиленгликоли (ПАГ), включая полиэтиленгликоли (ПЭГ), метоксиполиэтиленгликоли (мПЭГ) и полипропиленгликоли, ПЭГ-глицидиловые эфиры (Эпокс-ПЭГ), ПЭГ-оксикарбонилимидазол (CDI-ПЭГ), разветвленные полиэтиленгликоли (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), поликарбоксилаты, поливинилпирролидон, поли-D, L-аминокислоты, ангидрид полиэтилен-малеиновой кислоты, ангидрид полистирол-малеиновой кислоты, декстран, включающий карбоксиметил-декстран, гепарин, гомологичный альбумин, целлюлозы, включая метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу,гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу и гидроксипропилцеллюлозу, гидролизаты хитозана, крахмалы, такие как

гидроксиэтилкрахмалы и гидроксипропилкрахмалы, гликоген, агарозы и их производные, гуаровуя камедь, пуллулан, инулин, ксантановую камедь, каррагинан, пектин, гидролизаты альгиновой кислоты и биополимеры.

Обычно полимеры представляют собой полиалкиленоксиды (PAO), такие как полиэтиленоксиды, такие как ПЭГ, обычно мПЭГ, которые имеют несколько реакционноспособных групп, способных к сшиванию. Обычно полимеры представляют собой нетоксичные полимерные молекулы, такие как (метокси) полиэтиленгликоль (мПЭГ), которые могут быть ковалентно конъюгированы с полипептидами u-PA (например, для присоединения групп на поверхности белка) с использованием относительно простой химии.

Подходящие полимерные молекулы для присоединения к полипептидам u-PA включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и производные ПЭГ, такие как метоксиполиэтиленгликоли (мПЭГ), ПЭГ-глицидиловые эфиры, ПЭГ-оксикарбонилимидазол (CDI-PEG), разветвленные ПЭГ и полиэтиленоксид (ПЭО) (см. например, Robertsetal., *AdvancedDrugDeliveryReview* 2002, 54: 459-476; HarrisandZalipsky (eds.) "Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications" ACS Symposium Series 680, 1997; Mehvar *et al., J. Pharm. Pharmaceut. Sci.,* 3(1):125-136, 2000; Harris and Chess (2003) *Nat Rev Drug Discov.* 2(3):214-21; and Tsubery, *J Biol. Chem* 279(37):38118-24, 2004).

Полимерная молекула может иметь молекулярную массу, обычно находящуюся в диапазоне от приблизительно 3 кДа до приблизительно 60 кДа.В некоторых вариантах осуществления полимерная молекула, которая конъюгирована с полипептидом U-PA, представленным в настоящем документе, имеет молекулярную массу 5,10,15, 20,25,30, 35,40,45, 50, 55, 60 или более 60 кДа.

Способы модификации полипептидов путем ковалентного присоединения (конъюгирования) ПЭГ или ПЭГ-производного (т.е. ПЭГилирование) хорошо известны в данной области (см. например, US 2006/0104968; U.S 5,672662; U.S.6, 737,505; и U.S.2004/0235734). Методы ПЭГилирования включают, но не ограничиваются ими, специализированные

линкеры и химические составы для связывания (см.например, Harris, *Adv. DrugDeliv. Rev.* 54:459-476, 2002), прикрепление множества фрагментов ПЭГ к одному сайту конъюгации (например, посредством использования разветвленных ПЭГ; см. например,Veroneseetal., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), сайт-специфическое ПЭГилированиеи/илимоно-ПЭГилированиесм. например,Chapmanetal., *NatureBiotech.* 17:780-783, 1999), и направленное на сайт ферментное ПЭГилированиесм.,например, Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:487-504, 2002), см. также, например, Lu and Felix (1994) *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:127-138; Lu and Felix (1993) *Peptide Res.* 6:142-6, 1993; Felix *et al.* (1995) *Int. J. Peptide Res.* 46:253-64; Benhar *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:13398-404; Brumeanu *et al.* (1995) *J Immunol.* 154:3088-95; see also, Caliceti *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(10):1261-77 иMolineux (2003) *Pharmacotherapy* 23 (8 Pt 2):3S-8S).

Способы и методики, описанные в данной области, могут продуцировать белки, имеющие 1,2,3, 4,5,6, 7,8,9, 10 или более чем 10 ПЭГ или производные ПЭГ, присоединенные к одной молекуле белка (см. например, U.S.2006/0104968).

Многочисленные реагенты для ПЭГилирования были описаны в данной области техники. Такие реагенты включают, но не ограничиваются ими, N-гидроксисукцинимидил (NHS), активированный ПЭГ, сукцинимидилмПЭГ, mPEG2-N-гидроксисукцинимид, мПЭГсукцинимидил альфа-метилбутаноат, мПЭГсукцинимидилпропионат, мПЭГсукцинимидилбутаноат, мПЭГ карбоксиметил-3-гидроксибутановой кислоты сукцинимидиловый эфир, гомобифункциональный ПЭГ-сукцинимидил пропионат, гомобифункциональный ПЭГгомобифункциональный ПЭГ-бутиральдегид, ПЭГ малеимид, ПЭГ гидразид, п-нитрофенилкарбонат ПЭГ, мПЭГ-бензотриазол карбонат, пропиональдегид ПЭГ, мПЭГбутриальдегид, разветвленный mPEG2-бутиральдегид, мПЭГ ацетил, мПЭГ-пиперидон, мПЭГметилкетон, мПЭГвинилсульфон, мПЭГ-тиол, мПЭГ-ортодирилтиоэфир, мПЭГ-ортоформилдисульфид, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, винилсульфонПЭГ-NHS, акрилат ПЭГ-NHS, флуоресцеин ПЭГ-NHS и биотин ПЭГ-NHS (см.

например, Monfardini*etal.*, *BioconjugateChem.* 6:62-69, 1995; Veronese*etal.*, *J. BioactiveCompatiblePolymers* 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,183,550; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447; U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; U.S. 2005/000360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; andWO 0187925).

d. Домен трансдукции белка

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть связаны, такие как слитый белок, содержащий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с доменом трансдукции белка (PTD), который увеличивает удерживание антитела на целевом участке для терапии, таком как участок слизистой оболочки, такой как глаз. Любое PTD может быть использовано таким образом, что PTD способствует связыванию с клетками-мишенями на терапевтическом участке (например,мукозальный сайт) и/или поглощению модифицированного полипептида u-PA клетками-мишенями на терапевтическом участке (например, мукозальном участке, таком как глаз).

Обычно PTD включают в себя короткие катионные пептиды, которые могут связываться с клеточной поверхностью посредством электростатического прикрепления к клеточной мембране и могут быть приняты посредством клеточной транслокации (Kabouridis (2003) TRENDSBiotech 21 (11) 498-503). PTD, приведенные здесь, как правило, взаимодействуют с клеткой-мишенью

посредством связывания с гликозаминогликанами (GAG), такими как, например, гиалуроновая кислота, гепарин, гепарансульфат, дерматансульфат, кератин сульфат или хондроитин сульфат и их производные.

Домен трансдукции белка может иметь любую длину. Обычно длина PTD составляет от 5 или приблизительно 5 до 100 или приблизительно 100 аминокислот в длину. Например, длина PTD может находиться в диапазоне от 5 или приблизительно 5 до 25 или приблизительно 25 аминокислот в длину. В некоторых примерах, PTD составляет 5,6,7, 8,9,10, 11,12,13, 14,15,16, 17,18,19, 20,21,22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину.

Один PTD или его множество можно конъюгировать с модифицированным полипептидом u-PA. Они преимущественно используются для лечения глазных или офтальмологических расстройств, таких как диабетические ретинопатии, включая AMD. Например, множественные копии одного и того же PTD (например, димера, тримера, тетрамера, пентамера, гексамера, гептамера, октамера, нонамера, декамера или большего мультимера) или различных PTD могут быть конъюгированы с модифицированным полипептидом u-PA.

Некоторые белки и их пептидные производные обладают свойствами интернализации клеток. Примеры PTD известны в данной области техники и включают в себя, но не ограничиваются ими, PTD, перечисленные в таблице ниже, включая, например, PTD, полученные из вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ -1) TAT (SEQIDNOS: 125-135; Runetal. (1989) J Virol.63: 1-8), белок VP22 (SEQ ID NO: 140; Elliott and O'Hare (1997) Cell 88: 223-233), гомеостатическийбелок*Drosophila melanogaster* Antennapedia (Antp), белок (Penetratin PTD; SEQ ID NO: 112; Derossi*et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:18188-18193), протергин 1 (PG-1) антимикробныйбелокSynB (e.g., SynB1 (SEQ ID NO: 121), SynB3 (SEQ ID NO: 122), и SynB4 (SEQ ID NO: 123); Kokryakov*et al.* (1993) *FEBS Lett.* 327:231-236) ифакторростафибробластовKaposi (SEQ ID NO: 105; Lin *et al.*, (1995) *J. Biol. Chem.* 270-14255-14258).

Было обнаружено, что другие белки и их производные обладают аналогичными свойствами интернализации. Белковые носители, произведенные из этих белков, показывают небольшую гомологию друг с другом, но являются катионными и богатыми аргинином или лизином. В самом синтетические полиаргининовые пептиды, как было показано, интернализируются с высоким уровнем эффективности и могут быть выбраны для связывания или конъюгации с антителом (Futaki*etal.* (2003) *J. Mol. Recognit.* 16:260-264; Suzuki*etal.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:5836-5840). ПТД может также быть выбрано из одного или более синтетических ПТД, включая, но не ограничиваясь этим, транспортан (SEQIDNO: 136; Pooga*etal.*(1988) *FASEB J.* 12:67–77; Pooga *et al.* (2001) *FASEB J.* 15:1451–1453), MAP (SEQ ID NO: 103; Oehlke *et al.*(1998) *Biochim. Biophys. Acta.* 1414:127–139), KALA (SEQ ID NO: 101; Wyman *et al.*(1997) *Biochemistry*36:3008–3017) и другие катионные пептиды, такие как, например, различные β-катионные пептиды (Akkarawongsa*etal.*(2008) *Antimicrob. AgentsandChemother.* 52(6):2120-2129). Представлены также другие пептиды ПТД и варианты ПТД, например, публицации США US 2005/0260756, US 2006/0178297, US 2006/0100134, US 2006/0222657, US 2007/0161595, US 2007/0129305, Европейская патентная публикацияEP 1867661, публикации PCTWO 2000/062067, WO 2003/035892, WO 2007/097561, WO 2007/053512 и Таблица 13 (см. ниже). Любые такие ПТД могут быть конъюгированы с представленным терапевтическим антителом.

Таблица 13: Известные домены белковой трансдукции

Домен белковой трансдукции (ПТД)	Исходный белок	SEQ ID NO
TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	Buforin II	82
RKKRRRESRKKRRRES	DPV3	83
GRPRESGKKRKRKRLKP	DPV6	84
GKRKKKGKLGKKRDP	DPV7	85
GKRKKKGKLGKKRPRSR	DPV7b	86
RKKRRRESRRARRSPRHL	DPV3/10	87

Таблица 13: Известные домены белковой трансдукции		
Домен белковой трансдукции (ПТД)	**Исходный белок**	**SEQ ID NO**
SRRARRSPRESGKKRKRKR	DPV10/6	88
VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	DPV1047	89
VKRGLKLRHVRPRVTRDV	DPV1048	90
SRRARRSPRHLGSG	DPV10	91
LRRERQSRLRRERQSR	DPV15	92
GAYDLRRRERQSRLRRRERQSR	DPV15b	93
WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	GALA	94
KGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ	Бета цепь фибриногена	95
KTRYYSMKKTTMKIIPFNRL	Предшественник гамма цепи фибриногена	96
RGADYSLRAVRMKIRPLVTQ	Альфа цепь фибриногена	97
LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	hCT(9-32)	98
TSPLNIHNGQKL	HN-1	99
NSAAFEDLRVLS	Нуклеопротеинвирусаинфлюенсы (NLS)	100
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA	KALA	101
VPMLKPMLKE	Ku70	102
KLALKLALKALKAALKLA	MAP	103
GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	MPG	104
AAVALLPAVLLALLAP	Факторростафибробластов Kaposi	105
VQRKRQKLM	N50 (NLS of NF-kB P50)	106
KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Pep-1	107

Таблица 13: Известные домены белковой трансдукции		
Домен белковой трансдукции (ПТД)	**Исходный белок**	**SEQ ID NO**
SDLWEMMMVSLACQY	Pep-7	108
RQIKIWFQNRRMKWKK	Пенетратин	109
GRQIKIWFQNRRMKWKK	Вариант пенетратина	110
RRMKWKK	Короткий пенетратин	111
ERQIKIWFQNRRMKWKK	Пенетратин 42-58	112
RRRRRRR	Полиаргинин - R7	113
RRRRRRRRR	Полиаргинин - R9	114
RVIRVWFQNKRCKDKK	pISL	115
MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP	PrPc1-28	116
LLIILRRRIRKQAHAHSK	pVEC	117
LLIILRRRIRKQAHAH	вариантVEC	118
VRLPPPVRLPPPVRLPPP	SAP	119
PKKKRKV	SV-40 (NLS)	120
RGGRLSYSRRRFSTSTGR	SynB1	121
RRLSYSRRRF	SynB3	122
AWSFRVSYRGISYRRSR	SynB4	123
YGRKKRRQRRRPPQ	Tat 47-60	124
YGRKKRRQRRR	Tat 47-57	125
YGRKKRRQRR	Tat 47-56	126
GRKKRRQRR	Tat 48-56	127
GRKKRRQRRR	Tat 48-57	128
RKKRRQRRR	Tat 49-57	129
RKKRRQRR	Tat 49-56	130
GRKKRRQRRRPPQ	Tat 48-60	131
GRKKR	Tat 48-52	132
CFITKALGISYGRKKRRQRRRPPQFSQTHQVSL	Tat 37-72	133

Таблица 13: Известные домены белковой трансдукции		
Домен белковой трансдукции (ПТД)	**Исходный белок**	**SEQ ID NO**
SKQ		
FITKALGISYGRKKRRQRRRPQFSQTHQVSLSKQ	Tat 38-72	134
YGRKKRRQRRRPP	Tat 47-59	135
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Транспортан	136
AGYLLGKINLKALAALAKKIL	Транспортан10	137
GWTLNSAGYLLG	Транспортана производное	138
INLKALAALAKKIL	Транспортана производное	139
DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD	VP22	140
DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	VT5	141
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Пептид на основе сигнальной последовательности	142
KLALKLALKALKAALKLA	Амфифильный модельный пептид	143
KFFKFFKFFK	Проникающий через стенку бактериальной клетки	144
LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	LL- 37	145
SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQGGPR	Цесропин P1	146

Таблица 13: Известные домены белковой трансдукции		
Домен белковой трансдукции (ПТД)	**Исходный белок**	**SEQ ID NO**
ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	Альфа дефенсин	147
DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK	Бета дефенсин	148
RKCRIWIRVCR	Бактенецин	149
RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR	PR- 39	150
ILPWKWPWWPWRR	Индолицидин	151
GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	MPS	152
PVIRRVWFQNKRCKDKK	pIs1	153

В некоторых примерах ПТД (PTD) можно модифицировать путем замены лизина или аргинина другой основной аминокислотой, такой как замена лизина на аргинин или заменой аргинина на лизин.

E. АНАЛИЗЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЛИ КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ U-PA В КОМПЛЕМЕНТ-ОПОСРЕДОВАННЫХ ФУНКЦИЯХ

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают измененной специфичностью и/или селективностью для белка C3 комплемента.Приводимые в качестве примера модифицированные полипептиды u-PA специфически расщепляют белок C3 комплемента и тем самым изменяют активацию комплемента.

Кроме того, приведенные в настоящем документе примерные модифицированные полипептиды u-PA имеют измененную или пониженную, специфичность и/или селективность для расщепления природных субстратов u-PA, таких как плазминоген, и связывания с uPAR.

Различные анализы invitro и invivo могут быть использованы для мониторинга или скрининга полипептидов u-PA для их способности расщеплять белок C3 комплемента и для их эффектов в отношении активации комплемента и опосредованных комплементом заболеваний и расстройств. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области техники.Специалист в данной области техники может тестировать конкретный полипептид u-PA для расщепления белка C3 комплемента и/или тестирования для оценки любого изменения эффектов u-PA на комплемент-опосредованной активности по сравнению с отсутствием протеазы. Некоторые такие анализы приведены в качестве примеров в настоящем документе.

Приведенные в качестве примера анализы invitro и invivo представлены в настоящем документе для сравнения активности модифицированного полипептида u-PA на функции белка C3 комплемента. Как обсуждается ниже, многочисленные анализы, такие как анализы для измерения комплемента известны специалистам в данной области техники. В настоящем документе также представлены примеры анализов для определения активности модифицированных полипептидов u-PA для активности u-PA дикого типа, таких как расщепление плазминогена или связывание с uPAR. Также представлены анализы для определения специфичности модифицированных полипептидов u-PA для белка C3 комплемента. Примеры анализов описаны ниже.

1. Способы оценки активности u-PA в зависимости от функции белка C3 комплемента

Модифицированная u-PA протеаза может проявлять изменения специфичности и/или селективности по отношению к любому одному или более белкам комплемента и, таким образом, инактивировать любой один или более белков комплемента, таких как, например, C3, по сравнению с соответствующей полноценной, или формой дикого типа модифицированной u-PA протеазы. Модифицированные протеазы u-PA сохраняют свою протеазную активность, но могут проявлять повышенную специфичность и/или селективность к любому

одному или более белкам комплемента.Приводимые в качестве примера модифицированные протеазы u-PA специфически расщепляют любой один или более белков комплемента, таких как, например, C3, и, таким образом, изменяют активность белка комплемента. Все такие модифицированные протеазы u-PA с повышенной специфичностью и/или селективностью к любому одному или более белку комплемента являются кандидатами в качестве терапевтических средств.

Если модифицированная протеаза u-PA обладает повышенной специфичностью и/или селективностью по отношению к любому одному или более белкам комплемента, invitro и invivo анализы могут быть использованы для мониторинга или скрининга протеаз для воздействия на опосредованные комплементом функции.

Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области техники. Специалист в данной области техники может тестировать модифицированную протеазу u-PAпри расщеплении любого одного или более белка комплемента, такого как, например, C3, и/или испытания при оценке любого изменения эффектов модифицированной протеазы u-PA на комплемент-опосредованной активности по сравнению с отсутствием модифицированной u-PA протеазы. Некоторые такие анализы приведены в качестве примеров в настоящем документе.

Приведенные в качестве примера анализы invitro и invivo представлены в настоящем документе для сравнения активности модифицированной протеазы u-PA на функции любого одного или более целевых белков комплемента. Многие из анализов применимы к другим протеазам и модифицированным протеазам.Как обсуждалось выше, анализы для активностей комплемента включают, но не ограничиваются ими, анализы, которые измеряют продукты активации комплемента, такие как, например, комплекс C5b -9 MAC, и генерирование любого одного или более продуктов расщепления комплемента, таких как C4a, C5a, C3b и C3d.

Анализы для измерения активации комплемента также включают в себя функциональные анализы, которые измеряют функциональную активность конкретных компонентов путей комплемента, таких как, например, гемолитические анализы, используемые для измерения активации любого из классических, лектиновых или альтернативных путей.Анализы для оценки влияния протеаз и модифицированных протеаз на белки комплемента и/или комплемент-опосредованные функции включают в себя, но не ограничиваются ими, SDS-анализ с последующим Вестерн-блоттингом или окрашивание Кумасси Синим, ферментный иммуноанализ и гемолитический анализам. В одном примере анализы invitro могут быть выполнены с использованием очищенных белков комплемента. В другом примере анализы invivo могут быть выполнены путем тестирования сыворотки вида, включая виды млекопитающих или человека, для функциональной активации комплемента. Примеры анализов описаны ниже.

В одном примере анализы invitro можно проводить с использованием очищенного белка C3 комплемента, как показано в примере 2-4. В другом примере анализы invitro можно проводить в физиологически подходящих растворах (т.е. стекловидное тело), как показано в примере 5. В другом примере анализы invitro могут быть выполнены с использованием пептидных библиотек для оценки специфичности расщепления. В другом примере могут быть проведены анализы для оценки нормальных функций модифицированных полипептидов u-PA, те, активность в отношении нормальных субстратов. Различные модели заболевания, известные специалисту в данной области, могут быть использованы для тестирования эффективности полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе на различных опосредованных комплементом заболеваниях и расстройствах.

a. Обнаружение белка

Определение белка представляет собой средство для измерения отдельных компонентов комплемента в образце. Белки комплемента можно обнаружить для оценки непосредственно влияния полипептида u-PA на расщепление белка C3 комплемента, или альтернативно, белки комплемента можно измерить как средство для оценки активации комплемента.Белок C3 комплемента, обработанный в присутствии или в отсутствие полипептида u-PA, можно анализировать с помощью любого одного или нескольких анализов, включая SDS-PAGE, с последующим окрашиванием Кумасси или Вестерн-блоттингом, иммуноферментный анализ, иммуногистохимию, проточную цитометрию, нефелометрию, диффузию агарового геля или радиальную иммунодиффузию. Примеры анализов для определения белка описаны ниже.

i. Анализ методом SDS-PAGE

Анализ белков комплемента в присутствии или в отсутствие увеличения концентраций полипептида u-PA можно осуществлять путем анализа белков SDS-PAGE с последующим детектированием этих белков. В таких примерах белки комплемента могут быть обнаружены путем окрашивания на общий белок, например, с помощью окрашивания Кумасси Синим, серебряным красителем или любым другим способом, известным специалисту в данной области, или Вестерн-блоттингом с использованием поликлональных или моноклональных антител, специфичных к указанному белку.Как правило, очищенный белок комплемента, такой как, например, белок C3 комплемента, может быть инкубирован в присутствии или в отсутствие полипептида u-PA. Обработанный белок комплемента можно разделить на геле SDS-PAGE, после чего следует определение белка в геле, например, окрашиванием Coomasieblue. Обработанный белок может сравниваться с его полноразмерным белком, и продукты распада, образованные расщеплением протеазой белка, могут быть определены.

В другом варианте осуществления образец, такой как, например, сыворотка или плазма человека, может быть обработан в присутствии или в

отсутствие полипептида u-PA или может быть собран после обработки животного или человека или без полипептида u-PA. Образец, обработанный u-PA, можно анализировать на SDS-PAGE, и можно обнаружить специфический белок комплемента, такой как, например, C3, C5 или фактор B, с помощью Вестерн-блоттинга с использованием моноклональных или поликлональных антител к белку. Расщепление белка комплемента можно сравнить с образцом, который не был обработан полипептидом u-PA.

Кроме того, образец можно стимулировать, чтобы инициировать активацию комплемента, такую посредством инкубации с IgG, которая стимулирует активацию классического пути или посредством LPS, который стимулирует активацию альтернативного пути.Образец может быть проанализирован посредством SDS-PAGE для обнаружения любого одного или более нативных белков комплемента для определения присутствия или отсутствия продуктов расщепления указанного белка по сравнению с образцом белка, не обработанного полипептидом u-PA. В таких примерах молекулы эффекторов расщепления нативных белков комплемента также могут быть проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга с использованием моноклональных и поликлональных антител для оценки активации одного или нескольких путей комплемента.

Примеры эффекторных молекул комплемента могут включать, но не ограничиваются ими, C3a, C3d, iC3b, Bb и C5-b9. Например, уменьшение экспрессии в образце Bb может указывать, что полипептид u-PA ингибировал активацию альтернативного пути комплемента. Продукты расщепления эффекторных молекул также могут быть определены для оценки влияния увеличения концентраций полипептида u-PA на расщепление самих эффекторных молекул комплемента.

ii. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА; также называемый твердофазный иммуноферментный анализ; ELISA) представляет собой анализ, используемый для измерения присутствия белка в образце. Обычно измерение белка представляет собой косвенное измерение связывания белка с антителом, которое само по себе химически связано с детектируемым субстратом, таким как фермент или флуоресцентное соединение.

Анализы EIA могут быть использованы для измерения влияния полипептидов u-PA на активацию комплемента путем измерения в присутствии молекулы эффекторной молекулы комплемента, генерируемой после активации комплемента.

В таких примерах образец, такой как, например, сыворотка или плазма человека, может быть предварительно обработан в присутствии или в отсутствие возрастающих концентраций полипептида u-PA и впоследствии активируется для индуцирования активации комплемента путем инкубации с инициирующими молекулами или может быть собран после обработки животного или человека с помощью полипептида u-PA.

Например, классический путь может быть активирован путем инкубации с IgG, и альтернативный путь может активироваться путем инкубации образца с LPS. Анализ активации комплемента, специфический для лектинового пути, требует, что классический путь комплемента подавлялся, поскольку активность расщепления C4/C2 лектинового пути совместно используется с классическим путем комплемента.Ингибирование классического пути может быть достигнуто с использованием буфера с высокой ионной силой, который ингибирует связывание C1q с иммунными комплексами и нарушает комплекс C1, тогда как буфер высокой ионной силы не влияет на активность связывания углеводов MBL. Следовательно, активация лектинового пути может быть вызвана

инкубацией образца, такого как сыворотка или плазма человека, с поверхностью, покрытой маннаном, в присутствии 1 M NaCl.

После активации образец можно гасить добавлением Pefabloc (Roche) и EDTA для минимизации продолжающейся активации путей.Образцы можно анализировать на присутствие молекул эффекторов комплемента методом EIA или ELISA. EIAи ELISA анализы для измерения белков комплемента хорошо известны специалисту в данной области техники. Можно оценить любой продукт активации комплемента. Примеры продуктов активации комплемента для измерения активации комплемента включает iC3b, Bb, C5b -9, C3a, C3a-desArg и C5a-desArg. Активированный путь комплемента может быть определен в зависимости от измеренного продукта активации комплемента. Например, измерение продукта расщепления Bb является уникальным маркером альтернативного пути.

В некоторых примерах, EIA может быть спарен с обнаружением расщепленных белков комплемента путем анализа обработанного протеазой образца с помощью SDS-PAGE с последующим Вестерн-блоттингом для идентификации конкретных компонентов комплемента. Используя программное обеспечение денситометрии, расщепление продукта комплемента можно сравнить с полноразмерным компонентом комплемента, расщепленным на протяжении анализа, и может быть определен вид всех основных продуктов деградации и процент расщепления.

iii. Радиальная иммунодиффузия(RID)

Радиальная иммунодиффузия (RID) представляет собой методику, которая основывается на осаждении иммунных комплексов, образованных между антителами, включенными в агарозные гели, и антигеном, присутствующим в тестируемом образце, что приводит к кольцевому осаждению линии вокруг образца Диаметр кольца пропорционален концентрации антитела (или антигена), присутствующего в тестируемом образце.

Путем сравнения диаметра кольца испытуемого образца с известными стандартами можно получить оценку концентрации специфического антитела или антигена.

RID может быть использован для измерения количества белка комплемента в образце. Например, образец, такой как, например, сыворотка или плазма человека, может быть обработан при или без увеличения концентраций полипептида u-PA.Образец, обработанный протеазой, можно добавлять в лунку агарозного геля, который был выполнен с возможностью включения поликлонального или моноклонального антитела против любого из белков комплемента, таких как включая, но не ограничиваясь этим, C3, C5, C6, C7, C9 или фактор B. После удаления неосажденных белков воздействием 0,15 M NaCl осажденные белковые кольца могут быть оценены окрашиванием белковым красителем, таким как, например, двойное пятно CoomassieBrilliantblue.

b. Гемолитические анализы

Функциональные гемолитические анализы дают информацию о функции комплемента в целом. Этот тип анализа использует сенсибилизированные антитела или несенсибилизированные эритроциты овцы. Гемолитические анализы включают общий гемолитический анализ комплемента (CH50), который
измеряет способность классического пути и МАСлизировать овечий RBC. Он зависит от последовательной активации классических компонентов пути (C1-C9) для лизиса овечих эритроцитов, которые были сенсибилизированы оптимальными количествами кроличьих антител против овечих эритроцитов для получения клеточных антиген-антитело-комплексов.Гемолитические анализы также могут включать альтернативный путь CH50 (кролика CH50 или APCH50), который измеряет способность альтернативного пути и МАСлизировать кроличий RBC.

Одна единица CH50 и/или APCH50 определяется как количество или разбавление сыворотки, необходимой для лизиса 50% эритроцитов в тесте.Как правило, для оценки активации комплемента образец, такой как, например, сыворотка человека или плазма человека, может быть обработан в присутствии или в отсутствие увеличения концентраций полипептида u-PA или может быть собран после лечения животного или человека в присутствии или в отсутствие полипептида u-PA.

Обработанный протеазой образец можно затем смешать с овечимиэритроцитами , которые были активированы или сенсибилизированы IgG. Только образец воды, смешанный с эритроцитами барана, может действовать для общего контроля лизиса, чтобы точно оценить процент лизиса анализируемых образцов. Добавление 0,15 M NaCl к образцу может быть произведено для прекращения реакции лизирования. Лизис эритроцитов, индуцированных активацией терминальных компонентов пути комплемента, может быть оценен путем измерения высвобождения гемоглобина.

Измерение может быть проведено по показаниям оптической плотности (OD) образцов с использованием спектрофотометра при OD 415 нм.

В одном из вариантов осуществления изобретения для измерения функциональной активности конкретных компонентов любого пути можно использовать предельные гемолитические анализы разбавления. В таком анализе используется источник сыворотки, который имеет избыток всех компонентов комплемента, но является недостаточным для того, что один из них измеряется в образце, то есть источник среды или сыворотки является обедненным по отношению к специфическому белку. Таким образом, степень гемолиза зависит от присутствия измеряемого компонента в тестируемом образце.В таком анализе очищенный белок комплемента, такой как, например, любой из нативных белков комплемента, включая, но не ограничиваясь ими, C3,

может быть инкубирован в присутствии или в отсутствие увеличения концентраций полипептида u-PA.

Обработанный протеазой очищенный белок комплемента затем может быть смешан с обедненными комплементом средами или плазмой и IgG-активированными овечими эритроцитами, а гемолиз образца можно оценить, как описано выше.В другом варианте осуществления расщепление протеазой может быть коррелировано с активацией комплемента путем анализа гемолитической активности образца, обработанного протеазой, и последующего анализа образца на геле SDS-PAGE с последующим окрашиванием белка, таким как, например, CoomassieBlue.Очищенный белок комплемента, обработанный протеазами, может быть доступен для расщепления, и процент полноразмерного компонента комплемента, расщепленного на протяжении анализа, и вид всех основных продуктов деградации может быть рассчитан. Альтернативно, анализ обработанного протеазой белка комплемента может быть проведен через вестерн-блоттинг.

Альтернативой гемолитическому анализу, называемому иммуноферментным анализом,LIA, липосомныйиммуноанализ, может быть использован для оценки активации классического пути. LIA (WacoChemicalsUSA, Richmond, Va) использует динитрофенил (DNP)-покрытые липосомы, которые содержат фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу.Когда сыворотку смешивают с липосомами и субстратом, содержащим анти-DNP антитело, глюкозо-6-фосфат и никотинамидадениндинуклеотид, активированные липосомылизируются, и происходит ферментативная колориметрическая реакция, которая пропорциональна суммарной классической активности комплемента.

c. Способы определения сайтов расщепления

Последовательности расщепления в белке C3 комплемента можно идентифицировать любым способом, известным в данной области (см. например, опубликованную публикацию США № 2004/0146938).

В одном примере последовательность расщепления определяют путем инкубирования белка C3 комплемента с любым модифицированным полипептидом u-PA, предусмотренным в данном документе.

После инкубации с полипептидом u-PA, белок C3 может быть отделен SDS-PAGE, и продукты разложения могут быть идентифицированы окрашиванием белковым красителем, таким как CoomassieBrilliantBlue.Протеолитические фрагменты могут быть секвенированы для определения идентичности последовательностей расщепления. После идентификации флуорогенные пептидные субстраты, сконструированные на основе последовательности расщепления желаемой целевой подложки, могут быть использованы для оценки активности, как описано ниже.

2. Способы оценки активности u-PAдикого типа

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, имеют измененную или пониженную специфичность плазминогена и uPAR. Полипептиды U-PA могут быть протестированы для определения, сохраняют ли они каталитическую эффективность и/или специфичность субстрата для нативногоплазминогена-субстрата. Например, расщепление плазминогена может быть оценено с помощью инкубирования полипептида u-PA с плазминогеном и обнаружения продуктов расщепления белка. В другом примере расщепление плазминогена может быть определено invitro путем измерения расщепления флуоресцентно меченого тетрапептида пептидного субстрата, например флуорогенного субстрата, такого как флуорофоры ACC (7-амино-4-карбамоилметилкумарин) или AMC (7-амино-4-метилкумарин), связанный с тетрапептидным субстратом.В некоторых примерах анализы активации плазминогена используются для определения специфичности полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе. В других примерах, определяется способность полипептидов u-PA, обеспеченных в настоящем документе, связываться с u-PA-рецептором (uPAR).

a. Расщепление плазминогена

В одном примере модифицированные полипептиды u-PA могут быть проанализированы с использованием индивидуальных флуорогенных пептидных субстратов, соответствующих желаемой последовательности расщепления. Например, способ анализа модифицированной u-PA протеазы, которая может расщеплять любую одну или более из желаемых последовательностей расщепления, включает: (a) контактирование пептидного флуорогенного образца (содержащего требуемую последовательность расщепления в качестве мишени)
протеазой, посредством чего флуорогенный фрагмент высвобождается из последовательности пептидного субстрата после действия протеазы, тем самым получая флуоресцентную среду; и (b) наблюдение, подвергается ли образец обнаруживаемому изменению флуоресценции, обнаруживаемое изменение является показателем присутствия ферментативно активной протеазы в образце.

В таком примере желаемая последовательность расщепления выполняется в флуорогенном пептиде способами, известными в данной области техники.В одном варианте осуществления, отдельные последовательности отщепления пептидов могут быть присоединены к флуорогенно-меченному субстрату, такому как, например, ACC или AMCфлуорогенная уходящая группа, и высвобождение флуорогенного фрагмента может быть определено как мера специфичности протеазы для последовательности расщепления пептида. Скорость увеличения флуоресценции целевой последовательности расщепления может быть измерена, например, с помощью флуоресцентного спектрофотометра.
Скорость увеличения флуоресценции может быть измерена с течением времени. Кинетические константы Michaelis-Menton могут быть определены стандартными кинетическими способами. Кинетические константы kcat, Km и kcat/Km могут быть рассчитаны путем построения обратной зависимости концентрации субстрата от обратной скорости расщепления субстрата и

подгонки к уравнению Lineweaver-Burk (1/скорость = (Km/Vmax) (1/[S]) + 1/Vmax; где Vmax = [ET] kcat).

Константа скорости второго порядка или константа специфичности (kcat/Km) является мерой того, насколько хорошо субстрат разрезается конкретной протеазой. Например, может быть получен ACC-или AMC-тетрапептид, такой как Ac-CPGR-AMC, и инкубирован с модифицированным полипептидом u-PA, представленным в настоящем документе, и активность полипептида u-PA может быть оценена путем анализа высвобождения флуорогенного фрагмента. Выбор тетрапептида зависит от желаемой последовательности расщепления до мишени и может быть эмпирически определен.

В других вариантах осуществления полипептиды u-PA также могут быть проанализированы для установления того, что, когда в активной форме, расщепляют ли они желаемую последовательность, когда они представлены в контексте полноразмерного белка. В одном примере очищенный целевой белок, т.е плазминоген может быть инкубирован в присутствии или в отсутствие выбранного. полипептида u-PA, и событие расщепления может контролироваться SDS-PAGE с последующим окрашиванием CoomassieBrilliantBlue для белка и анализом продуктов расщепления с использованием денситометрии.

b. Анализ активации плазминогена

Любой анализ, известный специалисту в данной области, может быть использован для определения того, активированы ли полипептиды u-PAплазминогена. В одном примере активация плазминогена может быть определена путем инкубации полипептидов в присутствии плазминогена и детектируемого субстрата плазмина, такого как, например, хромогенный субстрат H-D-Val-Leu-Lys-p-нитроанилид (ChromogenixS-2251) или флуорогенный субстратH-D-Val-Leu-Lys-7-amido-4-метилкумарин.Затем проводят мониторинг гидролиза путем измерения поглощения при 405 нм или путем детектирования флуоресценции с использованием устройства считывания

флуоресцентной пластины с длиной волны возбуждения 390 нм и длиной волны излучения 480 нм. В другом примере активация плазминогена оценивается, в то время как полипептиды u-PA связаны с uPAR.В этом примере полипептиды u-PA сначала связываются с uPAR на клеточной поверхности, такой как клетка u397, с последующим добавлением плазминогена и детектируемого субстрата плазмина, а гидролиз измеряют, как описано выше.

c. Анализы присоединения u-PA-uPAR

Связывание полипептидов u-PA с uPAR может быть оценено с помощью любого анализа, известного специалисту в данной области техники, для обнаружения взаимодействий белок-белок, включая, но не ограничиваясь этим, анализы связывания твердой фазы, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс и FACS. В одном из примеров можно использовать ELISA. Рекомбинантный uPAR иммобилизуют на микротитрационном планшете и оценивают связывание полипептида u-PA добавлением реагента, который специфически связывается с u-PA, таким как, например, u-PA-связывающее антитело. В другом примере связывание может быть определено в анализе на основе клеток с использованием клеточной линии, такой как, например, клетки u397, которые экспрессируют u-PA рецептор. Полипептиды u-PA могут быть помечены, например, хромогенным, флуорогенным или радиоактивным субстратом для осуществления обнаружения связывания.

d. Расщепление C3

Активность модифицированных полипептидов uPA можно оценить путем расщепления белка комплемента человека C3 путем измерения количества интактного человеческого C3, остающегося после инкубации с различными концентрациями модифицированной протеазы uPA. В соответствии с данным анализом сигнал генерируется в присутствии интактного человеческого C3 и теряется при расщеплении C3. В других примерах анализы

активации C3 используют для определения специфичности модифицированных полипептидов uPA, представленных в настоящем документе.

Очищенный белок C3 может быть инкубирован с модифицированными полипептидами u-PA, а остаточные уровни нерасщепленного белка C3 человека можно количественно определить с помощью любого анализа, известного в данной области техники, для оценки концентрации белка, такой как, например, с использованием усиленного люминесцентного бесконтактного анализа (AlphaScreen ®; PerkinElmer).

Смесь полипептида C3/uPA инкубируют с акцепторными гранулами, покрытыми IgG мыши, и после инкубации смесь α-hC3 mAb/акцептор инкубируют с биотинилированнымα-hC3 pAb. Затем к смеси добавляют покрытые стрептавидином донорные шарики и затем измеряют сигнал «альфаскрин» (возбуждение = 680 нм, эмиссия = 570 нм). Этот сигнал соответствует концентрации оставшегося белка C3.Концентрация полипептида uPA, необходимого для расщепления на 50% доступного hC3 (EC50), может быть рассчитана.

ACC-AGR + ELISA

В настоящем документе предложены способы оценки субстратной специфичности модифицированных полипептидов u-PA. Применение флуорогенного пептидного субстрата, такого как, например, 7-амино-4-метилкумарин (AMC) флуорогенный пептидный субстрат или 7-амино-4-карбамоилметилкумарин (ACC) флуорогенный пептидный субстрат, может быть использовано для определения активности модифицированной протеазы, в результате чего флуорогенный фрагмент высвобождается из пептидного субстрата при действии протеазы, и высвобождение флуорогенного фрагмента может быть определено как мера специфичности протеазы для последовательности расщепления пептида. Скорость увеличения

флуоресценции последовательности расщепления нецелевогосубстрата или последовательности расщепления мишени может быть измерена, например, с помощью флуоресцентного спектрофотометра. Скорость увеличения флуоресценции может быть измерена с течением времени. Кинетические константы Michaelis-Menton могут быть определены стандартными кинетическими способами. Кинетические константы kcat, Km и kcat/Km могут быть вычислены путем построения обратной зависимости концентрации субстрата от обратной скорости расщепления субстрата и подгонки к уравнению Lineweaver-Burk

$$1/\text{скорость}=(K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}; \text{ где } V_{max}=[ET]k_{cat}).$$

Константа специфичности (kcat/Km) является мерой того, насколько хорошо субстрат разрезается конкретной протеазой.

В одном примере любая одна или более последовательностей расщепления белка комплемента могут быть определены и использованы в качестве желаемой последовательности расщепления мишени. Например, любая одна или более последовательностей расщепления C3. В другом примере, последовательность, соответствующая субстрату протеазы дикого типа, может быть использована для определения остаточной активности протеазы.

В дополнительном варианте осуществления полноразмерный белок комплемента может быть использован в качестве субстрата-мишени для определения специфичности протеазы по сравнению с полноразмерным нативным целевым субстратом протеазы. Кроме того, полноразмерный белок комплемента может быть использован для оценки корреляции между специфичностью субстрата и расщеплением протеазой полноразмерного субстрата-мишени по сравнению с четырьмя аминокислотами P1-P4 последовательности расщепления субстрата, содержащимися в целевой подложке.

В одном примере полноразмерный белок C3 может быть использован в качестве целевой мишени расщепления любой одной или нескольких протеаз

для оценки специфичности. В этом примере расщепление C3 модифицированной протеазой может сравниваться с расщеплением другого полноразмерногосубстрата, или расщепление может быть сравнено с расщеплением флуорогенноготетрапептидаC3.Константа специфичности расщепления белка полной длины протеазой может быть определена с использованием денситометрии геля для оценки изменений денситометрии во времени полноразмерного целевого субстрата, инкубированного в присутствии протеазы.

В дополнительном варианте осуществления активность модифицированного полипептида u-PA может быть оценена после продолжительной инкубации в плазме или стекловидном теле. В одном примере остаточная протеазная активность анализируется флуорогенным субстратом AGR-ACC (7-амино-4-карбамоилметил-кумарин) после инкубации в 80% Cynomolgusvitreoushumor. Например, модифицированный полипептид u-PASEQIDNO: 21 проявляет сравнимую способность расщеплять флуорогенный субстрат AGR-ACC через 7 дней инкубирование в стекловидном теле и PBS. В другом примере модифицированный полипептид u-PASEQIDNO: 21 расщепляет флуорогенный субстрат AGR-ACC на подобных уровнях до и после 7-дневного инкубирования в стекловидном теле.

Оценка специфичности с использованием пептидных библиотек

В настоящем документе предложены способы оценки субстратной специфичности полученных модифицированных полипептидов u-PA с использованием пептидных библиотек, связанных с флуорогенными пептидами. Модифицированный полипептид u-PA может быть проверен на специфичность субстрата P1-P4 в любом заданном подсайте с использованием пептидной библиотеки, связанной с флуорогенным субстратом (Harrisetal. (2000) ProcNatlAcadSciU.S.A.97: 7754; US 2004/0175777; US 2004/0146938).

Использование пептидной библиотеки или пептидных библиотек позволяет быстро и эффективно определить протеолитический субстрат. Эта стратегия

включает использование библиотек пептидов, в которых одно положение в библиотеке поддерживается постоянным (т.е. положение P1), в то время как оставшиеся положения (т.е. P4-P2 и/или P1'и/или P2') состоят из всех комбинаций аминокислот, используемых для получения библиотеки.

Применение комбинаторной библиотеки флуорогенного пептидного субстрата, такого как, например, 7-амино-4-метилкумарин (AMC) флуорогенный пептидный субстрат или 7-амино-4-карбамоилметилкумарин (ACC) флуорогенный пептидный субстрат, может быть использовано для определения активности модифицированной протеазы, в результате чего флуорогенный фрагмент высвобождается из пептидного субстрата при действии протеазы.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что эти способы обеспечивают широкий спектр альтернативных форматов библиотеки. В одном примере протеаза может быть спрофилирована с помощью P1 библиотеки. Библиотека тетрапептидаP1 содержит ACC-или AMC-флуорогенныететрапептиды, в результате чего положение P1 систематически поддерживается постоянным, в то время как положения P2, P3 и P4 содержат эквимолярную смесь любых одной или более из 15 аминокислот.Определение и учет конкретных ограничений, относящихся к любому конкретному ферменту или способу определения специфичности субстратной последовательности, находятся в пределах способности специалистов в данной области техники.

Специалисты в данной области техники признают, что для получения пептидов существует много способов. В приведенном в качестве примера варианте осуществления библиотека субстрата экранирована путем прикрепления флуоресцентно меченого субстрата к твердой подложке. В одном примере флуорогенную уходящую группу из пептида-субстрата синтезируют путем конденсации производного N-Fmoc кумарина, с кислотолабильным линкером Rink для получения ACC смолы (Backesetal. (2000) NatBiotech.18: 187). Удаление Fmoc дает свободный амин.Природные, неприродные и модифицированные аминокислоты могут быть связаны с амином, который

может быть получен посредством сочетания дополнительных аминокислот. В альтернативном варианте осуществления флуорогенная уходящая группа может представлять собой 7-амино-4-метилкумарин (AMC) (Harrisetal. (2000) ProcNatlAcadSciU.S.A.97: 7754).После завершения синтеза пептида конъюгат пептид-флуорогенный фрагмент может отщепляться от твердой подложки, или альтернативно, конъюгат может оставаться привязанным к твердой подложке.

Как правило, способ получения флуорогенного пептида или материала, включающего флуорогенный пептид, включает: (a) получение первого конъюгата, содержащего флуорогенный фрагмент, ковалентно связанный с твердой подложкой; (b) приведение в контакт первого конъюгата с первым защищенным аминокислотным фрагментом и активирующим агентом, тем самым образуя пептидную связь между карбоксильной группой и аминным азотом первого конъюгата; (c) снятие защиты, с образованием второго конъюгата, имеющего реакционноспособный аминный фрагмент; (d) приведение в контакт второго конъюгата со второй защищенной аминокислотой и активирующим агентом,

тем самым образуя пептидную связь между карбоксильной группой и реакционноспособной аминной частью; и (e) снятие защиты, с образованием третьего конъюгата, имеющего реакционноспособный аминный фрагмент. В примерном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя: (f) приведение в контакт третьего конъюгата с третьей защищенной аминокислотой и активирующим агентом, тем самым образуя пептидную связь между карбоксильной группой и реакционноспособной аминной частью; и (e) снятие защиты, с образованием четвертого конъюгата, имеющего реакционноспособный аминный фрагмент.

Для аминокислот, которые трудно соединять (например, Ile, Val и тд), свободный, непрореагировавший амин может оставаться на носителе и усложнять последующие операции синтеза и анализа. Специализированная

стадия , использующая 3-нитротриазол-активный сложный эфир уксусной кислоты в DMF, эффективно ацилирует оставшийся анилин. Полученный кумарин с блокированной уксусной кислотой, который может присутствовать в растворе неочищенной субстратной последовательности, как правило, не является последовательностью протеазного субстрата.

Твердофазный синтез пептида, в котором С-концевая аминокислота последовательности присоединена к нерастворимой опоре, с последующим последовательным добавлением оставшихся аминокислот в последовательности является примерным способом получения пептидной цепи полипептидов, предусмотренных в данном документе. Методы твердофазного синтеза описаны NarousandMerrifield, Твердофазный пептидный синтез; pp.3-284 в ThePeptides: Analysis, synthesis, Biology. Vol.2; Specific Methods in peptide synthesis, Part A, Gross and Meienhofer, eds. Academic press, NY, (1980); и Stewart et al. (1984) Solid phase peptide synthesis, 2 nd Ed Pierce Chem Co, Rockford, Ill. Твердофазный синтез наиболее легко выполняется коммерчески доступными пептидными синтезаторами с использованием Fmoc или t-BOC-химии.

Например, синтез пептида может быть осуществлен с использованием хорошо известной химии синтеза Fmoc. Например, боковые цепи Asp, Ser, Thr и Tyr защищены с использованием трет-бутила и боковой цепи остатка Cys с использованием S-тритил и S-трет-бутилтио, и остатки Lys защищены с использованием t-Boc, Fmoc и 4-метилтритила.

Соответствующим образом защищенные аминокислотные реагенты коммерчески доступны или могут быть получены с использованием известных способов. Использование множества защитных групп обеспечивает селективную деблокировку и связывание флуорофора с любой конкретной желаемой боковой цепью. Таким образом, например, снятие защиты t-Boc осуществляют с использованием TFA в дихлорметане.

Снятие защиты Fmoc осуществляют с использованием, например, 20% (об./об.) пиперидина в DMF или N-метилпиролидоне, и снятие защиты 4-метилтритила осуществляют с использованием, например, от 1 до 5% (об./об.) TFA в воде или

1% TFA и 5% триизопропилсилана в DCM. Удаление трет-бутилтиогруппы осуществляют с использованием, например, водного меркаптоэтанола (10%). Удаление трет-бутил, трет-boc и S-тритильных групп осуществляют с использованием, например, TFA: фенол: вода: тиоанизо: этандитио (85: 5: 5: 2,5: 2,5), или TFA: фенол: вода (95: 5: 5).

Разнесение в любом конкретном положении или комбинации положений может быть введено с использованием смеси по меньшей мере двух, шести, 12, 20 или более аминокислот для наращивания пептидной цепи. Смеси аминокислот могут включать любое подходящее количество конкретной аминокислоты в комбинации с любым полезным количеством одной или более различных аминокислот.

В одном варианте осуществления смесь представляет собой изокинетическую смесь аминокислот (смесь в соответствующих соотношениях для обеспечения равной молярной реакционной способности всех компонентов).Модифицированные протеазы, такие как, например, модифицированная протеаза u-PA, описанная в настоящем документе, могут быть проанализированы с использованием индивидуальных флуорогенных пептидных субстратов, соответствующих желаемой последовательности расщепления.

Способ анализа модифицированной протеазы, которая может расщеплять любую одну или более последовательностей расщепления C3, включает: (a) контактирование пептидного флуорогенного образца (содержащего последовательность расщепления C3) с протеазой таким образом, что флуорогенный фрагмент высвобождается из последовательности пептидного субстрата после действия протеазы, тем самым давая флуоресцентный фрагмент;и (b) наблюдение, подвергается ли образец обнаруживаемому изменению флуоресценции, обнаруживаемое изменение является показателем присутствия ферментативно активной протеазы в образце.В таком примере ACC-или AMC-тетрапептид, такой как Ac-AGR-AMC, может быть получен и инкубирован с модифицированной протеазой и активность протеазы может быть оценена путем анализа для высвобождения флуорогенного фрагмента.

Анализ протеазы в растворе просто требует добавления некоторого количества исходного раствора протеазы в флуорогенныйпротеазный индикаторный пептид и измерения последующего увеличения флуоресценции или уменьшения в полосе возбуждения в спектре поглощения. Раствор и флуорогенный индикатор также могут быть скомбинированы и проанализированы в буфере для расщепления, который оптимизирует активность протеазы. Буферы, подходящие для анализа активности протеазы, хорошо известны специалистам в данной области техники.

В общем, буфер выбирают с pH, который соответствует оптимальному значению pH конкретной протеазы. Например, буфер, особенно подходящий для определения активности эластазы, содержит 50 мМ фосфата натрия, 1 мMEDTA при pH 8,9. Измерение наиболее легко выполнено в флуориметре, прибор, который обеспечивает источник ультрафиолетового возбуждения для флуорофора, а затем измеряет свет, впоследствии излучаемый на конкретной длине волны.Сравнение с контрольным индикаторным раствором, лишенным протеазы, дает меру протеазной активности.

Уровень активности может быть точно определен посредством создания стандартной кривой для комбинации протеаза/индикатор, в которой определяется скорость изменения флуоресценции, продуцируемого растворами протеаз известной активности.

Хотя обнаружение флуорогенных соединений может быть осуществлено с использованием флуориметра, обнаружение также может быть осуществлено различными другими способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Таким образом, например, когда флуорофоры излучают в видимых длинах волн, обнаружение может быть просто посредством визуального контроля флуоресценции в ответ на возбуждение источником света.Обнаружение также может быть с помощью системы анализа изображений, использующей видеокамеру, сопряженную с аналого-цифровым преобразователем или другой системой сбора изображений. Обнаружение также может быть посредством визуализации через фильтр, как под флюоресцентным

микроскопом. Микроскоп может давать сигнал, который просто визуализируется оператором. Альтернативно, сигнал может быть записан на фотографической пленке или с использованием системы видеоанализа.Сигнал также может быть просто количественно определен в реальном времени с использованием либо системы анализа изображений, либо фотометра.

Таким образом, например, базовый анализ протеазной активности образца включает суспендирование или растворение образца в буфере (при pH оптимальной для конкретной тестируемой протеазы) или в тестовом состоянии (например, в стекловидном теле или сыворотке), добавление к буферу индикатора флуорогенногопротеазного пептида и мониторинг результирующего изменения флуоресценции с использованием спектрофлуорометра, как показано, например, Harrisetal. (1998) JBiolChem 273: 27364. Спектрофлуориметр установлен с возможностью возбужденияфлуорофора на длине волны возбуждения флуорофора. Флуорогенный индикатор протеаз представляет субстратную последовательность протеазы, которая изменяется при флуоресценции вследствие расщепления протеазой индикатора.

Модифицированные протеазы также анализируют, чтобы убедиться, что они расщепляют желаемую последовательность, когда они представлены в контексте полноразмерного белка. Целевые белковые субстраты, содержащие сайты расщепления C3, находятся в зоне расщепления или активных сайтов C3. Способы оценки расщепления целевого белка описаны в настоящем документе и/или хорошо известны в данной области техники.

В одном примере очищенный белок комплемента, например C3, может быть инкубирован в присутствии или в отсутствие модифицированной протеазы, и событие расщепления может контролироваться с помощью SDS-PAGE с последующим окрашиванием CoomassieBrilliantBlue для белка и анализом продуктов расщепления с использованием денситометрии.Активность целевого белка также анализируется, например, при гемолизе, с использованием способов, описанных в данном документе, или которые хорошо известны в данной области техники, чтобы проверить, что его функция была прекращена посредством события расщепления.

3. Специфичность

Константа специфичности расщепления субстрата-мишени, например, белка C3 комплемента или плазминогена, с помощью модифицированного полипептида u-PA может быть определена с использованием денситометрии геля для оценки изменений денситометрии во времени полноразмерного субстрата-мишени, инкубированного в присутствии полипептида u-PA.В конкретных вариантах осуществления сравнение специфичности модифицированного полипептида u-PA может быть использовано для определения, является ли модифицированный полипептид u-PA измененным, например, с повышенной специфичностью в отношении C3 по сравнению с полипептидом u-PA дикого типа. Специфичность полипептида u-PA для целевой подложки, например, белка C3 комплемента, может быть определена по константе специфичности расщепления субстрата-мишени

по сравнению с нецелевым субстратом (например, нативным субстратом дикого типа u-PA). Отношение констант специфичности модифицированного полипептида u-PA к целевым субстратом C3 по сравнению с нецелевым субстратом, таким как плазминоген, может быть определено для определения соотношения эффективности расщепления модифицированного полипептида u-PA.Сравнение отношения эффективности расщепления между модифицированным полипептидом u-PA и полипептидом u-PA дикого типа может быть использовано для оценки изменения специфичности для целевого субстрата. Специфичность может быть по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз,8,9, 10,20,30, 40,50,60, 70,80,90, 100,200,300, 400,500,600, 700, 800, 900или 1000 раз или более по сравнению со специфичностью полипептида u-PA дикого типа для целевогосубстрата в сравнении с нецелевымсубстратом.

Кинетический анализ расщепления нативных субстратов полипептида u-PA может сравниваться с анализом расщепления желаемых целевых субстратов

в белке C3 комплемента для оценки специфичности модифицированного полипептида u-PA для белка C3 комплемента. Можно оценить константы скорости второго порядка ингибирования (ki) для мониторинга эффективности и реактивности модифицированного полипептида u-PA для белка C3 комплемента.В настоящем документе модифицированные полипептиды u-PA расщепляют C3, так что активация комплемента подавляется, и, как показано в примерах, они имеют значительно большую активность, такую как по меньшей мере 5-кратное увеличение активности, чем немодифицированный полипептид u-PA (или полипептид u-PA, модифицированный заменой C122S, что устраняет свободный цистеин, чтобы тем самым уменьшить агрегацию).Например, модифицированный полипептид u-PASEQIDNO: 21 расщепляет C3 человека в анализе, описанном в данном документе, с EC50 19 нМ, по сравнению с 3380 нМ для домена протеазы дикого типа SEQIDNO: 5.

4. Модели заболевания

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы в любой клинически релевантной модели заболевания, известной специалисту в данной области, для определения их влияния на опосредованные комплементом заболевания или нарушения. Примеры анализов включают, но не ограничиваются ими, анализы для трансплантации, включающие анализы invitro островковых клеток человека (Tjernberg*etal.* (2008) *Transplantation*85:1193-1199) и анализы exvivo с почками свиньи (Fiane*etal.* (1999) *Xenotransplantation* 6:52-65); биосовместимости, в том числе invitro искусственное поверхностно-индуцированное воспаление (Lappegard*etal.*(2008) *J Biomed Mater Res A* 87:129-135; Lappegard*et al.* (2005) *Ann Thorac Surg* 79:917-923; Nilsson *et al.*(1998) *Blood* 92:1661-1667; Schmidt *et al.* (2003) *J Biomed Mater Res A* 66:491-499); воспаление, включающее in vitro E. coli-индуцированноевоспаление(Mollnes*et al.*(2002) *Blood* 100:1867-1877)и комплексом гепарин/протамин-индуцированное воспаление в бабуинах (Soulika*etal.* (2000) *ClinImmunol* 96:212-221); возрастную дегенерацию у кроликов и обезьян и грызунов (Chi*etal.*(2010) *Adv Exp Med Biol* 703:127-135;

Pennesi *et al.* (2012) *Mol. Aspects Med.* 33(4):487-509; Fletcher *et al.* (2014) *Optm. Vis. Sci.* 91(8):878-886; Forest *et al.*, (2015) *Disease Models and Mechanisms* 8:421-427);и отсроченнуюфункцию у свиней(Hantoet *al.*, (2010) *Am J Transplant* 10(11):2421-2430) and dogs (Petrinec*et al.*, (1996) *Surgery* 61:1331-1337).

F. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ КОДИРУЮЩИХ

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ U-PA

Полипептиды модифицированного полипептида u-PA, изложенные в настоящем документе, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники для очистки белка и экспрессии рекомбинантного белка. Полипептиды также могут быть синтезированы химически. Модифицированный или вариант, включающий усеченные формы, может быть сконструирован из полипептида дикого типа с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК. Например, модифицированные полипептиды u-PA могут быть сконструированы из полипептида дикого типа, такого как сайт-направленный мутагенез.

1. Выделение или получение нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды u-PA

Полипептиды могут быть клонированы или выделены с использованием любых доступных способов, известных в данной области техники для клонирования и выделения молекул нуклеиновой кислоты. Такие способы включают PCR-амплификацию нуклеиновых кислот и скрининг библиотек, включая скрининг гибридизации нуклеиновых кислот, скрининг на основе

антител и скрининг на основе активности.Например, когда полипептиды продуцируются рекомбинантными способами, может быть использован любой способ, известный специалистам в данной области техники для идентификации нуклеиновых кислот, которые кодируют желаемые гены. Любой способ, доступный в данной области, может быть использован для получения полной длины или частичной (т.е. охватывающей всю кодирующую область) кДНК или геномной ДНК клона, кодирующей u-PA, например, из клетки или источника ткани.

Способы амплификации нуклеиновых кислот могут быть использованы для выделения молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих желаемый полипептид, включая, например, методы полимеразной цепной реакции (PCR). Примеры таких способов включают использование термоциклераPerkin-ElmerCetus и Taq полимеразы (GeneAmp). Нуклеиновая кислота, содержащая материал, может быть использована в качестве исходного материала, из которого может быть выделена желаемая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид. Например, препараты ДНК и мРНК, экстракты клеток, экстракты тканей, образцы жидкости (например, кровь, сыворотка, слюна) и образцы от здоровых и/или больных субъектов могут быть использованы в способах амплификации. Источник может быть из любых эукариотических видов, включая, но не ограничиваясь ими, позвоночных, млекопитающих, людей, свиней, быков, кошек, птиц, лошадей, собак и других приматов. Библиотеки нуклеиновых кислот также могут быть использованы в качестве источника исходного материала.

Праймеры могут быть сконструированы для амплификации желаемого полипептида. Например, праймеры могут быть сконструированы на основе экспрессированных последовательностей, из которых генерируется желаемый полипептид. Праймеры могут быть сконструированы на основе обратного перевода аминокислотной последовательности полипептида. При желании для амплификации можно использовать вырожденные праймеры.

Олигонуклеотидныепраймеры, которые гибридизуются с последовательностями на 3'- и 5'- концах желаемой последовательности, могут быть использованы в качестве праймеров для амплификации с помощью PCR-последовательностей из образца нуклеиновой кислоты. Праймеры могут быть использованы для амплификации всей полной длины u-PA или ее усеченной последовательности, такой как нуклеиновая кислота, кодирующая любой из растворимых u-PA полипептидов, представленных в настоящем документе. Молекулы нуклеиновой кислоты, генерируемые амплификацией, могут быть секвенированы и подтверждены для кодирования желаемого полипептида.

Дополнительные нуклеотидные последовательности могут быть соединены с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, включая линкерные последовательности, содержащие сайты эндонуклеазы рестрикции, с целью клонирования синтетического гена в вектор, например, вектор экспрессии белка или вектор, предназначенный для амплификации последовательностей ДНК, кодирующих белки ядра.

Кроме того, дополнительные нуклеотидные последовательности, определяющие функциональные элементы ДНК, могут быть функционально связаны с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Примеры таких последовательностей включают, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, предназначенные для облегчения экспрессии внутриклеточного белка, и последовательности секреции, например последовательности гетерологичного сигнала, предназначенные для облегчения секреции белка. Такие последовательности известны специалистам в данной области техники.Дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, задающие участки связывания белка, также могут быть связаны с молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент. Такие области включают, но не ограничиваются ими, последовательности остатков, которые облегчают получение или кодируют белки, которые обеспечивают облегчение захвата фермента в специфические

клетки-мишени или измененяют иным образом фармакокинетику продукта синтетического гена.

Теги и/или другие фрагменты могут быть добавлены, например, для содействия обнаружению или аффинной очистке полипептида. Например, дополнительные последовательности нуклеотидных остатков, такие как последовательности оснований, задающие эпитопную метку или другой детектируемый маркер, также могут быть связаны с молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент. Примеры таких последовательностей включают в себя последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие SUMO-метку или His-метку или метку Flag.

Идентифицированные и выделенные нуклеиновые кислоты затем могут быть вставлены в соответствующий клонирующий вектор. Может быть использовано большое количество систем-хозяев, известных в данной области техники. Возможные векторы включают, но не ограничиваются ими, плазмиды или модифицированные вирусы, но векторная система должна быть совместима с используемой клеткой-хозяином.Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, бактериофаги, такие как производные лямбда, или плазмиды, такие как pCMV4, pBR322 или производные плазмид pUC, или вектор Bluescript (Stratagene, LaJolla, CA). Введение в клонирующий вектор может, например, быть осуществлено путем лигирования фрагмента ДНК в клонирующий вектор, который имеет комплементарные «липкие» концы. Введение может осуществляться с использованием клонирующих векторов TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Если комплементарные сайты рестрикции, используемые для фрагмента ДНК, не присутствуют в клонирующем векторе, концы молекул ДНК могут быть ферментативно модифицированы. Альтернативно, любой желаемый участок может быть получен путем лигирования нуклеотидных последовательностей (линкеров) на концы ДНК; эти лигированные линкеры могут содержать специфические химически синтезированные олигонуклеотиды, кодирующие последовательности распознавания эндонуклеазы рестрикции. В

альтернативном способе расщепленный вектор и ген белка могут быть модифицированы гомополимерными хвостами.

Рекомбинантные молекулы могут быть введены в клетки-хозяева через, например, трансформацию, трансфекцию, инфекцию, электропорацию и сонопорацию, так что генерируются многие копии генной последовательности. В конкретных вариантах осуществления трансформация клеток-хозяев рекомбинантными молекулами ДНК, которые включают выделенный ген белка, кДНК или синтезированную последовательность ДНК, позволяет генерировать множество копий гена.Таким образом, ген может быть получен в больших количествах путем выращивания трансформантов, выделения рекомбинантных молекул ДНК из трансформантов и, при необходимости, извлечения введенного гена из выделенной рекомбинантной ДНК.

В дополнение к рекомбинантному получению модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть получены с помощью прямого пептидного синтеза с использованием твердофазных методов (см. например,Stewart*etal.*(1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co., San Francisco; Merrifield J (1963) *J Am Chem Soc.*, 85:2149-2154).Синтез белка invitro может быть осуществлен с использованием ручных технологий или посредством автоматизации. Автоматизированный синтез может быть достигнут, например, с использованием AppliedBiosystems 431APeptideSynthesizer (PerkinElmer, FosterCityCA) в соответствии с инструкциями, обеспечиваемыми производителем. Различные фрагменты полипептида могут быть химически синтезированы отдельно и комбинированы с использованием химических способов.

В настоящем документе также предложены способы экспрессии активных или активируемых или активируемых форм модифицированных полипептидов u-PA, таких как двухцепные активированные формы и димеры.

Как обсуждено и описано в настоящем документе, и в качестве примера в примерах 14-16, можно приготовить нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированные слитые белки u-PA. Нуклеиновые кислоты кодируют модифицированные домены протеазы u-PA, связанные с нуклеиновой кислотой, кодирующей другие последовательности, включая, но не ограничиваются ими, сигналы секреции, такие как,

например, сигнальная последовательность u-PA, сигнальная последовательность IgGkapp и сигнальная последовательность IL -2, N-концевая часть u-PA (для получения полноразмерной u-PA), последовательности активации, такие как, например, последовательность активации u-PA или последовательность фурана, и партнеры слияния, такие как альбумин, для изменения свойств u-PA, например, период полужизни в сыворотке и/или последовательность, такая как HisTag и/или SUMO для увеличения экспрессии и/или облегчения выделения.

Эти молекулы нуклеиновой кислоты могут экспрессироваться в подходящих клетках-хозяевах, хорошо известных специалистам в данной области техники, для получения модифицированного u-PA и/или слитого белка. Как правило, нуклеиновые кислоты кодируют сигнальную последовательность или другую последовательность переноса для секреции или переноса в локус для очистки. Включение нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность активации, можно использовать для получения активированной формы модифицированного полипептида u-PA.

2. Получение мутантных или модифицированных нуклеиновых кислот и кодирующих полипептиды

Модификации, представленные в настоящем документе, могут быть получены стандартными методами рекомбинантной ДНК, известными для специалиста в данной области техники. Любой способ, известный в данной области техники, для осуществления мутации любой одной или более аминокислот в целевом белке может быть использован. Способы включают стандартный сайт-направленный мутагенез (с использованием, например,

набора, такого как QuikChange, доступный от Stratagene) кодирующих молекул нуклеиновой кислоты, или методами твердофазного полипептидного синтеза.

3. Векторы и клетки

Для рекомбинантной экспрессии одного или более желаемых белков, таких как любой модифицированный полипептид u-PA, описанный в настоящем документе, нуклеиновая кислота, содержащая все или часть нуклеотидной последовательности, кодирующей белок, может быть вставлена в соответствующий вектор экспрессии, т.е. вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной последовательности, кодирующей белок.Необходимые транскрипционные и трансляционные сигналы также могут быть поданы нативным промотором для ферментных генов и/или их фланкирующих областей.

Также предусмотрены векторы, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую фермент. Предусмотрены также клетки, содержащие векторы. Клетки включают эукариотические и прокариотические клетки, и векторы являются любыми подходящими для использования в них. Как правило, клетка представляет собой клетку, которая способна осуществлять гликозилирование кодируемого белка.

Предложены прокариотические и эукариотические клетки, содержащие векторы. Такие клетки включают бактериальные клетки, дрожжевые клетки, грибковые клетки, растительные клетки, клетки насекомых и клетки животных. Клетки используют для получения их белка путем выращивания вышеописанных клеток в условиях, при которых кодируемый белок экспрессируется клеткой, и выделение экспрессированного белка. Для этих целей, например, фермент может быть секретирован в среду.

Штамм клеток-хозяев может быть выбран по его способности модулировать экспрессию вставленных последовательностей или обрабатывать экспрессированный белок желаемым образом. Такие модификации полипептида

включают, но не ограничиваются ими, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование.

Посттрансляционная обработка может влиять на складывание и/или функцию полипептида.Различные клетки-хозяева, такие как, но не ограничиваясь этим, CHO (DG44, DXB11, CHO-K1), HeLa, MCDK, 293 и W38 имеют специфические клеточные механизмы и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и обработки введенного белка. Как правило, выбор клетки является таким, который способен обеспечить введениеN-связанного гликозилирования в экспрессируемый полипептид. Следовательно, предложены эукариотические клетки, содержащие векторы.Примерами эукариотических клеток являются клетки яичника китайского хомячка (CHO). Например, клетки CHO, дефицитные подигидрофолатредуктазе (например, клетки DG44), используются для получения полипептидов, представленных в настоящем документе.

Предложены векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует модифицированный полипептид u-PA, связанный с нативной или гетерологичной сигнальной последовательностью, а также множество их копий. Векторы могут быть выбраны для экспрессии белка фермента в клетке или так, что белок фермента экспрессируется как секретируемый белок.

В одном варианте осуществления предусмотрены векторы, содержащие последовательность нуклеотидов, которая кодирует полипептид, который обладает протеазной активностью и содержит всю или часть домена протеазы, или множество их копий. Предусмотрены также векторы, которые содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует протеазную область и дополнительные части протеазного белка до и включая полноразмерный протеазный белок, а также множество их копий.

Векторы могут быть выбраны для экспрессии скаффолда или модифицированного протеазного белка или его протеазного домена в клетке или так, что протеазный белок экспрессируется как секретируемый белок. Когда домен протеазы экспрессируется, нуклеиновая кислота связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнал секреции, такой как сигнальная последовательность сигнала Saccharomycescerevisiae или его часть, или последовательность нативных сигналов.

Для экспрессии кодирующей белок последовательности можно использовать множество систем-хозяев. Они включают, но не ограничиваются ими, клеточные системы млекопитающих, инфицированные вирусом (например, вирусом осповакцины, аденовирусом и другими вирусами); клеточные системы насекомых, инфицированные вирусом (например, бакуловирус); микроорганизмы, такие как дрожжи, содержащие дрожжевые векторы; или бактерии, трансформированные бактериофагом, ДНК, плазмидной ДНК или космидной ДНК. Экспрессионные элементы векторов различаются по своей силе и специфичностям.

В зависимости от используемой системы-хозяина можно использовать любой из ряда подходящих элементов транскрипции и трансляции.

Любые способы, известные специалистам в данной области техники, для вставки фрагментов ДНК в вектор можно использовать для конструирования экспрессионных векторов, содержащих химерный ген, содержащий соответствующие транскрипционные/трансляционные контрольные сигналы и последовательности, кодирующие белок. Эти способы могут включать рекомбинантную ДНК invitro и синтетические способы и рекомбиназыinvivo (генетическая рекомбинация). Экспрессия последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих белок, или домены, производные, фрагменты или их гомологи, может регулироваться второй последовательностью нуклеиновой кислоты, так что гены или их фрагменты экспрессируются в хозяине, трансформированном молекулой (ами) рекомбинантной ДНК.

Например, экспрессия белков может контролироваться с помощью любого промотора/энхансера, известного в данной области техники.В

конкретном варианте осуществления промотор не является нативным для генов желаемого белка. Промоторы, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются ими, промотор SV40 (BernoistandChambon, Nature 290: 304-310 (1981)), промотор, содержащийся в 3'- конце вируса саркомы Payca (Yamamotoetal. Cell 22: 787-797 (1980)), промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagneretal. ProcNatlAcadSciUSA 78: 1441-1445 (1981)),регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinsteretal. Nature 296: 39-42 (1982)); прокариотические экспрессионные векторы, такие как tac промотор (Jayetal. (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78: 5543) илипромотор tac (DeBoer et al. Proc Natl Acad Sci USA 80: 21-25 (1983); см. также "Полезныебелкиизрекомбинантныхбактерий": в Scientific American 242: 79-94 (1980)); экспрессионныевекторырастений, содержащиепромоторнопалинсинтетазы (Herrara-Estrella et al. Nature 303: 209-213 (1984)), илипромотор 35S РНК вирусамозаикицветнойкапусты (Garder et al. NucleicAcidsRes.9: 2871 (1981)),и промотор фотосинтетического фермента рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Herrera-Estrellaetal., Nature 310: 115-120 (1984)); промоторные элементы из дрожжей и других грибов, такие как промотор Gal4, промотор алкогольдегидрогеназы, промотор фосфоглицераткиназы, промотор щелочной фосфатазы и следующие участки контроля транскрипции животных, которые проявляют тканеспецифичность и использовались у трансгенных животных: область контроля гена эластазыI, которая активна в панкреатических ацинарных клетках (Swiftetal. Cell 38: 639-646 (1984); Ornitzetal. ColdSpringHarborSymp. Quant.Biol.50: 399-409 (1986);MacDonald, *Hepatology7*:425-515 (1987));область контроля гена инсулина, которая активна в панкреатических бета-клетках (Hanahanetal. Nature 315: 115-122 (1985)), область контроля гена иммуноглобулина, которая активна в лимфоидных клетках (Grossorletal. Cell 38: 647-658 (1984); Adamsetal. Nature 318: 533-538 (1985); Alexanderetal. Mol. CellBiol. 7 : 1436-1444 (1987)), область контроля вируса опухоли молочной железы мыши, которая активна в тестикулярной, молочной, лимфоидной клетках (Lederetal. Cell 45: 485-495 (1986)), область контроля гена альбумина, которая активна в печени (Pinckertetal., *GenesandDevel.1*:268-276 (1987)), область контроля гена альфа-

фетопротеина, которая активна в печени (Krumlauf*etal.*, *Mol. Cell. Biol.5*:1639-1648 (1985); Hammer*etal.*, *Science235*:53-58 (1987)), область контроля гена альфа -1 антитрипсина, которая активна в печени (Kelsey*etal.*, *GenesandDevel.1*:161-171 (1987)), область контроля гена бета глобина, которая активна в миелоидных клетках (Magram*etal.*, *Nature315*:338-340 (1985); Kollias*etal.*, *Cell46*:89-94 (1986)),область контроля гена основного белка миелина, которая активна в клетках олигодендроцитов головного мозга (Readheadetal., Cell 48: 703-712 (1987)), область контроля гена легкой цепи миозина -2, которая является активной в скелетной мышце (Shani, Nature 314: 283-286 (1985)), и область контроля гена гонадотропного высвобождающего гормона, которая является активной в гонадотропиях гипоталамуса (Masonetal. Science 234: 1372-1378 (1986)).

В конкретном варианте осуществления используется вектор, который содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновыми кислотами, кодирующими желаемый белок, или домен, фрагмент, производное или гомолог, один или более источников репликации и, возможно, один или более селектируемых маркеров (например, ген устойчивости к антибиотикам). В зависимости от системы экспрессии конкретные сигналы инициирования также требуются для эффективного перемещения последовательности u-PA.Эти сигналы включают кодон инициации ATG и смежные последовательности.

В случаях, когда инициирующий кодон и вышестоящие последовательности u-PA или их каталитически активных фрагментов вставляются в соответствующий вектор экспрессии, нет необходимости в дополнительных трансляционных сигналах управления. В случаях, когда вставляют только кодирующую последовательность или ее часть, должны быть предоставлены экзогенные сигналы управления транскрипцией, включающие в себя инициирующий кодон ATG.

Кроме того, инициирующий кодон должен находиться в правильной рамке считывания для обеспечения транскрипции всей вставки. Экзогенные транскрипционные элементы и инициирующие кодоны могут быть различного происхождения, природные и синтетические. Эффективность экспрессии может

быть усилена включением энхансеров, подходящих для клеточной системы при использовании (Scharfetal. (1994) Results Probl cell Dises 20: 125-62; Bittaner et al. (1987) Methods in Enzymol, 153: 516-544).

Иллюстративные плазмидные векторы для трансформации клеток E.coli включают, например, векторы экспрессии pQE (доступные от Qiagen ®, Valencia, CA; см. также литературу, опубликованную Qiagen ®, описывающей систему). Векторы pQE имеют промотор фага T5 (распознаваемый РНК-полимеразой E. coli) и двойной модуль репрессии оператора для обеспечения плотного регулируемого, высокого уровня экспрессии рекомбинантных белков в E. coli, синтетического рибосомального сайта связывания (RBSII) для эффективного трансляции, 6 xHis-кодирующей последовательности, t0 и t1 терминаторов транскрипции, начала репликации ColE1 и гена бета-лактамазы для придания устойчивости к ампициллину.

Векторы pQE позволяют разместить метку 6xHis либо на N -, либо C-конце рекомбинантного белка.Такие плазмиды включают pQE 32, pQE 30 и pQE 31, которые обеспечивают множество сайтов клонирования для всех трех считывающих рамок и обеспечивают экспрессию вN-конце 6xHis-меченых белков.

Другие иллюстративные плазмидные векторы для трансформации клеток E.coli включают, например, векторы экспрессии pET (см. патент США 4952496; доступный от Novagen ®, Madison, WI; см. также литературу, опубликованную Novagen ®, описывающую систему).

Такие плазмиды включают pET 11a, который содержит промотор T7lac, терминатор T7, индуцируемый lac оператор E. coli и ген lac-репрессора; pET 12a-c, который содержит промотор T7, терминатор T7 и сигнал секреции ompT E. coli; и pET 15b и pET19b (Novagen ®, Madison, WI), которые содержат лидерную последовательность His-TagTM для использования при очистке с His-колонкой и сайт расщепления тромбина, который обеспечивает возможность расщепления после очистки над колонкой, промоторную область T7-lac и терминатор T7.

Как правило, векторы могут представлять собой плазмиду, вирусные или другие, известные в данной области техники, используемые для экспрессии модифицированного полипептида u-PAinvivo или invitro. Например, модифицированный полипептид u-PA экспрессируется в клетках млекопитающих, включая, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO).

Могут быть использованы вирусные векторы, такие как векторы аденовируса, ретровируса или векторы вируса осповакцины. В некоторых примерах вектор представляет собой дефектный или аттенуированныйретровирусный или другой вирусный вектор (см. USPatent № 4, 980286). Например, может быть использован ретровирусный вектор (см. Milleretal. MethEnzymol.217: 581-599 (1993)). Эти ретровирусные векторы были модифицированы для удаления ретровирусных последовательностей, которые не являются необходимыми для упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина.В некоторых примерах вирусы, с нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный полипептид u-PA, могут способствовать их репликации и распространению в пределах целевой ткани. Вирус также может представлять собой литический вирус или нелитический вирус, где вирус избирательно реплицируется под тканеспецифическим промотором.

По мере того, как вирусы реплицируются, коэкспрессия полипептида u-PA с вирусными генами будет способствовать распространению вируса invivo.

4. Экспрессия

Модифицированные полипептиды u-PA могут быть получены любым способом, известным специалистам в данной области, включая способы invivo и invitro. Желательные белки можно экспрессировать в любом организме, подходящем для получения требуемых количеств и форм белков, таких как, например, необходимые для введения и лечения. Экспрессионные хосты включают прокариотические и эукариотические организмы, такие как E.coli,

дрожжи, растения, клетки насекомых, клетки млекопитающих, включая клеточные линии человека и трансгенные животные.Экспрессионные хосты могут различаться по своим уровням продуцирования белка, а также к типам посттрансляционных модификаций, которые присутствуют на экспрессируемых белках. Выбор экспрессионного хозяина может быть сделан на основе этих и других факторов, таких как соображения безопасности , затраты на производство и необходимость и способы очистки.

Многие векторы экспрессии доступны и известны специалистам в данной области техники и могут быть использованы для экспрессии белков. Выбор вектора экспрессии будет зависеть от выбора системы экспрессии хозяина. В общем, экспрессионные векторы могут включать транскрипционные промоторы и, возможно, энхансеры, трансляционные сигналы и сигналы терминации транскрипции и трансляции.Экспрессионные векторы, которые используются для стабильной трансформации, обычно имеют селектируемый маркер, который обеспечивает возможность выбора и поддержания трансформированных клеток. В некоторых случаях начало репликации может быть использовано для увеличения числа копий вектора.

Модифицированные полипептиды u-PA также можно использовать или экспрессировать в виде слитых белков. Например, для добавления дополнительных функциональных возможностей к ферменту может быть сформировано слияние ферментов. Примеры белков слияния ферментов включают, но не ограничиваются ими, слияния последовательности сигналов, метку, такую как для локализации, например, метку his6 или метку myc, или метку для очистки, например, слияние GST, и последовательности для направления секреции белка и/или ассоциации мембран.

Например, модифицированный полипептид u-PA, описанный в настоящем документе, является таким, который генерируется путем экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен протеазы, представленный в любой из SEQIDNO: 1-6, 8-44 и 52-75, или последовательность аминокислот, которая проявляет по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 84%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%,96 %, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью, представленной в любом из SEQIDNO: 1-6, 8-44 и 52-75.

Для длительного, высокопроизводительного получения рекомбинантных белков желательна стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют модифицированный полипептид u-PA, могут быть трансформированы с использованием векторов экспрессии, которые содержат вирусные источники репликации или эндогенные элементы экспрессии и селектабельный маркерный ген.

После введения вектора можно дать возможность расти клеткам в течение 1-2 суток в обогащенной среде до их переключения на селективные среды. Цель селектабельного маркера состоит в обеспечении устойчивости к выбору, и его присутствие обеспечивает рост и восстановление клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности. Устойчивые клетки стабильно трансформированных клеток можно пролиферировать с использованием методов тканевой культуры, подходящих для типов клеток.

Для восстановления трансформированных клеточных линий можно использовать любое количество систем селекции. Они включают, но не ограничиваются ими, тимидинкиназы вируса герпеса (Wigleretal. (1977) Cell 11: 223-232) и аденинфосфорибозилтрансферазы гены (LowyIetal. (1980) Cell, 22: 817-23), которые могут быть использованы в TK-или APRT-клетках, соответственно. Кроме того, в качестве основы может быть использован антиметаболит, антибиотик или гербицидное сопротивление. Например, DHFR, который придает устойчивость к метотрексату (WiglerMetal. (1980) ProcNatlAcadSci, 77: 3567-70); npt, который придает устойчивость к аминогликозидам неомицину и G -418 (Colbere-GarapinFetal (1981) JMol. Biol. 150: 1-14); и als или pat, которые придают устойчивость к хлорсульфурон- и фосфинотрицинацетилтрансферазе, соответственно, могут быть использованы.

Были описаны дополнительные селектабельные гены, например trpB, которые позволяют клеткам использовать индол вместо триптофана, или hisD, что позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина (HartmanSC и RCMulligan (1988) ProcNatlAcadSci, 85: 8047-8051).Видимые маркеры, такие как, но не ограничиваясь ими, антоцианины, бета-глюкуронидаза и ее субстрат, GUS и люцифераза и ее субстрат люциферина, также могут быть использованы для идентификации трансформантов, а также для количественного определения количества транзиторной или стабильной экспрессии белка, свойственной конкретной векторной системе (RhodesCAetal. (1995) MethodsMol. Biol.55: 121-131).

Присутствие и экспрессия полипептидов u-PA могут контролироваться. Например, определение функционального полипептида может быть проведено путем тестирования кондиционированных сред на активность фермента гиалуронидазы в соответствующих условиях. Приведенные в качестве примера анализы для оценки растворимости и активности экспрессируемых белков представлены в настоящем документе.

a. Прокариотические клетки

Прокариоты, особенно E. coli, обеспечивают систему для получения больших количеств белков. Трансформация E. coli представляет собой простой и быстрый способ, хорошо известный специалистам в данной области техники.

Экспрессионные векторы для E.coli могут содержать индуцибельные промоторы; такие промоторы полезны для индукции высоких уровней экспрессии белка и для экспрессии белков, которые проявляют некоторую токсичность для клеток-хозяев.Примеры индуцибельных промоторов включают в себя промотор lac, промотор trp, гибридный промотор tac, промоторы РНК Т7 и SP6 и регулируемый по температуре промотор лямбда-PL.

Белки, такие как любые представленные в настоящем документе, могут быть экспрессированы в цитоплазматической среде E. coli, цитоплазма представляет собой восстановительную среду и для некоторых молекул это

может привести к образованию нерастворимых тел включения. Для ресолюбилизации белков можно использовать восстановители, такие как дитиотреотол и бета-меркаптоэтанол и денатурирующие агенты, такие как гуанидин-HCl и мочевина.Альтернативный подход заключается в экспрессии белков в периплазматическом пространстве бактерий, которая обеспечивает окисляющую среду и шаперонин-подобные и дисульфидные изомеразы и может приводить к получению растворимого белка. Как правило, лидерная последовательность сливается с белком, который должен экспрессироваться, который направляет белок в периплазму.

Затем лидер удаляют сигнальными пептидазами внутри периплазмы. Примеры лидерных последовательностей периплазматического нацеливания включают лидер pelB из гена лиазыпектата и лидер, полученный из гена щелочной фосфатазы. В некоторых случаях периплазматическая экспрессия позволяет прохождение экспрессированного белка в культуральную среду. Секреция белков обеспечивает быструю и простую очистку от культуры супернатанта.

Белки, которые не секретируются, могут быть получены из периплазмы посредством осмотического лизиса. Подобно цитоплазматической экспрессии, в некоторых случаях белки могут стать нерастворимыми и денатурирующими, и восстанавливающие агенты могут быть использованы для облегчения растворения и рефолдинга. Температура индукции и роста также может влиять на уровни экспрессии и растворимость, обычно используются температуры между 25° C и 37° C.

Как правило, бактерии продуцируют агликозилированные белки. Таким образом, если белки требуют гликозилирования для их функции, гликозилирование можно осуществлять invitro после очистки от клеток-хозяев.

b. Дрожжевые клетки

Дрожжи, такие как *Saccharomycescerevisae, Schizosaccharomycespombe, Yarrowialipolytica, Kluyveromyceslactis* и *Pichiapastoris*, являются хорошо

известными хозяевами для экспрессии дрожжей, которые могут быть использованы для получения белков, таких как любые описанные в настоящем документе.

Дрожжи могут быть трансформированы эписомальнореплицирующимися векторами или стабильной хромосомной интеграцией посредством гомологичной рекомбинации. Как правило, индуцируемые промоторы используют для регуляции экспрессии генов.

Примеры таких промоторов включают GAL1, GAL7 и GAL5 и металлотионеин, такие как CUP1, AOX1 или другие Pichia или другие дрожжевые промоторы. Векторы экспрессии часто включают селектабельный маркер, такой как LEU2, TRP1, HIS3 и URA3, для селекции и поддержания трансформированной ДНК. Белки, экспрессируемые в дрожжах, часто являются растворимыми. Коэкспрессия с шаперонинами, такими как Bip и дисульфидизомераза, может улучшить уровни экспрессии и растворимость.

Кроме того, белки, экспрессируемые в дрожжах, могут быть направлены на секрецию с использованием слитых пептидных сигналов секреции, таких как сигнал секреции альфа-фактора дрожжевого типа, из Saccharomycescerevisae и слияния с белками клеточной поверхности дрожжей, такими как сопряженный с Aga2p адгезионный рецептор или *Arxulaadeninivoran*sглюкоамилаза. Сайт расщепления протеазой, такой как протеаза Kex -2, может быть сконструирован для удаления слитых последовательностей из экспрессированных полипептидов по мере их выхода из пути секреции. Дрожжи также способны гликозилироваться на звеньях Asn-X-Ser/Thr.

c. Насекомые и клетки насекомых

Клетки насекомых, в частности, с использованием бакуловирусной экспрессии, пригодны для экспрессии полипептидов, таких как полипептиды u-PA. Клетки насекомых экспрессируют высокие уровни белка и способны к большей части посттрансляционных модификаций, используемых высшими эукариотами. Бакуловирус имеет рестрикционный хост-диапазон, который

улучшает безопасность и снижает регуляторные проблемы эукариотической экспрессии. Типичные векторы экспрессии используют промотор для экспрессии высокого уровня, такой как промотор полиэдринабакуловируса.

Обычно используемые бакуловирусные системы включают бакуловирусы, такие как вирус ядерного полиэдрозаAutographacalifornica (AcNPV), и вирус ядерного полиэдрозаBombyxmori (BmNPV) и клеточная линия насекомого, такая как Sf9, полученная из *Spodopterafrugiperda*, *Pseudaletiaunipuncta* (A7S) and*Danausplexippus* (DpN1). Для экспрессии с высоким уровнем нуклеотидная последовательность молекулы, подлежащей экспрессии, сливается непосредственно в инициирующем кодоне вируса.

Сигналы секреции млекопитающих точно процессируются в клетках насекомых и могут быть использованы для секреции экспрессированного белка в культуральную среду. Клеточные линии *Pseudaletiaunipuncta* (A7S) and*Danausplexippus* (DpN1) продуцируют белки с гликозилированием, подобным клеточным системам млекопитающих. Приведенные в качестве примера клетки насекомых являются такими, которые были изменены для снижения иммуногенности, в том числе у млекопитающих, такие как с измененными векторами экспрессии бакуловируса, и те, у которых отсутствует фермент Flt3.

Альтернативная система экспрессии в клетках насекомых представляет собой применение стабильно трансформированных клеток. Для экспрессии можно использовать клеточные линии, такие как клетки Schnieder 2 (S2) и Kc (Drosophilamelanogaster) и C7-клетки (Aedesalbopictus). Промотор Drosophilaметаллотионеин может быть использован для индукции высоких уровней экспрессии в присутствии индукции тяжелого металла кадмия или меди. Экспрессионные векторы обычно поддерживаются с помощью селектируемых маркеров, таких как неомицин и гигромицин.

d. Экспрессия у млекопитающих

Системы экспрессии у млекопитающих могут быть использованы для экспрессии белков, включая полипептиды U-PA. Экспрессионные конструкции могут быть перенесены в клетки млекопитающих вирусной инфекцией, такой как аденовирус, или непосредственным переносом ДНК, таким как липосомы, фосфат кальция, DEAE-декстран и физическими средствами, такими как электропорация и микроинъекция.

Экспрессионные векторы для клеток млекопитающих, как правило, включают участок мРНК, TATA, последовательность инициации трансляции (консенсусная последовательность Kozak) и элементы полиаденилирования. IRES-элементы также могут быть добавлены, чтобы позволить бицистронную экспрессию другим геном, таким как селектируемыймаркер.Такие векторы часто включают транскрипционные усилители-энхансеры для экспрессии с высоким уровнем, например промотор-энхансер SV40, промотор цитомегаловируса человека (CMV) и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса (RSV). Эти промоторы-энхансеры активны во многих типах клеток. Области промоторов ткани и клеток и энхансеров также могут быть использованы для экспрессии.Примеры промоторных/энхансерных областей включают, но не ограничиваются ими, гены, такие как эластазаI, инсулин, иммуноглобулин, мышиный вирус молочной железы, альбумин, альфа-фетопротеин, alpha 1 антитрипсин, бета-глобин, миелиновый основной белок, миозина легкая цепь 2 и контроль гена гонадотропного высвобождающего гормона.

Селектабельные маркеры могут быть использованы для выбора и поддержания клеток с помощью экспрессионной конструкции.Примеры селектабельныхмаркерных генов включают, но не ограничиваются ими, гигромицин B фосфотрансферазу, аденозиндезаминазу, ксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу, аминогликозидфосфотрансферазу, дигидрофолатредуктазу (DHFR) и тимидинкиназу. Например, экспрессия может быть выполнена в присутствии метотрексата для отбора только клеток, экспрессирующих ген DHFR.Слияние с сигнальными молекулами клеточной

поверхности, такими как TCR-ζ и $Fc_{\varepsilon}RI$-γможет направлять экспрессию белков в активном состоянии на клеточной поверхности.

Многие клеточные линии доступны для экспрессии в млекопитающих, включая клетки мыши, крысы, обезьяны, курицы и хомяка. Примеры клеточных линий включают, но не ограничиваются ими, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, NS0 мыши (не секретирующие) и другие клеточные линии миеломы, гибридомы и гетерогибридомные клеточные линии, лимфоциты, фибробласты, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 2B8 и клетки HKB.Клеточные линии также доступны для бессывороточной среды, которая облегчает очистку секретируемых белков от среды для культивирования клеток.

Примеры включают клетки CHO-S(Invitrogen ®, Carlsbad, CA, cat # 11619-012) и бессывороточную клеточную линию EBNA -1 (Phametal. (2003) Biotechnol. Bioeng.84: 332-42.). Также имеются линии клеток, которые адаптированы для выращивания в специальных средах, оптимизированных для максимальной экспрессии. Например, клетки CHODG44 адаптированы для выращивания в суспензионной культуре в химически определенной среде, не содержащей животных продуктов.

e. Растения

Трансгенные растительные клетки и растения могут быть использованы для экспрессии белков, таких как любые описанные в настоящем документе. Экспрессионные конструкции обычно переносят на растения с использованием прямого переноса ДНК, такого как опосредованный ПЭГ перенос в протопласты, и с помощью трансформации, опосредованной агробактериями.

Векторы экспрессии могут включать промоторные и энхансерные последовательности, элементы терминации транскрипции и элементы управления трансляцией. Экспрессионные векторы и способы трансформации обычно разделены между хостами двудольных хозяев, такими как Arabidopsis и табак, и однодольных хозяев, таких как кукуруза и рис. Примеры промоторов растений, используемых для экспрессии, включают промотор вируса мозаики

цветной капусты, промотор синтазынопалина, промотор бифосфат карбоксилазы рибозы и промотор убиквитина и UBQ3.

Для облегчения отбора и поддержания трансформированных клеток часто используют селектабельные маркеры, такие как гигромицин, фосфоманнозизомераза и неомицинфосфотрансфераза.

Трансформированные растительные клетки можно поддерживать в культуре в виде клеток, агрегатов (каллусной ткани) или регенерированных в цельных растениях. Трансгенные растительные клетки также могут включать водоросли, сконструированные для получения полипептидов гиалуронидазы.Поскольку растения имеют отличающиеся от клеток млекопитающих пути гликозилирования, это может влиять на выбор белка, продуцируемого в этих хозяевах.

5. Очистка

Клетки-хозяева, трансформированные последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный полипептид u-PA, можно культивировать в условиях, подходящих для экспрессии и восстановления кодируемого белка из культуры клеток. Белок, продуцируемый рекомбинантной клеткой, как правило, секретируется, но может содержаться внутриклеточно в зависимости от последовательности и/или используемого вектора.Как понятно специалистам в данной области, экспрессионные векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую u-PA, могут быть сконструированы с сигнальными последовательностями, которые облегчают прямую секрецию u-PA через прокариотическую или эукариотическую клеточную мембрану.

Таким образом, способы очистки полипептидов из клеток-хозяев зависят от выбранных клеток-хозяев и систем экспрессии. Для секретируемых молекул белки обычно очищают от культуральной среды после удаления клеток. Для внутриклеточной экспрессии клетки можно лизировать, и белки очищаются от экстракта. Когда трансгенные организмы, такие как трансгенные растения и

животные, используются для экспрессии, ткани или органы могут быть использованы в качестве исходного материала для получения экстракта лизированных клеток.Кроме того, получение трансгенного животного может включать продуцирование полипептидов в молоке или яйцах, которые могут быть собраны и, при необходимости, белки могут быть экстрагированы и дополнительно очищены с использованием стандартных способов в данной области техники.

Белки, такие как модифицированные полипептиды u-PA, могут быть очищены с использованием стандартных методик очистки белка, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, SDS-PAGE, эксклюзионную хроматографию, осаждение сульфатом аммония и ионообменную хроматографию, такую как анионообменная хроматография. Способы аффинной очистки также могут быть использованы для повышения эффективности и чистоты препаратов.Например, антитела, рецепторы и другие молекулы, которые связывают белки u-PA, могут быть использованы при аффинной очистке.

Экспрессионные конструкции также могут быть сконструированы для добавления аффинной метки к белку, такому как метка убиквитин-подобного модификатора (SUMO) ,myc-эпитоп, GST-слияние или His6 и аффинно очищенные SUMO или myc антитела, глутатион-смола и Ni-смола, соответственно. Такие метки могут быть соединены с нуклеотидной последовательностью, кодирующей u-PA, как описано в другом месте в настоящем документе, что может облегчить очистку растворимых белков.

Например, модифицированный полипептид u-PA может быть выражен как рекомбинантный белок с одним или более дополнительными полипептидными доменами, добавленными для облегчения очистки белка.

Такие способствующие очистке домены включают, но не ограничиваются ими, хелатообразующие пептиды, такие как модули гистидин-триптофан, которые позволяют очистить иммобилизованные металлы, белки A, которые позволяют очистить иммобилизованный иммуноглобулин и домен, используемый в FLAGS

системе очистки/аффинной очистки (ImmunexCorp, SeattleWash). Включение отщепляемой линкерной последовательности, такой как фактор XA или энтерокиназа (Invitrogen ®, SanDiego, CA) между доменом очистки и экспрессированным полипептидом u-PA, является полезным для облегчения очистки. Один такой вектор экспрессии обеспечивает экспрессию слитого белка, содержащего полипептид u-PA, и сайт расщепления энтерокиназы. Небольшой убиквитин-подобный модификатор (SUMO) облегчает очистку на IMIAC (аффинная хроматография с иммобилизованным металлом), в то время как сайт расщепления энтерокиназы обеспечивает средство для очистки полипептида от слитого белка.

Чистоту можно оценить любым способом, известным в данной области, включая гель-электрофорез, методы ВЭЖХ, окрашивание и спектрофотометрические методы. Экспрессированный и очищенный белок можно анализировать с использованием любого анализа или способа, известного специалисту в данной области техники, например, любого описанного в разделе 3. Они включают анализы на основе физических и/или функциональных свойств белка, включая, но не ограничиваясь этим, анализ методом гель-электрофореза, иммуноанализ и анализы активности u-PA.

6. Дополнительные модификации

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть модифицированы для улучшения или изменения фармакокинетических и фармакологических свойств. В частности, модифицированные полипептиды u-PA могут быть конъюгированы с полимером, таким как фрагмент ПЭГ или декстран или сиалированием, для снижения иммуногенности и/или увеличения периода полужизни в сыворотке и других жидкостях организма, включая стекловидное тело.

a. ПЭГилирование

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) используется в биоматериалах, биотехнологии и медицине в первую очередь, поскольку ПЭГ представляет собой биосовместимый, нетоксичный, водорастворимый полимер, который обычно является неиммуногенным (ZhaoandHarris, ACSSymposiumSeries 680: 458-72, 1997). В области доставки лекарственного средства производные ПЭГ широко используются при ковалентном присоединении ("ПЭГилирование") к белкам для снижения иммуногенности, протеолиза и клиренса почек для увеличения периода полужизни в сыворотке и повышения растворимости (Zalipsky, Adv.DrugDelRev.16: 157-82, 1995).

Аналогично, PEGприсоединеняют к низкой молекулярной массы, относительно гидрофобным лекарственным средствам для повышения растворимости, снижения токсичности и изменения биораспределения. Как правило, ПЭГилированные лекарственные средства вводят в виде растворов.

Родственное применение представляет собой синтез сшитых разлагаемых ПЭГ-сетей или составов для применения в доставке лекарственных средств, поскольку может быть использовано также применение в разлагаемых гелях (Sawneyetal. Macromolecules 26: 581-87, 1993). Также известно, что макромолекулярные комплексы могут быть образованы путем смешивания растворов двух
комплементарных полимеров.

Такие комплексы обычно стабилизируют электростатическими взаимодействиями (полианионно-поликатионными) и/или водородными связями (поликислота-полиоснование) между вовлеченными полимерами и/или гидрофобными взаимодействиями между полимерами в водной окружающей среде (Krupersetal. Eur. PolymJ.32: 785-790, 1996).Например, смешение растворов полиакриловой кислоты (PAAc) и полиэтиленоксида (ПЭО) в надлежащих условиях приводит к образованию комплексов на основе водородных связей. Диссоциация этих комплексов в физиологических условиях

была использована для доставки свободных лекарственных средств (те непегилированных).

Комплексы комплементарных полимеров получают из гомополимеров и сополимеров.

Известно, что многочисленные реагенты для ПЭГилирования представляют собой фрагмент ПЭГ (ПЭГилированные терапевтические белки).

Такие реагенты включают, но не ограничиваются ими, взаимодействие полипептида с N-гидроксисукцинимидиловым (NHS)-активированным ПЭГ, сукцинимидилмПЭГ, mPEG2-N-гидроксисукцинимид, мПЭГсукцинимидил альфа-метилбутаноат, мПЭГсукцинимидилпропионат, мПЭГсукцинимидилбутаноат, мПЭГ карбоксиметил-3-гидроксибутановой кислоты сукцинимидиловый эфир, гомобифункциональный ПЭГ-сукцинимидилпропионат, гомобифункциональный ПЭГ-пропиональдегид, гомобифункциональный ПЭГ-бутиральдегид, ПЭГ малеимид, ПЭГ гидразид, п-нитрофенилкарбонат ПЭГ, мПЭГ-бензотриазол карбонат, пропиональдегид ПЭГ, мПЭГ-метилкетон, разветвленный mPEG2-бутиральдегид, мПЭГ-ацетил, мПЭГ-пиперидон, мПЭГметилкетон, мПЭГ-линкерамалеимид, мПЭГвинилсульфон, мПЭГ-тиол, мПЭГ-ортодирилтиоэфир, мПЭГ-ортоформилдисульфид, Fmoc-PEG-NHS, Boc-PEG-NHS, винилсульфон ПЭГ-NHS, акрилат ПЭГ-NHS, флуоресцеин ПЭГ-NHS и биотин ПЭГ-NHS (см,например, Monfardini *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6:62-69, 1995; Veronese *et al.*, *J. Bioactive Compatible Polymers* 12:197-207, 1997; U.S. 5,672,662; U.S. 5,932,462; U.S. 6,495,659; U.S. 6,737,505; U.S. 4,002,531; U.S. 4,179,337; U.S. 5,122,614; U.S. 5,324, 844; U.S. 5,446,090; U.S. 5,612,460; U.S. 5,643,575; U.S. 5,766,581; U.S. 5,795, 569; U.S. 5,808,096; U.S. 5,900,461; U.S. 5,919,455; U.S. 5,985,263; U.S. 5,990, 237; U.S. 6,113,906; U.S. 6,214,966; U.S. 6,258,351; U.S. 6,340,742; U.S. 6,413,507; U.S. 6,420,339; U.S. 6,437,025; U.S. 6,448,369; U.S. 6,461,802; U.S. 6,828,401; U.S. 6,858,736; U.S. 2001/0021763; U.S. 2001/0044526; U.S. 2001/0046481; U.S. 2002/0052430; U.S. 2002/0072573; U.S. 2002/0156047; U.S. 2003/0114647; U.S. 2003/0143596; U.S. 2003/0158333; U.S. 2003/0220447;

U.S. 2004/0013637; US 2004/0235734; WO0500360; U.S. 2005/0114037; U.S. 2005/0171328; U.S. 2005/0209416; EP 01064951; EP 0822199; WO 00176640; WO 0002017; WO 0249673; WO 9428024; and WO 0187925).

В одном примере полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 3 кДа до приблизительно 50 кДа, и обычно от приблизительно 5 кДа до приблизительно 30 кДа. Ковалентное присоединение ПЭГ к лекарственному средству (известное как "ПЭГилирование") может быть осуществлено с помощью известных методов химического синтеза. Например, ПЭГилирование белка может быть осуществлено путем взаимодействия NHS-активированного ПЭГ с белком в подходящих условиях реакции.

Несмотря на то, что были описаны многочисленные реакции для ПЭГилирования, те, которые наиболее применимы, придают направленность, используют мягкие условия реакции и не требуют обширной обработки после обработки для удаления токсичных катализаторов или би-продуктов. Например, монометоксиPEG (mPEG) имеет только один реакционноспособный концевой гидроксил, и, таким образом, его использование ограничивает часть гетерогенности полученной смеси ПЭГ-белкового продукта.

Активация гидроксильной группы в конце полимера, противоположной концевой метоксигруппе, обычно необходима для осуществления эффективного ПЭГилирования белка, с целью получения дериватизированного ПЭГ более восприимчивого к нуклеофильной атаке. Атакующий нуклеофил обычно представляет собой эпсилон-аминогруппу лизильного остатка, но другие амины также могут реагировать (например, N-концевой альфа-амин или кольцевые амины гистидина), если локальные условия являются благоприятными.Более направленное прикрепление возможно в белках, содержащих один лизин или цистеин. Последний остаток может быть нацелен ПЭГ-малеимидом для тиол-специфической модификации.

Альтернативно, гидразид ПЭГ может вступать в реакцию с пероксидатом окисленным гиалуронан-разрушающим ферментом и окислен в присутствии NaCNBH3. Более конкретно, ПЭГилированные сахара CMP могут взаимодействовать с гиалуронан-разрушающим ферментом в присутствии

соответствующих гликозилтрансфераз. Одним из способов является метод «ПЭГилирования», в котором полимерные молекулы связываются с рассматриваемым полипептидом.При использовании этого способа иммунная система имеет трудности при распознавании эпитопов на поверхности полипептидов, отвечающей за образование антител, тем самым снижая иммунный ответ. Для полипептидов, введенных непосредственно в кровеносную систему человеческого организма, получают конкретный физиологический эффект, типичный потенциальный иммунный ответ представляет собой ответ IgG и/или IgM, в то время как полипептиды, которые вдыхаются через дыхательную систему (те промышленный полипептид), потенциально могут вызывать ответ IgE (т.е. аллергический ответ). Один из теорий, поясняющих сниженный иммунный ответ, состоит в том, что полимерный(ые) молекул(ы) защищают эпитопы на поверхности полипептида, ответственной за иммунный ответ, ведущий к образованию антител.

Другая теория или по меньшей мере частичный фактор состоит в том, что чем более тяжелый конъюгат, тем более уменьшенный иммунный ответ получается.

Как правило, для получения ПЭГилированного модифицированного полипептида u-PA, представленного в настоящем документе, фрагменты ПЭГ конъюгированы, посредством ковалентного присоединения, с полипептидами. Модифицированные полипептиды u-PA для ПЭГилирования могут быть получены без замены C122S; вместо этого C122 может служить в качестве сайта для конъюгации с ПЭГ-фрагментом и/или для образования желаемой дисульфидной связи, такой как для двухцепочечной активированной формы или димера.

Методы ПЭГилирования включают, но не ограничиваются ими, специализированные линкеры и химические составы для связывания (см. например, Harris, *Adv. DrugDeliv. Rev.* 54:459-476, 2002), прикрепление множества фрагментов ПЭГ к одному сайту конъюгации (например, посредством использования разветвленных PEG; см. например, Veroneseetal., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:177-180, 2002), сайт-специфичное ПЭГилирование и/или моно-ПЭГилирование (см. например, Chapmanetal. NatureBioteh.17: 780-

783, 1999) и сайт-направленное ферментативное ПЭГилирование (см. например, , Sato, *Adv. DrugDeliv. Rev.*, 54:487-504, 2002).

Способы и методики, описанные в данной области, могут продуцировать белки, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более чем 10 ПЭГ или производные ПЭГ, присоединенные к одной молекуле белка (см. например, патентная публикация США № 2006/0104968).

c. Слитые белки и другие конъюгаты

В настоящем документе предложены конъюгатыu-PA и модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе. Примеры таких конъюгатов представляют собой слитые белки, приведенные в примерах 14-16. Как описано в настоящем документе, некоторые из конъюгатов при активации расщеплением включенного полипептида активации образуют двухцепочечный активированный полипептид u-PA; другие, такие как те, которые содержат Fc-домены, могут образовывать буксирные цепи посредством связывания Fc-доменов.Другие содержат последовательности, такие как SUMO и HIS-SUMO, которые облегчают экспрессию и выделение/очистку. Примеры 14 и 15, а также фиг. 1-4, описывают и изображают полученные конъюгаты.

Для применения в качестве фармацевтических препаратов модифицированные полипептиды u-PA обычно представлены в активированной форме, такой как двухцепочечная активированная форма.Следует понимать, что последующее обсуждение описывает слитые полипептиды, которые могут включать в себя сигнальные последовательности и другие регуляторные последовательности, которые не появляются в полученном продукте. В частности, слитые полипептиды могут включать последовательности активации, в результате чего при расщеплении полученный полипептид представляет собой двухцепочечный активированный полипептид. Он представляет собой активированную форму

полипептида, которая, в общем, будет представлять собой фармацевтический продукт, вводимый субъекту.

i. Примеры слитых белков и других белковых конъюгатов

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть слиты с другими полипептидами и их частями и фрагментами для придания желаемых свойств, таких как увеличение периода полужизни в сыворотке и/или снижение иммуногенности и/или других свойств. Они включают, например, слияние с альбумином, слияние с нацеливающими фрагментами, такими как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, слияние с иммуноглобулинами, слияния Fc, модификация гликозилирования, фарснилирование и другие подобные модификации(см. Strol (2015) BioDrugs 29: 215-239 для обзора множества слитых белков для улучшения фармакокинетических свойств терапевтических белков). Любые такие способы изменения фармакологических свойств терапевтических средств могут быть применены к модифицированным полипептидам u-PA, представленным в настоящем документе. Как правило, где модификация представляет собой полипептид или его часть, модифицированный u-PA получают в виде гибридного белка.Для неполипептидных

Для неполипептидныхмодификаций, таких как пегилирование, модификация осуществляется на выделенном белке. Модифицированные полипептиды u-PA включают те, которые имеют Cys в остатке 122 (по числу химотрипсина), чтобы обеспечить сайты для модификации посттрансляционной или посточистки. Модифицированные полипептиды u-PA включают такие полипептиды, которые являются полноразмерными и их каталитически активными участками, такими как домен протеазы, или зрелый полипептид или активированный двухцепочечный полипептид.

Также представлены слитые белки, содержащие модифицированный полипептид u-PA и один или несколько других полипептидов. Предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие слитые белки, приготовленные для введения посредством подходящего пути. Слитые белки

образуются путем связывания в любом порядке модифицированного полипептида u-PA и другого полипептида, такого как антитело или его фрагмент, фактор роста, рецептор, лиганд и другое подобное средство для облегчения очистки протеазы, изменения фармакодинамических свойств модифицированного полипептида u-PA путем направления полипептида u-PA в целевую клетку или ткань и/или увеличения экспрессии или секреции полипептида u-PA.

В полипептиде слияния полипептида u-PA, полипептид u-PA может представлять собой всю или каталитически активную часть полипептида u-PA или каталитически активную часть полипептида u-PA и дополнительный участок u-PA, который не является полноразмерным u-PA слитым белком.Представленные в настоящем документе слитые белки, сохраняют, по существу, всю их специфичность и/или селективность для белка C3 комплемента.Как правило, слитые полипептиды u-PA сохраняют по меньшей мере около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% субстратной специфичности и/или селективности по сравнению с не слитым полипептидом u-PA, в том числе 96%, 97%, 98%, 99% или более высокой специфичности субстрата по сравнению с не слитым полипептидом u-PA.

ii. Создание конструкций

Слитый белок u-PA может быть получен стандартными рекомбинантными способами. Например, фрагменты ДНК, кодирующие различные полипептидные последовательности, могут быть лигированы вместе в соответствии с общепринятыми методиками, например, применение концов для лигирования, расщепления рестрикционными ферментами для обеспечения соответствующих концов, заполнения когезивных концов при необходимости, обработки щелочной фосфатазой, чтобы избежать нежелательного соединения и ферментативного лигирования.

В другом варианте реализации слитый ген может быть синтезирован обычными методами, включающими автоматизированные синтезаторы ДНК.

Альтернативно, ПЦР-амплификацию фрагментов генов можно проводить с использованием якорных праймеров, что приводит к комплементарным связям между двумя последовательными фрагментами генов, которые впоследствии могут амплифицированы для формирования химерной генной последовательности (см. например,Ausubel*etal.* (eds.) CURRENTPROTOCOLSINMOLECULARBIOLOGY, JohnWiley&Sons, 1992). Многие векторы экспрессии коммерчески доступны, которые кодируют слитый фрагмент (например, полипептид SUMO или полипептид GST).Нуклеиновая кислота, кодирующая u-PA, может быть клонирована в такой вектор экспрессии, так что слитый фрагмент сцеплен в рамке с полипептидом u-PA.

Иллюстративные экспрессионные векторы включают любой вектор экспрессии млекопитающих, такой как, например, pCMV. Для бактериальной экспрессии такие векторы включают pBR322, pUC, pSKF, pET23D и векторы слияния, такие как MBP, GST и LacZ. Другие эукариотические векторы, например, любые содержащие регуляторные элементы из эукариотических вирусов, могут быть использованы в качестве эукариотических экспрессионных векторов.

Они включают, например, векторы SV40, векторы вируса папилломы и векторы, полученные из вируса Эпштейна-Бара.Иллюстративные эукариотические векторы включают pMSG, pAV009/A +, pMT010/A +, pMAMneo -5, бакуловирусpDSCE и любой другой вектор, обеспечивающий экспрессию белков в направлении промотора CMV, раннего промотора SV40, позднего промотора SV40, промотора металлотионеина, промотора вируса опухоли молочной железы мыши, промотора вируса саркомы Рауса, или других промоторов, эффективных для экспрессии в эукариотах.

iii. Сигнальная последовательность

Слитые белки u-PA могут содержать сигнальный пептид (SP или сигнальную последовательность или сигнал локализации или лидерный пептид)

для направления транспорта протеазы. Сигнальные пептиды представляют собой звенья последовательностей на N-конце белков, которые нацелены на белки для транслокации через эндоплазматическую сетчатую мембрану до их специфического пункта назначения внутри клетки или вне клетки, если белки должны секретироваться.

Таким образом, выбор SP и модификация SP влияет на нацеливание белка (Zhangetal. (2005) JGeneMed 7: 354-365). Оптимизированные SP были разработаны для более эффективной активности. Были разработаны вычислительные модели и алгоритмы для прогнозирования эффективности SP и определения консенсусных последовательностей SP (Burdukiewiczetal. (2018) Int J Mol Sci 19 (12): 3709; Peason et al (1988) Proc Natl Acad Sci U.S.A.85: 2444-2448).Известно, что различные белки имеют SP, включая, но не ограничиваясь ими:

рецепторы (ядерные, 4 трансмембранный, связанный с G белком и тирозинкиназа), цитокины (хемокины), гормоны (факторы роста и дифференцировки), нейропептиды и вазомедиаторы, протеинкиназы, фосфатазы, фосфолипазы,

фосфодиэстеразы, нуклеотидные последовательности, матричные молекулы (адгезионные, кадгерин, внеклеточные матричные молекулы, интегрин и селектин), G белки, ионные каналы (кальций, хлорид, калий и натрий), протеазы, транспортеры/насосы (аминокислота, белок, сахар, металлы и витамины; кальциевый, фосфатный, калиевый и натриевый) и регуляторные белки. В некоторых примерах исходный сигнальный пептид оптимизирован для секреции белка в требуемой клетке-хозяине, выбранной для производства. Полипептид u-PA, такой как модифицированный домен протеазы u-PA, предусмотренный в данном документе, может быть слит, прямо или косвенно, с не-uPA сигнальным пептидом для нацеливания на u-PA.

Сигнальные пептиды могут представлять собой сигнальные пептиды антител, такие как сигнальные пептиды тяжелых цепей антител и легкой цепи

антител. Изотип антитела может содержать, но не ограничивается ими, IgG, IgM, IgD, IgA и IgE. Таким образом, тяжелая цепь может содержать гамма-, мю-, дельта-, альфа- и эпсилон- тяжелые цепи, и легкая цепь может содержать каппа- или лямбда- легкую цепь.Слитые белки u-PA, изложенные в настоящем документе, могут быть получены с сигнальным пептидом антитела, таким как сигнальная последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k), такая как сигнальная последовательность, приведенная в SEQIDNO: 999.

Другие иллюстративные сигнальные пептиды представляют собой пептиды, полученные из человеческого интерлейкина -2 (IL -2), которые широко используются для исследований и получения белков (Bamfordetal. (1998) JImmunol 160: 4418; Komadaetal. (1999) BiolPharmBull 22: 846).

Были разработаны модифицированные IL -2 SP с повышенной основностью и гидрофобностью, которые повышают секрецию слитых белков до 3,5-кратного (Zhangetal. (2005) JGeneMed.7: 354). Слитые белки u-PA в данном документе могут быть получены, например, с пептидом сигнала IL -2, таким как сигнальный пептид IL2 человека (hIL2SP), такой как, например,как сигнальная последовательность, приведенная в SEQIDNO: 1000.

Иллюстративные слитые белки u-PA, изложенные в настоящем документе, могут содержать сигнальный пептид для направления транспорта протеазы. Например, слитые полипептиды u-PA, представленные как SEQIDNO: 1004,1005,1010, 1011, 1014-1018, 1036 и 1040, содержат пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999). В другом примере слитые полипептиды u-PA, представленные как SEQIDNO: 1006-1009,1012,1013, 1034 и 1035, содержат последовательность сигнального пептида IL2 человека (hIL2SP) (SEQIDNO: 1000).

iii. Примеры слитых белков и пептидных линкеров

Связывание модифицированного полипептида u-PA и другого полипептида может быть осуществлено непосредственно или опосредованно через линкер. В одном примере связь может быть посредством химической

связи, например, посредством гетеробифункциональных агентов или тиоловых связей или других таких связей. Слияние полипептида u-PA с другим полипептидом может быть на N-или C-конце модифицированного полипептида u-PA, такого как модифицированный домен протеазы u-PA.Неограничивающие примеры полипептидов,

Неограничивающие примеры полипептидов, которые могут быть использованы в слитых белках с полипептидом u-PA, представленным в настоящем документе, включают, например, Fc-домен из иммуноглобулина G, сывороточный альбумин (те человеческий сывороточный альбумин), scFv, который связывается с Коллагеном IIm (C2scFv), связывающий домен гиалуроновой кислоты (HABD), GST (глутатион S-трансфераза) полипептид, его метка (те, HHHHHH), убиквитин-подобный модификатор (SUMO) , полипептид гемагглютинина вируса гриппа (HA) и его антитело 12CA5, и/или гетерологичная сигнальная последовательность (например, из тромбина или мышиной Ig каппа цепи V-III области (IgGk) или человеческого интерлейкина - 2 (hIL2)). Слитые белки могут содержать дополнительные компоненты, такие как E. coli мальтоза-связывающий белок (OБМ), которые способствуют поглощению белка клетками (см. международную заявку PCT, публикация № WO 01/32711).

Пептидные линкеры могут быть включены в слитые белки u-PA. В одном примере пептидные линкеры могут быть слиты с C-концевым концом первого полипептида и N-концом второго полипептида. Эта структура может повторяться несколько раз, так что по меньшей мере один, и возможно 2, 3, 4 или более полипептидов связаны друг с другом через пептидные линкеры на их соответствующих концах.

Например, слитый белок может включать последовательность X-Y-Z, где X представляет собой каталитический домен дикого типа или модифицированный u-PA, Y представляет собой пептидный линкер, и Z представляет собой всю или часть партнера слияния (например, HSA, Fc, HABD или C2 scFv). В некоторых случаях X представляет собой всю модифицированную u-PA, включающую N-конец u-PA, и протеазную область u-

PA В других случаях X является частью модифицированной u-PA, включающей 12 аминокислот непосредственно выше от домена протеазы u-PA, и домен протеазы u-PA.

В другом примере полипептид может включать последовательность A-X-Y-Z, где A представляет собой другой партнер слияния, такой как полипептид SUMO или HIS-SUMMO, который облегчает экспрессию и/или выделение полученного полипептида.

Пептидные линкеры обычно включают Gly, Ser и их комбинации, или Ala и пролин. Линкеры обычно содержат от двух до 20 или 25 остатков. Примеры пептидных линкеров включают, но не ограничиваются ими:-Gly-Gly-, GSG, AGS (SEQIDNO: 1003), GGGGS (SEQIDNO: 1001), GGSSGG (SEQIDNO: 1002), SSSSG (SEQIDNO: 1024), GKSSGSGSESSKS (SEQIDNO: 1025), GGSTSGSGKSSEGKG (SEQIDNO: 1026), GSTSGSGKSSAGSGSTKG (SEQIDNO: 1027),GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQIDNO: 1028), EGKSSGSGSEESCF (SEQIDNO: 1029), или AlaAlaProAla или (AlaAlaProAla) n (SEQIDNO: 1030), где n равно от 1 до 6, такое как 1,2,3, 4, 5 или 6.

Связывающие фрагменты описаны, например, в Hustonetal. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-5883, Whitlow et al. (1993) ProteinEngineering 6: 989-995, andNewtonetal. (1996) Biochemistry 35: 545-553. Другие подходящие пептидные линкеры включают любые из описанных в патентах США 4751,180 или 4935233.

Полинуклеотид, кодирующий желательный пептидный линкер, может быть вставлен между и в одной и той же считывающейрамке в качестве полинуклеотида, кодирующего всю или часть u-PA, включая домен протеазы u-PA, с использованием любой подходящей традиционной методики. В одном примере слитый белок содержит полипептид u-PA, например домен протеазы u-PA, и партнер слияния, такой как HSA, Fc, HABD или C2 scFv, разделенные пептидным линкером (ами).

Иллюстративные слитые полипептиды u-PA включают линкер на C-конце домена протеазы u-PA, который связывает домен протеазы u-PA с C-концевым партнером слияния, таким как HSA или Fc. U-PA-линкер-Fc и u-PA-линкер-HSA молекулы могут содержать эпитопную метку и/или сигнал для экспрессии и секреции.Приведенный в качестве примера слитый белок u-PA-линкер-Fc представлен в SEQIDNO: 1018, которая содержит последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), HIS-SUMO (SEQIDNO: 990), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21), линкер (SEQIDNO: 1002) и фрагмент Fc тяжелой цепи IgG1 человека (SEQIDNO: 992).

В других примерах, типичные слитые белки u-PA представляют собой слитые полипептиды u-PA-линкер-HSA, такие как слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1015-1017, например, слитый полипептид, представленный в SEQIDNO: 1015, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), N-концевой домен u-PA (SEQIDNO: 1042), последовательность активации u-PA дикого типа (SEQIDNO: 997), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987), линкер (SEQIDNO: 1002)и HSA (SEQIDNO: 991).

В другом примере слитый полипептид, представленный в SEQIDNO: 1016, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), сайт активации фурина в последовательности активации u-PA (SEQIDNO: 996), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21), линкер (SEQIDNO: 1002) и HSA (SEQIDNO: 991).В другом примере слитый полипептид, представленный в SEQIDNO: 1017, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), HIS-SUMO (SEQIDNO: 990), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21), линкер (SEQIDNO: 1002) и HSA (SEQIDNO: 991).

В других примерах линкер находится на N-конце домена протеазы u-PA и связывает домен протеазы с N-концевым партнером слияния. Например, слитый белок может содержать N-концевой Fc, связанный с u-PA. Пример FC-линкер-u-PA слитого полипептида, представлен в SEQIDNO: 1004, который содержит

последовательность пептида-лидерного сигнала легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), Fc-фрагмент тяжелой цепи IgG1 человека (SEQIDNO: 992), линкер (SEQIDNO: 1003), последовательность активации u-PA дикого типа (SEQIDNO: 997) и домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987).

iv. Партнеры по слиянию

Слитые белки, такие как слитые белки, содержащие слияние с Fc, слияние с человеческим сывороточным альбумином (HSA), слияние с одноцепочечным фрагментом с переменным (scFv) антителом, таким как scFv, который связывает коллаген II (C2scFv), слияние с HABD и слияние с другими полипептидами, представляют собой известные модификации для улучшения фармакокинетики пептидных или биологических лекарственных средств.Кроме того, среди них происходит конъюгация либо с линейным, либо с разветвленной цепью монометоксиполиэтиленгликолем (ПЭГ), что приводит к увеличению молекулярной массы и гидродинамического радиуса, и уменьшению скорости клубочковой фильтрации почкой. Другой подход к улучшению фармакокинетических параметров включает модификацию гликозилирования, что приводит к сокращению клиренса и продлению срока полужизни.

Примеры слитых полипептидов u-PA включают размещение партнера слияния (те HSA, HABD, C2 scFv или Fc) N-конца в домен протеазы u-PA или C-концевой участок в домен протеазы u-PA. Приведенный в качестве примера слитый белок u-PA, в котором партнер слияния представляет собой N-концевой участок с доменом протеазы u-PA, представлен в SEQIDNO: 1004. Примеры слитых белков u-PA, где партнер слияния представляет собой C-конец в домен протеазы u-PA, представлен в последовательностях SEQIDNO: 1006-1018.

(a) Домен Fc

Некоторые примеры слитых белков u-PA включают тяжелую цепь полипептида иммуноглобулина, наиболее обычно постоянные домены тяжелой цепи. Иллюстративные последовательности постоянных областей тяжелой цепи для подтипов IgG человека представлены в SEQIDNO: 45 (IgG1), SEQIDNO: 1020 (IgG2), SEQIDNO: 1021 (IgG3) и SEQIDNO: 1022 (IgG4).Например, для примерной постоянной области тяжелой цепи, представленной в SEQIDNO: 45, домен CH1 соответствует аминокислотам 1-98, шарнирная область соответствует аминокислотам 99-110, домен CH2 соответствует аминокислотам 111-223, а домен CH3 соответствует аминокислотам 224-330.

В одном примере слитый белок u-PA может включать Fc-область полипептида иммуноглобулина, такого как человеческий иммуноглобулин. Как правило, такое слияние сохраняет, по меньшей мере, функционально активный шарнир, домены CH2 и CH3 постоянной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, полноразмерная Fc-последовательность IgG1 включает аминокислоты 105-330 последовательности, представленной в SEQIDNO: 45.

Примеры Fc-последовательностей для hIgG1 представлены в SEQIDNO: 992 и 1023, и содержат почти всю шарнирную последовательность, соответствующую аминокислотам 100-110 SEQIDNO: 45, и полную последовательность для домена CH2 и CH3, как изложено в SEQIDNO: 45.

Другой примерный полипептид Fc представлен в заявке PCT WO 93/10151 и представляет собой одноцепочечный полипептид, проходящий от N-концевой шарнирной области к нативному C-концу Fc-области антитела IgG1 человека (SEQIDNO: 50).

Точное место, в котором делают связь, не является критическим: конкретные сайты хорошо известны и могут быть выбраны для оптимизации биологической активности или стабильности полипептида u-PA. Например, другие примеры полипептидных последовательностей Fc начинаются с аминокислоты C109 или P113 последовательности, представленной в SEQIDNO: 45 (см. например, публикация США № 2006/0024298).

В дополнение к hIgG1 Fc другие Fc-области также могут быть включены в слитые u-PA белки, представленные в настоящем документе. Например, когда эффекторные функции, опосредованные взаимодействиямиFc/FcγR, Fc/FcγR должны быть минимизированы, рассматриваются слияние с изотипамиIgG, которые плохо рекрутируют клетки комплемента или эффекторные клетки, такие как, например, FcIgG2 или IgG4. Кроме того, слияния Fc могут содержать последовательности иммуноглобулина, которые по существу кодируются генами иммуноглобулина, принадлежащими любому из классов антител, включая, но не ограничиваясь ими, IgG (включая подклассы IgG1 человека, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2 человека), IgD, IgE и IgM классы антител.

Кроме того, линкеры могут быть использованы для ковалентного связывания Fc с другим полипептидом с образованием Fc-химеры.

Модифицированные домены Fc также рассматриваются здесь для применения в химерах с u-PA слитыми полипептидами. В некоторых примерах Fc-область модифицирована таким образом, что она проявляет измененное связывание с FcR таким образом, что приводит к изменению (те больше или меньше) эффекторной функции, чем эффекторная функция Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа. Таким образом, модифицированный домен Fc может иметь измененное сродство, включая, но не ограничиваясь этим, повышенное или низкое сро Например, различные подклассы IgG имеют различные аффинности к FcγRs, при этом IgG1 и IgG3, как правило, связываются по существу лучше с рецепторами, чем IgG2 и IgG4. Различные FcγRs опосредуют различные эффекторные функции. FcγR1, FcγRIIa/c, и FcγRIIIa являются положительными регуляторами активации иммунной системы, инициированной активацией, характеризующейся наличием внутриклеточного домена, который имеет иммунорецепторноезвено активации на основе тирозина (ITAM).

FcγRIIb, однако, имеет звено ингибирования иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) и, следовательно, является ингибирующим.

В некоторых случаях слитый белок u-PA-Fc, предусмотренный в настоящем документе, может быть модифицирован для усиления связывания с белком комплемента C1q. Кроме того, Fc может быть модифицирован для изменения его связывания с FcRn, тем самым улучшая фармакокинетику слитого полипептида u-PA-Fc.Таким образом, изменение аффинности Fc-области для рецептора может модулировать эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства, связанные с Fc-доменом. Модифицированные Fc-домены известны специалисту в данной области и описаны в литературе, см. например, патент США № 5457035; патентная публикация США № 2006/0024298; и международная патентная публикация № WO 2005/063816 .

В некоторых примерах образуется мультимер полипептида u-PA. Как правило, полипептидный мультимер представляет собой димер двух химерных белков, созданных путем связывания, непосредственно или опосредованно, двух одинаковых или различных полипептидов u-PA, таких как домен протеазы u-PA, к полипептиду Fc. В некоторых примерах ген слияния, кодирующий слитый белок u-PA-Fc, вводят в соответствующий экспрессионный вектор. Полученные слитые белки u-PA-Fc могут экспрессироваться в клетках-хозяевах, трансформированных рекомбинантным вектором экспрессии, и позволяли собрать много подобных молекул антител, где межцепочечные дисульфидные связи образуются между Fc-фрагментами с получением двухвалентных полипептидов u-PA.

Слитые полипептиды u-PA, содержащие Fc-области, также могут быть сконструированы таким образом, чтобы включать метку с хелатами металлов или другим эпитопом. Маркированный домен может быть использован для быстрой очистки металлохелатной хроматографией и/или с помощью антител, чтобы обеспечить обнаружение вестерн-блотов, иммунопреципитации или истощения/блокирования активности при биоанализах.

Примеры полипептидов слияния u-PA-Fc включают слияние домена протеазы u-PA и Fc. Примеры слитых белков u-PA-Fc представлены в последовательностях SEQIDNO: 1004,1006,1010, 1011, 1012 и 1018. Молекулы u-PA-Fc могут содержать эпитопную метку или сигнал для экспрессии и секреции.Например, типичные слитые полипептиды u-PA-Fc, представленные в виде SEQIDNO: 1004, 1010 и 1011, содержат пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), фрагмент Fc тяжелой цепи Igg1 человека (SEQIDNO: 992) и домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21 или 987) либо N-концевой (SEQIDNO: 1004), либо C-концевой (SEQIDNO: 1010 и 1011) в Fc. В другом примере типовые слитые полипептиды u-PA-Fc, представленные как SEQIDNO: 1006 и 1012, содержат последовательность сигнального пептида IL2 человека (hIL2SP) (SEQIDNO: 1000), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 5 или 21) и фрагмент Fc тяжелой цепи IgG1 человека (SEQIDNO: 992) N-концевой части в домен протеазы u-PA.

(b) Сывороточный альбумин

Слитые белки u-PA могут быть получены с альбумином в качестве партнера слияния для увеличения периода полужизни, стабильности, биодоступности, распределения и/или улучшения фармакокинетики u-PA. Многочисленные продукты, связанные с человеческим сывороточным альбумином (HSA), одобрены для применения в качестве терапевтических средств, включая применение в качестве противораковых терапевтических средств и для лечения диабета 2 типа

(AlQahtani*et al.* (2019) *Biomed and Pharmacotherapy* 113:108750; Roscoe et al., (2018) *Mol. Pharmaceutics*151:15046-5047; Strohl, W.R. (2015) *BioDrugs* 4:215-239). В некоторых примерах зрелый белок HSA, не содержащий сигнальную последовательность и последовательность активации, слит с интересующим белком. В некоторых примерах слитого белка u-PA сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), конъюгирован с u-PA, таким как домен протеазы u-PA. Пример HSA представлен в SEQIDNO: 991.

Слитые полипептиды u-PA-HSA включают слияние домена протеазы u-PA и HSA. Примеры слитых белков u-PA-HAS- представлены в последовательностях SEQIDNO: 1007 и 1013-1017. u-PA-HSA молекулы могут содержать эпитопную метку и/или сигнал для экспрессии и секреции.Например, типичные слитые полипептиды u-PA-HSA, представленные как SEQIDNO: 1014-1017, содержат пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987 или 21) и С-концевой HSA (SEQIDNO: 991).В другом примере, приведенный в качестве примера полипептид слияния u-PA-HSA, представленный в SEQIDNO: 1013, содержит последовательность сигнального пептида IL2 человека (hIL2SP) (SEQIDNO: 1000), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 5) и С-концевой HSA (SEQIDNO: 991).

(c) scFvкоторый связывает коллагенII (C2scFv)

Рекомбинантные фрагменты антител в виде одноцепочечных фрагментов вариабельных (scFv) антител, такие как scFv, который связывает коллаген II (C2scFv), могут быть использованы в качестве партнера слияния с u-PA. scFv-антитела, полученные из фагов, могут быть слиты с маркерами или активными или терапевтическими белками (Ahmadetal. (2012) ClinDevImmunol 2012: 980250). Слияние scFv можно использовать для повышения выхода и активности конъюгированных белков (Martinetal. (2006) BMCBiotech 6: 46).

Одноцепочечные вариабельные антитела содержат вариабельные области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи, соединенные пептидным линкером или дисульфидной связью (Glockshuberetal. (1990) Biochemistry 29 (6): 1362-1367). Пептидный линкер играет решающую роль в складывании полипептидной цепи. Обычно используемые линкеры содержат остатки Gly и Ser для гибкости или Glu и Lys для повышения растворимости (Whitlowetal. (1993) ProteinEngineering 6 (8): 989-995).

scFv могут быть слиты с белками для специфической доставки в антигенпоставляющие клетки (Ahmadetal. (2012) ClinDevImmunol 2012: 980250). Например, scFv может быть создан для целевого коллагена II, например, для использования в качестве исследовательских агентов, и в качестве агента

доставки терапевтических молекул в сайты, экспрессирующие коллаген IIчеловека.

Например, scFv представляет собой выделенное моноклональное антитело или его фрагмент, который связывает человеческий коллаген II, содержащий VH-область и VL-область, где C2scFv включает аминокислотную последовательность, имеющую последовательность, показанную в SEQIDNO: 993.

Примеры слитых полипептидов u-PA-C2scFv включают слияние домена протеазы u-PA и C2scFv. Приведенный в качестве примера слитый белок u-PA-C2scFv представлен в SEQIDNO: 1008. u-PA-C2scFv-молекулы могут содержать эпитопную метку или сигнал для экспрессии и секреции. Например, приведенный в качестве примера полипептид слияния u-PA-C2scFv, представленный как SEQIDNO: 1008, содержит сигнальную последовательность пептида IL2 человека (hIL2SP) (SEQIDNO: 1000), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и С-концевой C2scFv (SEQIDNO: 993).

(d) Домен связывания гиалуроновой кислоты (HABD)

В некоторых примерах слитые белки u-PA содержат партнер слияния HABD, такой как стимулированный фактор некроза опухоли -6 (TSG -6), такой как TSG -6, представленный в SEQIDNO: 994 (соответствующий аминокислотам 32-134 TSG -6 человека; NCBINoNP_009046.2). Слитые u-PA белки могут быть получены с HABD, таким как TSG -6, в качестве партнера по слиянию для увеличения периода полужизни, стабильности, биодоступности, распределения и/или улучшения фармакокинетики u-PA

Стимулированный фактор некроза опухоли -6 (TSG -6, фактор некроза опухолей альфа-индуцированный белок 6, TNFAIP6; NCBINo. NP_009046.2) представляет собой секретируемый гликопротеин ~ 35 кДа, состоящий из одного N-концевого звена и С-концевого домена CUB. Экспрессия TSG -6

индуцируется во многих типах клеток медиаторами воспаления, включая цитокины и факторы роста.Сообщалось, что через свой соединительный модуль, который содержит приблизительно аминокислоты 35-132, TSG -6 является мощным ингибитором полиморфноядерной миграции лейкоцитов.

TSG -6 образует стабильный комплекс с ингибитором серинпротеазыинтер-альфа-ингибитор (IαI) и потенцирует антиплазминовую активность (IαI). TSG -6 также важен для образования и ремоделирования богатых НАперицеллюлярных покрытий и внеклеточных матриц.

Примеры полипептидов слияния u-PA-HABD включают слияние домена протеазы u-PA и HABD. Приведенный в качестве примера слитый белок u-PA-HABD представлен в SEQIDNO: 1009. u-PA-HABD молекулы могут, содержать эпитопную метку или сигнал для экспрессии и секреции. Например, приведенный в качестве примера полипептид слияния u-PA-HABD, представленный в SEQIDNO: 1009, содержит последовательность пептида IL2 человека (hIL2SP) (SEQIDNO: 1000), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и С-концевой HABD (SEQIDNO: 994).

v. Сайты активации

Иллюстративные слитые белки u-PA содержат сайт активации u-PA. Например, слитые белки u-PA содержат последовательность u-PA дикого типа для аутоактивации; содержат последовательность фурина для активации во время экспрессии белка; или активируются после расщепления сигнала секреции, все генерируют активированную протеазу u-PA.

(a) Фурин

Фуриновые белки вовлечены в эндопротеолитическое созревание неактивных белков-предшественников в одном, парном или множестве основных консенсусных сайтах в секреторном пути (Nakayama (1997)

Biochemi.J.327: 625-635; SeidahandChretien, CurrentOpinionsinBiotechnology (1997) 8: 602-607).При транзите вновь синтезированного белка-предшественника из эндоплазматического ретикулума в отделение Гольджи пропептид подвергают автокаталитическому удалению в двухступенчатом процессинге в фуриновом звене расщепления (Leducetal. (1992) J.Biol.Chem 267: 14304-14308; Andersonetal. (1997) EMBO 1508-1518). Фурин требует сайт R-X-X-R для расщепления, и оптимальная обработка происходит при R-X-K/R-Rзвене (Molloyetal. (1992) JBiolChem 267: 16396-16402).Иллюстративные последовательности активации u-PA, содержащие сайты расщепления фуринаRRKR, представлены в последовательностях SEQIDNO: 995 и 996.

Слитые белки u-PA могут включать сайт активации фуринаN-концевой части в домен протеазы u-PA, так что белок u-PA активируется во время экспрессии. Активация U-PA во время экспрессии, такая как включение сайта активации фурина в последовательности активации u-PA, предназначена для удаления необходимости стадии активации во время последующей обработки.

Получали слитые полипептиды u-PA, включающие сайт активации фурина и домен протеазы u-PA. Примеры белков фурин-u-PA представлены в последовательностях SEQIDNO: 1010, 1014 и 1016. Фурин-активированные молекулы u-PA, могут содержать партнер слияния, и/или сигнал для экспрессии и секреции.Например, приведенные в качестве примеров слитые белки u-PA, представленные как SEQIDNO: 1014 и 1016, содержат пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), сайт активации фурина в последовательности активации u-PA (SEQIDNO: 995), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и Fc(SEQIDNO: 992)

(b) u-Pa

Активация u-PAzymogen происходит путем расщепления одиночной пептидной связи N-концевой части в каталитический домен u-PA, инициируя конформационное изменение белка. Конструкции U-PA, полученные в настоящем документе, могут содержать 12 аминокислотную

последовательность активации u-PA (SEQIDNO: 997) или ее модифицированную форму (SEQIDNO: 998) или может содержать расширенную часть u-PAN-конца, включающую последовательность активации, так что u-PA содержит полноразмерный зрелый полипептид, например, полипептид, представленный в SEQIDNO: 3 в других примерах, u-PA содержит N-конец, такой как N-концевой участок u-PA, представленный в виде аминокислот 21-178 SEQIDNO: 1 или SEQIDNO: 1042, и 12 аминокислотную последовательность активации u-PA (SEQIDNO: 997) или модифицированную форму последовательности активации u-PA (SEQIDNO: 998).

Были получены слитые белки, содержащие модифицированные полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе. Получали слитые полипептиды U-PA, включающие дикого типа или модифицированный сайт активации u-PA и домен протеазы u-PA. Примерные белки u-PA, содержащие последовательность активации u-PA дикого типа для активации, представлены в последовательностях SEQIDNO: 1004, 1005, 1011 и 1015. Слитые пептиды могут содержать партнер слияния и/или сигнал для экспрессии и/или секреции.

Например, приведенный в качестве примера слитый белок u-PA, представленный в SEQIDNO: 1004, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), Fc (SEQIDNO: 992), последовательность активации u-PA (SEQIDNO: 995) и домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987).В дополнительном примере слитый белок u-PA, представленный в виде SEQIDNO: 1005, содержит полноразмерную зрелую последовательность u-PA (SEQIDNO: 3 с модифицированным доменом протеазы, представленной в SEQIDNO: 987), и N-концевую последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999).

В дополнительном примере слитый белок u-PA, представленный в виде SEQIDNO: 1011, содержит N-концевую последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), полноразмерную зрелую последовательность u-PA (SEQIDNO: 3 с модифицированным доменом протеазы, представленной в SEQIDNO: 987), и Fc (SEQIDNO: 992).

В другом примере слитый белок u-PA, представленный в виде SEQIDNO: 1015, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), N-конец u-PA (представленный в виде аминокислот 21-178 SEQIDNO: 1), включающий последовательность активации u-PA, домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987) и HSA (SEQIDNO: 991). Модифицированные полипептиды u-PA, такие как полипептиды SEQIDNo 1006, 1007, 1009 и 1010, после экспрессии продемонстрировали активность протеазы u-PA.Модифицированный u-PA с последовательностью активации фуринаN-конца до u-PA со слиянием IgFC на C-конце (такой, как изложено в SEQIDNO: 1010) показал самую высокую активность.

vi. Метки очистки

Иллюстративные слитые белки u-PA содержат метку для очистки слитого белка u-PA или u-PA. Примеры меток для очистки слитых белков u-PA приведены в разделе F выше. Иллюстративные слитые белки u-PA могут содержать SUMO или His последовательность для очистки.

(a) Метка His

Слитые белки u-PA могут включать His-метку, такую как 6xHis, представленную в SEQIDNO: 989, и домен протеазы u-PA.

Получали слитые полипептиды u-PA, включающие His-метку очистки и u-PA-протеазную область. Приведены примеры слитых белков HIS-u-PA в SEQIDNO: 1017 и 1018.

His меченные молекулы u-PA могут содержать партнер слияния и/или сигнал для экспрессии и секреции. Например, приведенный в качестве примера слитый белок His-u-PA, представленный в SEQIDNO: 1017, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), 6xHis (SEQIDNO: 989), SUMO (SEQIDNO: 1031), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и HSA (SEQIDNO: 991).В другом примере,

приведенный в качестве примера His меченный слитый белок u-PA, представленный в виде SEQIDNO: 1018, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), 6xHis (SEQIDNO: 989), SUMO (SEQIDNO: 1031), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и Fc (SEQIDNO: 992).

(b) SUMO

Слитые белки u-PA могут включать his-метку и/или SUMO-последовательности для накопления в телах включения. Например, HIS-SUMO последовательность, приведенная в SEQIDNO: 990, и домен протеазы u-PA, могут быть связаны с полноразмерным модифицированным полипептидом u-PA или его каталитически активной частью, такой как домен протеазы, или с большей частью модифицированного полипептида u-PA. Получали слитые полипептиды U-PA, включающие HIS-SUMO-метки и u-PA-протеазную область.Иллюстративные белки HIS-SUMO-u-PA представлены в последовательностях SEQIDNO: 1017 и 1018. HIS-SUMO-меченные молекулы u-PA могут содержать партнер слияния и/или сигнал для экспрессии и секреции.

Например, слитый белок His-SUMO-u-PA, представленный в SEQIDNO: 1017, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), 6xHis (SEQIDNO: 989), SUMO (SEQIDNO: 1031), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и HSA (SEQIDNO: 991).В другом примере, приведенный в качестве примера His-SUMO-u-PA слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1018, содержит пептидную последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека каппа (k) (SEQIDNO: 999), 6xHis (SEQIDNO: 989), SUMO (SEQIDNO: 1031), домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21) и Fc (SEQIDNO: 992).

7. Молекулы нуклеиновой кислоты

Здесь предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды u-PA. Молекулы нуклеиновой кислоты включают аллельные варианты или варианты сплайсинга любого кодируемого полипептида u-PA или его каталитически активной части. В одном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, предложенные в настоящем документе, имеют по меньшей мере 50,55,60, 65,70,75, 80,85,90, 91,92,93, 94,95,96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с любой нуклеиновой кислотой, кодируемой полипептидом u-PA или его каталитически активной частью.В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты может включать те, которые имеют вырожденные последовательности кодонов любого из полипептидов u-PA или их каталитически активных частей, таких как те, которые приведены в настоящем документе.

Также представлены молекулы нуклеиновых кислот или слитые белки, содержащие каталитически активную часть молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанную с промотором, таким как индуцируемый промотор для экспрессии в клетках млекопитающих. Такие промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы CMV и SV40; промоторы аденовируса, такие как промотор гена E2, который реагирует на онкобелокHPVE7; промотор PV, такой как промотор p89 PBV, который реагирует на белок PVE2; и другие промоторы, которые активируются ВИЧ или PV или онкогенами.

U-PA протеаза, упомянутая в данном документе, также может быть доставлена к клеткам в векторах переноса генов. Передаточные векторы также могут кодировать дополнительный другой терапевтический агент (ы) для лечения заболевания или расстройства, такого как ревматоидный артрит или сердечно-сосудистое заболевание или AMD или DGF, для которых вводят протеазу.

Векторы переноса, кодирующие протеазу, могут быть использованы системно, путем введения нуклеиновой кислоты субъекту. Например, вектор переноса может представлять собой вирусный вектор, такой как аденовирусный вектор. Векторы, кодирующие протеазу, также могут быть включены в

стволовые клетки и такие стволовые клетки, вводимые субъекту, например, путем трансплантации или приживления стволовых клеток в местах для терапии. Например, мезенхимальные стволовые клетки (MSC) могут быть сконструированы для экспрессии протеазы, и такие MSC прививают на участок трансплантата для терапии.

G. КОМПОЗИЦИИ, СОСТАВЫ И ДОЗЫ

Фармацевтические композиции, содержащие модифицированные полипептиды u-PA, модифицированные слитые белки u-PA или кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть приготовлены любым традиционным способом путем смешивания выбранного количества полипептида с одним или более физиологически приемлемыми носителями или эксципиентами. В большинстве вариантов осуществления модифицированный полипептид u-PA или слитый белок будет находиться в активированной форме в композиции для введения.Таким образом, например, полипептиды будут представлять собой две цепные активированные формы или, где слитый белок содержит домен мультимеризации, белок может представлять собой мультимер, такой как димер.

Выбор носителя или эксципиента находится в пределах навыка профессионала и может зависеть от ряда параметров. Они включают, например, режим введения (те системный, пероральный, назальный, легочный, местный, местный или любой другой режим) и нарушение для обработки. Фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, могут быть составлены для единичной дозировки (прямого) введения или для разбавления или другой модификации.Концентрации соединений в составах эффективны для доставки количества при введении, которое является эффективным для предназначенной обработки. Как правило, композиции составлены для однократного дозированного введения.

Для составления композиции массовую долю соединения или их смеси растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом смешивают в выбранном носителе с эффективной концентрацией таким образом, что

обработанное состояние освобождается от нарушения или облегчается. Фармацевтические носители или другие носители, подходящие для введения соединений, представленных в данном документе, включают любые такие носители, известные специалистам в данной области, которые могут быть пригодны для конкретного режима введения.

1. Введение модифицированных полипептидов u-PA

Для целей этой секции модифицированные полипептиды u-PA относятся к полипептидам u-PA, которые содержат модификации, такие как модифицированные домены протеазы, и включают конъюгаты, такие как слитые белки. Полипептиды могут быть приготовлены в виде единственного фармацевтически активного ингредиента в композиции или могут быть объединены с другими активными ингредиентами. Полипептиды могут быть нацелены при доставке, например, путем конъюгирования с нацеливающим агентом, таким как антитело.Липосомальные суспензии, в том числе нацеленные на ткани липосомы, также могут быть пригодны в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Например, липосомные составы могут быть получены, как описано в патенте США № 4, 522811. Липосомальная доставка также может включать составы медленного высвобождения, включающие фармацевтические матрицы, такие как коллагеновые гели и липосомы, модифицированные фибронектином (см. например, Weineretal(1985) JPharmSci.74 (9): 922-5).

Активное соединение включают в фармацевтически приемлемый носитель в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта при отсутствии нежелательных побочных эффектов на обрабатываемый объект. Терапевтически эффективная концентрация может быть определена эмпирически путем тестирования соединений в известных системах invitro и invivo, таких как анализы, представленные в настоящем документе.

Полипептиды u-PA, представленные в настоящем документе (т.е. активные соединения), могут быть введены invitro, exvivo или invivo путем контактирования смеси, такой как жидкость организма или другой образец ткани, с полипептидом u-PA, предусмотренным в данном документе, включая любой из модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе.Например, при введении соединения exvivo жидкость организма, стекловидное тело, или образец ткани от субъекта, может контактировать с полипептидами u-PA, которые покрыты трубкой или фильтром.При введении invivo активные соединения можно вводить любым подходящим способом, например перорально, назально, легочным, парентерально, внутривенно, внутрикожно, интравитреально, интраретинально, субретинально, перикулярно, подкожно или местно, в жидкой, полужидкой или твердой форме и составлены способом, подходящим для каждого пути введения.Определение дозировки находится в пределах компетенции врача, и может быть функцией конкретного расстройства, пути введения и субъекта.

Примеры дозировок включают, например, 0,1-1 мг.

Модифицированный полипептид u-PA и физиологически приемлемые соли и сольваты могут быть приготовлены для введения путем ингаляции (либо через рот, либо нос), перорально, трансдермально, легочно, парентерально или ректально. Для введения путем ингаляции модифицированный полипептид u-PA может быть доставлен в виде аэрозольного распыления из герметизированных пакетов или распылителя с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля под давлением единица дозирования может быть определена путем снабжения клапаном для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи, например, желатин для использования в ингаляторе или инсуффляторе, могут быть составлены из порошковой смеси терапевтического соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Для введения в легкие модифицированный полипептид u-PA может быть доставлен в виде аэрозоля из распылителя, турбулизатора или микропроцессорно-управляемого дозированного перорального ингалятора с использованием подходящего пропеллента. Обычно размер частиц аэрозоля является небольшим, например, в диапазоне от 0,5 до 5 мкм. В случае фармацевтической композиции, составленной для легочного введения, обычно не используют детергентные поверхностно-активные вещества.Легочная доставка лекарственного средства является перспективным неинвазивным способом системного введения. Легкие представляют собой привлекательный путь для доставки лекарственного средства, преимущественно за счет высокой площади поверхности для поглощения, тонкого альвеолярного эпителия, обширной васкуляризации, отсутствия метаболизма первого прохода печени и относительно низкой метаболической активности.

Для перорального введения фармацевтические композиции могут принимать форму, например, таблеток, пилюль, жидких суспензий или капсул, полученных обычными средствами с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как связующие агенты (например, желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция);

смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк или диоксид кремния); разрыхлители (например, крахмал картофельный или гликолятkрахмала натрия); или смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки могут быть покрыты способами, хорошо известными в данной области техники. Жидкие препараты для перорального введения могут принимать форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для смешения с водой или другим подходящим носителем перед использованием.Такие жидкие препараты могут быть получены обычными средствами с фармацевтически приемлемыми

добавками, такими как суспендирующие агенты (например, сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры); эмульгирующие агенты (например, лецитин или аравийская камедь); неводные транспортные средства (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла); и консерванты (например, метил или пропил-п-гидроксибензоаты или сорбиновая кислота).Препараты также могут содержать буферные соли, ароматизаторы, красители и подслащивающие вещества.

Препараты для перорального введения могут быть приготовлены для контролируемого высвобождения активного соединения. Для введения композиции могут принимать форму таблеток или пастилок, составленных традиционным способом.

Модифицированные полипептиды u-PA могут быть приготовлены в виде препарата депо. Такие лекарственные формы длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечно. Таким образом, например, терапевтические соединения могут быть составлены с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде труднорастворимых производных, например, в виде труднорастворимой соли. Модифицированный полипептид u-PA может быть составлен для парентерального введения инъекцией (например, болюсной инъекцией или непрерывной инфузией).

Составы для инъекций могут быть представлены в единичной дозированной форме (например, в ампулах или в многодозовых контейнерах) с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать формующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может находиться в порошкообразной лиофилизированной форме для совмещения с

подходящим носителем, например стерильной апирогенной водой, перед использованием.

Модифицированные полипептиды u-PA могут быть приготовлены для окулярной или офтальмомической доставки. Окулярная доставка лекарственного средства может представлять собой, например, местную, пероральную или системную, и/или инъецированную. Например, модифицированный полипептид (ы) u-PA или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный полипептид (ы) u-PA, может вводиться местно, например, в виде глазных капель.В другом примере модифицированный полипептид (ы) u-PA или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный полипептид (ы) u-PA, может быть введена периглазным и/или интравитреальным или интраретинальным или субретинальным введением, таким как, например, окологлазное, или интраретинальное, или интравитреальное введение.

Модифицированные полипептиды u-PA или фармацевтическая композиция, содержащая модифицированные полипептиды u-PA или нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды u-PA, могут быть приготовлены для системного введения для лечения DGF. В другом примере модифицированные полипептиды u-PA или фармацевтическая композиция, содержащие модифицированные полипептиды u-PA или нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды u-PA, непосредственно вводят в почку или в ткани или органы рядом или окружают трансплантированную почку. Модифицированные полипептиды u-PA или фармацевтическую композицию, содержащую модифицированные полипептиды u-PA, можно вводить до момента пересадки аллотрансплантата или в момент трансплантации с введением, продолжающимся со временем, в и/или можно вводить во время эпизода отторжения в случае возникновения такого эпизода.

Фармацевтические композиции могут быть составлены для местного применения, например, для местного нанесения на кожу (трансдермальные) и

слизистые оболочки, такие как в глазу, в виде гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаз или для интрацистернального или внутриспинального применения. Такие растворы, в частности, предназначенные для офтальмологического применения, могут быть составлены в виде 0,01%-10% изотонических растворов и pH около 5-7 с соответствующими солями. Соединения могут быть приготовлены в виде аэрозолей для местного применения, например, путем ингаляции (см. например, патент США № № № 44,126, 4414209 и 4364923, которые описывают аэрозоли для доставки стероида, пригодного для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы).

Концентрация активного соединения в композиции лекарственного средства зависит от поглощения, инактивации и скорости выведения активного соединения, плана дозирования и количества вводимого, а также других факторов, известных специалистам в данной области. Как описано далее, дозировки могут быть определены эмпирически с использованием сравнения свойств и активностей (например, расщепления одного или более белков комплемента) модифицированного полипептида u-PA по сравнению с немодифицированнымполипептидом u-PAи/или полипептидом u-PA дикого типа.

Композиции, при желании, могут быть представлены в упаковке, в комплекте или дозаторе, который может содержать одну или более единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. В некоторых примерах композиция может быть нанесена на устройство, такое как, например, на трубе или фильтре. Упаковка, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, такая как блистерная упаковка. Упаковка или раздаточное устройство может сопровождаться командами для введения.Композиции, содержащие активные агенты, могут быть упакованы в виде изделий, содержащих упаковочный материал, агент, предусмотренный в данном документе, и этикетку, которая указывает на нарушение, для которого предназначено средство.

Также предложены композиции, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, включающие векторы экспрессии, кодирующие полипептиды u-PA. В некоторых вариантах осуществления композиции молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды u-PA, и векторы экспрессии, кодирующие их, пригодны для генной терапии.Вместо доставки белка нуклеиновая кислота может быть введена invivo, например, системно или другим способом, или exvivo, например, путем удаления клеток, включая лимфоциты, введения в нее нуклеиновой кислоты и повторного введения в хозяина или совместимого реципиента.

2. Введение нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные полипептиды u-PA (генная терапия)

Модифицированные полипептиды u-PA могут быть доставлены в клетки и ткани путем экспрессии молекул нуклеиновой кислоты. Модифицированные полипептиды u-PA могут быть введены в виде молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих модифицированные полипептиды u-PA, включая методы exvivo и прямую экспрессию invivo. Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в клетки и ткани любым способом, известным специалистам в данной области. Выделенная нуклеиновая кислота может быть включена в векторы для дальнейшей обработки.

Способы введения полипептидов u-PA экспрессией кодирующих молекул нуклеиновой кислоты включают введение рекомбинантных векторов. Вектор может быть выполнен с возможностью оставаться эписомным, например, путем включения начала репликации или может быть сконструирован для интеграции в хромосому в клетке.

Полипептиды u-PA также могут быть использованы в генной терапии exvivo с использованием векторов. Подходящие векторы генной терапии и способы доставки известны специалистам в данной области. Например, клетки

могут быть сконструированы для экспрессии модифицированного полипептида u-PA, такого как интегрирующий полипептид u-PA, кодирующий нуклеиновую кислоту, в геномное положение, функционально связанное с регуляторными последовательностями или таким образом, что он функционально связан с регуляторными последовательностями в геномном местоположении.Такие клетки затем могут быть введены локально или системно субъекту, такому как пациент, нуждающийся в обработке. Иллюстративные векторы для генной терапии invivo и exvivo включают вирусные векторы и невирусные векторы, такие как, например, липосомы или искусственные хромосомы.

Вирусные векторы, включают, например, аденовирусы, герпесвирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), ретровирусы, такие как лентивирусы, EBV, SV40. Могут быть использованы векторы цитомегаловируса, векторы вируса осповакцины и другие, предназначенные для генной терапии. Векторы могут быть теми, которые остаются эписомными или теми, которые могут интегрироваться в хромосомы обрабатываемого субъекта. Модифицированный полипептид u-PA может кодироваться в вирусном векторе, таком как AAV, который вводится субъекту, нуждающемуся в лечении.

Вирусные векторы, подходящие для генной терапии, включают аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирус, лентивирус и другие, указанные выше. Например, технология экспрессии аденовируса хорошо известна в данной области техники, а способы получения и введения аденовируса также хорошо известны. Аденовирусные серотипы доступны, например, из AmericanTypeCultureCollection (ATCC ®, Rockville, MD). Аденовирус может быть использован exvivo, например, клетки выделяют из пациента, нуждающегося в лечении, и трансдуцируют модифицированным полипептидом аденовируса, экспрессирующим u-PA. После подходящего периода культивирования трансдуцированные клетки вводят субъекту, локально и/или системно.

Альтернативно, полипептидные частицы, экспрессирующие полипептид u-PA, выделяют и составляют в фармацевтически приемлемом носителе для доставки

терапевтически эффективного количества для предотвращения, лечения или облегчения заболевания или состояния субъекта. В одном варианте осуществления заболевание, подлежащее лечению, вызвано активацией комплемента.Обычно частицы аденовируса доставляются в дозе от 1 частицы до 10^{14} частиц на килограмм веса субъекта, обычно от 10^{6} или 10^{8}частиц до 10^{12} частиц на килограмм веса субъекта.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в искусственные хромосомы и другие невирусные векторы. Искусственные хромосомы, такие как ACES (см. Lindenbaumetal. NucleicAcidsRes (2004) 32 (21): e172), могут быть сконструированы для кодирования и экспрессии полипептида u-PA. Вкратце, искусственные хромосомы млекопитающих (MAS) обеспечивают средство для введения больших порций генетической информации в клетку в автономно реплицирующемся, неинтегрирующемформате.

Уникальные среди MAC системы экспрессии искусственной хромосомы на основе ДНК млекопитающих (*ACES*) могут воспроизводимо генерироваться denovo в клеточных линиях различных видов и легко очищаются от хромосом клеток-хозяев. Очищенные *ACES* млекопитающих затем могут быть повторно введены во множество линий клеток-реципиентов, где они стабильно поддерживаются в течение продолжительных периодов в отсутствие селективного давления с использованием системы ACE.С помощью этого подхода была достигнута конкретная загрузка одной или двух генных мишеней в клетках LMTK (-) и CHO.

Другой способ введения нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные полипептиды u-PA, представляет собой двухстадийный способ замены генов в дрожжах, начиная с полного генома аденовируса (Ad2; Ketneretal. (1994) ProcNatlAcadSciUSA 91: 6186-6190), клонированного в дрожжевой искусственной хромосоме (YAC), и плазмиду, содержащую аденовирусные последовательности для нацеливания специфической области в

клоне YAC, экспрессионную кассету для представляющего интерес гена и положительный и отрицательный селектируемый маркер. YAC представляют особый интерес, поскольку они позволяют вводить большие гены. Этот подход может быть использован для конструирования векторов на основе аденовируса, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из описанных модифицированных полипептидов u-PA для переноса генов на клетки млекопитающих или всех животных.

Нуклеиновые кислоты могут быть инкапсулированы в носителе, таком как липосома, или введены в клетку, такую как бактериальная клетка, в частности аттенуированная бактерия или введена в вирусный вектор. Например, при использовании липосом белки, которые связываются с мембранным белком клеточной поверхности, связанным с эндоцитозом, могут быть использованы для нацеливания и/или облегчения захвата, например, капсидные белки или их фрагменты, антитела для белков, которые подвергаются интернализации при циклировании, и белки, которые нацелены на внутриклеточную локализацию и усиливают внутриклеточный период полужизни.

В некоторых вариантах осуществления желательно обеспечить источник нуклеиновой кислоты агентом, который нацелен на клетки, таким как антитело, специфичное для мембранного белка клеточной поверхности или клетки-мишени, или лиганд для рецептора на клетке-мишени. Полинуклеотиды и векторы экспрессии, предусмотренные здесь, могут быть получены любым подходящим способом. Также представлены векторы нуклеиновых кислот, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, как описано выше. Также предложены векторы нуклеиновых кислот, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, как описано выше, и клетки, содержащие эти векторы.

Для способов exvivo и invivo молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид u-PA, вводят в клетки от подходящего донора или подлежащего лечению субъекта. Клетки, в которые можно вводить нуклеиновую кислоту для целей терапии, включают, например, любой

желаемый, доступный тип клеток, подходящий для заболевания или состояния, подлежащего лечению, включая, но не ограничиваясь этим, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты; клетки крови, такие как Тлимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, гранулоциты; различные стволовые или прогениторные клетки, в том числе гематопоэтические стволовые или прогениторные клетки, например, такие как стволовые клетки, полученные из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови, фетальной печени и других их источников.

Для обработки exvivo клетки от донора, совместимого с подлежащим лечению субъектом, или клетки от субъекта, подлежащего лечению, удаляют, нуклеиновую кислоту вводят в эти выделенные клетки, и модифицированные клетки вводят субъекту.

Лечение включает прямое введение, такое как, например, инкапсулирование в пористые мембраны, которые имплантируются в пациента (см. например, патенты США № 48925538 и 5283187). Способы, подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих invitro, включают использование липосом и катионных липидов (например,DOTMA, DOPEandDC-Chol),электропорацию, микроинъекцию, слияние клеток, DEAE-декстран и способы осаждения фосфатов кальция. Способы доставки ДНК могут быть использованы для экспрессии полипептидов u-PAinvivo. Такие способы включают доставку липосом нуклеиновых кислот и доставку оголенной ДНК, включая локальную и системную доставку, например, с использованием электропорации, ультразвуковой и кальций-фосфатной доставки.Другие способы включают микроинъекцию, слияние клеток, опосредованный хромосомой перенос генов, опосредованный микроклеточным переносом и слиянием сферопластов.

Экспрессия модифицированного полипептида u-PAinvivo может быть связана с экспрессией дополнительных молекул. Например, экспрессия полипептида u-PA может быть связана с экспрессией цитотоксического

продукта, такого как сконструированный вирус или экспрессированный в цитотоксическом вирусе. Такие вирусы могут быть нацелены на конкретный тип клеток, который является мишенью для терапевтического эффекта. Экспрессированный полипептид u-PA может быть использован для усиления цитотоксичности вируса.

Экспрессия invivo полипептида u-PA может включать в себя функциональное связывание полипептида u-PA, кодирующей молекулы нуклеиновой кислоты, с конкретными регуляторными последовательностями, такими как специфичный для клеток или тканеспецифичный промотор. Полипептиды U-PA также могут быть экспрессированы из векторов, которые специфически инфицируют и/или реплицируют в целевых типах клеток и/или тканях. Индуцируемые промоторы можно использовать для селективного регулирования экспрессии полипептида u-PA.

Молекулы нуклеиновых кислот, в качестве оголенных нуклеиновых кислот или в векторах, искусственные хромосомы, липосомы и другие носители могут вводиться субъекту посредством системного введения, местного, и других путей введения. При системном введении и invivo молекула нуклеиновой кислоты или носитель, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, может быть нацелена на клетку.

Введение также может быть прямым, например, путем введения вектора или клеток, которые обычно нацелены на клетку или ткань. Например, опухолевые клетки и пролиферирующие клетки могут представлять собой клетки-мишени для экспрессии invivo полипептидов u-PA. Клетки, используемые для экспрессии invivo полипептида u-PA, также включают клетки, аутологичные для пациента. Такие клетки можно удалить из пациента, вводить нуклеиновые кислоты для экспрессии u-PA-полипептида, а затем вводить пациенту, например, путем инъекции или приживления.

Введение для лечения AMDи других глазных заболеваний

Нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные полипептиды u-PA, могут быть введены для лечения заболеваний или состояний, включающих активацию комплемента в их этиологии, в которой их ингибирование может улучшить симптом заболевания или состояния или иным образом лечить заболевание или состояние.

Нуклеиновые кислоты, такие как векторы, такие как вирусные векторы, предназначенные для доставки нуклеиновых кислот, которые кодируют модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут вводиться субъектам любым подходящим способом или комбинацией различных путей, в зависимости от заболевания или состояния.

Доставка нуклеиновой кислоты может осуществляться посредством непосредственной доставки к глазу (например, через окулярную доставку, субретинальную инъекцию, интравитреальную (IVT) инъекцию, внутриретинальное введение или местное (например,, доставки глазных капель) или доставки через системные пути, например внутриартериальное, внутриглазное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрикожное и другие пути введения.

Специалист в данной области может выбрать любой режим введения, совместимый с субъектом и вирусом, и который также, вероятно, приводит к достижению вируса и поступлению в клетки-мишени или ткани, например, глаза, таких как эпителиальные (РПЭ) клетки сетчатки и/или фоторецепторные клетки.Путь введения может быть выбран специалистом в данной области в соответствии с любым из множества факторов, включая характер заболевания, свойства клетки-мишени или ткани (например, тип клеток) и конкретный вирус. Введение может быть выбрано, когда клетки или интересующие ткани нацелены, такие как глаз, например, эпителиальные (РПЭ) клетки сетчатки и/или фоторецепторные клетки или субретинальное пространство.

Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированные полипептиды u-PA, такие как вирусные векторы экспрессии, может быть доставлена, например, к клетке-мишени, которая характеризуется заболеванием, таким как глазное заболевание, такое как AMD. Например, композиция, содержащая вирус, может быть доставлена путем субретинальной инъекции, такой как субретинальная инъекция на ретинальный пигментный эпителий (RPE), фоторецепторные клетки или другие глазные клетки (например, ганглиозные клетки сетчатки).В некоторых примерах субретинальное введение вируса, такого как любой вирус, содержащий нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, требует квалифицированного врача для выполнения витрэктомии (т.е. в сетчатке создается отверстие для иглы, а жидкость вводится, такая как жидкость, содержащая вирус, такой как любой вирус, описанный в данном документе).

Субретинальные инъекции можно осуществлять через зрачок и затем через хрусталик, стекловидное тело и сетчатку.В других примерах субретинальную инъекцию можно проводить, пропуская иглу или любое другое устройство для введения через склеру, через среднее или заднее стекловидное тело и на противоположную сторону сетчатки, в субретинальное пространство.

В других примерах субретинальную инъекцию можно проводить, пропуская иглу или любое другое устройство введения через склеру и через хороидею и мембрану Бруха, исключая сетчатку для достижения доставки в РПЭ. Другие соответствующие пути для субретинального введения могут быть определены специалистом или врачом или хирургом. В некоторых примерах сигналы формирования обеспечивают успешное введение.

В других примерах композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид u-PA для экспрессии в глазу, может быть доставлена интравитреальной инъекцией в глазные клетки, такая как введение в целевые жизнеспособные клетки и клетки во внутренней сетчатке. В некоторых примерах интравитреальную инъекцию осуществляют путем пропускания иглы или любого другого устройства введения через среднее или заднее стекловидное тело и на противоположную сторону сетчатки.

После интравитреальной инъекции композиция, содержащая вирус, может быть доставлена для инфицирования ганглиозных клеток.

В других примерах композиция, содержащая вирус, доставляется клетками внутреннего ядерного слоя интравитреальной инъекционной мишени. Эффективность доставки зависит от титра и серотипа вируса. В некоторых примерах лечение включает прямое интравитреальное введение в сочетании с интравитреальным имплантируемым устройством (т.е.биоэродируемое и небиоэродируемоеинтравитреальное имплантируемоеустройсто) для увеличения концентрации вводимого агента (Hwangetal (2012) JKoreanMedSci 27: 1580-85).

В других примерах композицию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид u-PA, вводят через пальпебральную вену в целевые глазные клетки. В других примерах вирус наносят exvivo (например, наносят на иссеченные хориоидальные или фетальные клетки сетчатки или сетчатые клетки) для трансплантации в глаз, например, в качестве ретинального трансплантата.В других примерах специалист в данной области техники может выбрать соответствующий маршрут для введения любого вируса, содержащего нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе. При необходимости могут быть объединены пути введения.

В одном примере вирус вводят локально, на участке, где присутствуют клетки-мишени, например, пораженные клетки, те в глазу или сетчатке. Местное применение часто используют в глазных заболеваниях переднего сегмента глаза (Pateletal. WorldJPharmacol (2013) 2: 47-64).

В одном примере вирус, который должен быть доставлен интравитерально, может быть введен тонкой иглой (27-30 G) внутрь стекловидного тела. Специалист в данной области техники определит, насколько далеко ствол иглы вставлен в глаз (например, глубину введения),

скорость введения (например, давление, приложенное к плунжеру), угол ориентации скоса. Н ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

Н. ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, нацелены на белок C3 комплемента и позволяют модулировать комплементом опосредованные заболевания и нарушения.

Терапевтические протеазы, такие как модифицированные полипептиды u-PA, представленные здесь, имеют много потенциальных преимуществ по сравнению с традиционными терапевтическими подходами. Главной среди них является способность инактивировать мишени заболевания каталитическим способом Таким образом, протеазы могут поддерживать эффективную регуляцию при концентрациях значительно ниже целевой концентрации. Дополнительные преимущества включают (1) необратимую инактивацию; (2) низкую дозировку; (3) пониженную частоту дозировки (4) небольшой молекулярный размер; (5) способность к целевым посттрансляционным модификациям; (6) способность нейтрализовать высокие целевые концентрации; и (7) способность нацеливаться в сторону от активного участка.

В качестве терапевтического средства протеаза должна все еще проявлять следующие характеристики: (1) доступ к молекулярной мишени (внеклеточный), и (2) обладать достаточно высокой специфичностью для цели, критической для состояния заболевания. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы при лечении комплемент-опосредованных заболеваний и расстройств.

Специалист в данной области техники понимает роль системы комплемента в процессах заболевания и осведомлен о различных таких заболеваниях. Приведено краткое обсуждение примерных заболеваний и роли белка C3 комплемента в их этиологии и патологии.Модифицированные

полипептиды u-PA и молекулы нуклеиновой кислоты, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения любого состояния, для которого вовлечена активация пути комплемента, в частности воспалительных состояний, включая острые воспалительные состояния, такие как септический шок и хронический воспалительный синдром, такие как ревматоидный артрит (RA). Острые и воспалительные состояния могут проявляться в качестве иммуноопосредованного заболевания, такого как, например, аутоиммунное заболевание или повреждение тканей, вызванное опосредованным иммунным комплексом воспалением. Опосредованное комплементом воспалительное состояние также может проявляться как

нейродегенеративное или сердечно-сосудистое заболевание, которые имеют воспалительные компоненты. Эта секция приводит примеры использования и способов введения модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе. Эти описанные способы лечения являются примерными и не ограничивают применения модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, способы лечения физиологических и медицинских состояний, описанных и перечисленных ниже.Такие способы включают, но не ограничиваются ими, способы лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD), географической атрофии (GA), пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), функции отсроченного трансплантата почек (DGF), сепсиса, ревматоидного артрита (RA),

мембранного пролиферативного гломерулонефрита (MPGN), красной волчанки, рассеянного склероза (MS), Миастении гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, респираторного дистресс-синдрома, иммунным комплексом (IC)-опосредованного острого воспалительного поражения ткани, многоорганной недостаточности, болезни Альцгеймера (AD), ишемически-реперфузионных повреждений, вызванных событиями или обработками, такими как инфаркт миокарда (MI), инсульт, сердечно-легочный обход (CPB) или коронарный артериальный шунтирующий трансплантат,

ангиопластика или гемодиализ, хронической болезни легких (ХОБЛ), идиопатического легочного фиброза (IPF) и/или синдрома Гиллиана- Барра.

Лечение заболеваний и состояний с модифицированными полипептидами u-PA, предусмотренными в данном документе, может быть осуществлено любым подходящим способом введения с использованием подходящих составов, как описано в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь этим, подкожную инъекцию, пероральное, интравитреальное, внутриретинальное, субретинальное, перикулярное и трансдермальное введение. При необходимости конкретная дозировка и продолжительность и протокол лечения могут быть эмпирически определены или экстраполированы. Например, типичные дозы полипептидов u-PA дикого типа могут быть использованы в качестве начальной точки для определения соответствующих доз.

Модифицированные полипептиды u-PA, которые обладают большей специфичностью и/или селективностью по сравнению с полипептидом u-PA дикого типа, могут быть эффективными при уменьшенных дозировках и/или частотах. Уровни дозировки могут быть определены на основе множества факторов, таких как масса тела индивидуума, общее состояние здоровья, возраст, активность конкретного применяемого соединение, пол, диету, время введения, скорость экскреции, комбинацию лекарственных средств, тяжесть и курс заболевания, а также склонность пациента к заболеванию и суждение лечащего врача. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалами носителя для получения одной лекарственной формы, будет изменяться в зависимости от обрабатываемого хозяина и конкретного режима введения.

При улучшении состояния пациента можно вводить поддерживающую дозу соединения или композиций, при необходимости; и дозировку, дозированную форму или частоту введения, или их комбинацию, можно модифицировать. В некоторых случаях субъект может требовать прерывистого лечения на долгосрочной основе при любом рецидиве симптомов заболевания.

1. Заболевание, опосредованное активацией комплемента

Каскад комплемента вызывает защиту от бактериальной и вирусной инвазии за счет стимуляции фагоцитоза и воспаления.

И наоборот, даже когда комплемент функционирует нормально, он может вносить вклад в развитие заболевания за счет стимулирования локального воспаления и повреждения тканей. Таким образом, патологические эффекты опосредованы теми же медиаторами, которые отвечают за защитные роли комплемента.

Например, анафилактический и хемотаксический пептид C5a приводит к воспалению за счет рекрутинга и активации нейтрофилов, C3a может вызывать патологическую активацию других фагоцитов, а комплекс мембранной атаки может убивать или повреждать клетки. В одном из примеров, таких как во многих аутоиммунных заболеваниях, комплемент продуцирует повреждение тканей, так как он активируется при несоответствующих обстоятельствах, таких как антителом к ткани хозяина.

В других ситуациях комплемент может быть активирован нормально, например, септицемией, но все еще вносит вклад в прогрессирование заболевания, например, при респираторном дистресс-синдроме. Патологически, комплемент может вызвать существенное повреждение кровеносных сосудов (васкулита), базальной мембраны почки и прикрепленных эндотелиальных и эпителиальных клеток (нефрита), синовиального сустава (артрита) и эритроцитов (гемолиза), если он не управляется адекватно.

Комплемент играет роль в иммунопатогенезе ряда нарушений, включая аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит (см. например, Wang *etal.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 92:8955-8959; Moxley *et al.* (1987) *Arthritis & Rheumatism* 30:1097-1104), волчанка (Wang *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 90:8563-8568; and Buyon*et al.* (1992) *Arthritis Rheum.* 35:1028-1037) и острыйгломерулонефрит (Couser*et al.* (1995) *J Am Soc Nephrol.*5:1888-1894). Другие патологии, которые включают активацию системы

комплемента, включают сепсис (see, *e.g.*, Stove*etal.* (1996) *ClinDiagLabImmunol* 3:175-183; Hack*etal.* (1989) *Am.J. Med.* 86:20-26), респираторный дистресс-синдром(Zilow*etal.*(1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:151-157; и Stevens *et al.* (1986) *J. Clin. Invest.* 77:1812-1816), многоорганныйотказ(see, *e.g.*, Hecke *et al.* (1997) *Shock* 7:74; and Heideman*et al.*(1984) *J. Trauma* 24:1038-1043),ишемически-реперфузионное повреждение, такое как происходит в сердечно-сосудистом заболевании, таком как инсульт или инфаркт миокарда (AustenWG*etal.* (2003) *IntJImmunopatholPharm* 16(1):1-8), возрастная макулярная дегенерация (Bradley*etal.Eye*25: 683-693 (2011); Gemenetzi*etal.Eye*30: 1-14 (2016)) и почечная отсроченная функция трансплантата (Danobeitia*etal.Am J Transplant.* 2013; 13 (suppl 5); Yu *et al.* (2016) *Am J Transplant* 16(9):2589-2597; Castallano*et al.*(2010) *AmJPathol* 176(4):1648-1659). Некоторые примеры заболеваний, опосредованных комплементом, описаны ниже.

a. Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (RA) представляет собой хроническое воспалительное заболевание. Оно представляет собой аутоиммунное заболевание, в котором иммунная система атакует нормальные тканевые компоненты, как если бы они проникали в патогены. Воспаление, связанное с ревматоидным артритом, прежде всего атакует места соединений. Мембраны, выстилающие кровеносные сосуды, сердце и легкие, также могут быть воспалены.

RA характеризуется наличием активированных B-клеток и плазматических клеток, присутствующих в воспаленной синовиальной среде, и в установленном заболевании лимфоидных фолликул и зародышевых центров. Это приводит к высоким уровням локального продуцирования иммуноглобулина и отложению иммунных комплексов, которые могут включать в себя IgG и IgM ревматоидные факторы, в синовиуме и в связи с суставным хрящом, которые могут служить инициаторами каскада комплемента.

Повышенные уровни компонентов комплемента, таких как C3a, C5a и C5b -9, были обнаружены в воспаленных ревматоидных соединениях. Эти компоненты

комплемента могут усиливать воспаление, связанное с RA, посредством индуцирования множества провоспалительных действий, таких как, например, изменения проницаемости сосудов, хемотаксиса лейкоцитов и активации и лизиса нескольких типов клеток.

b. Сепсис

Сепсис является заболеванием, вызываемым серьезной инфекцией, такой как бактериальная инфекция, приводящая к системной воспалительной реакции. Компонент стенки бактериальной клетки, липополисахарид, часто связан с сепсисом, хотя другие бактериальные, вирусные и грибковые инфекции могут стимулировать септические симптомы.Септический шок часто приводит к тому, что естественная иммунная система организма не способна защищать от проникновения микроорганизма, так что, например, провоспалительные последствия иммунного ответа повреждают ткани хозяина.

Ранние стадии сепсиса характеризуются избыточной активацией комплемента, что приводит к увеличению продукции комплементныханафилаксинов, таких как C3a, C4a и C5a, которые действуют, увеличивая проницаемость сосудов, стимулируют выработку супероксида из нейтрофилов и стимулируют высвобождение гистамина.

Действия C5a могут вносить вклад в продуктивный иммунный ответ на бактериальную инфекцию, но при остальном нерегулируемом, C5a также может быть сильно повреждающим. В модели воспаления, индуцированной E.coli, блокада C5a улучшает исход септических животных за счет ограничения опосредованной C5a активации нейтрофилов, что может привести к опосредованному нейтрофилами повреждению ткани.

Продолжительное нарушение врожденного иммунного ответа на бактериальную инфекцию часто приводит к хроническому сепсису или септическому шоку, которые могут быть угрожающими жизни. На поздней стадии сепсиса имеет место "дремлющая" активность нейтрофилов, в отличие от гиперактивности, возникающей в ранних фазах, что способствует продолжающемуся

заболеванию. На поздней стадии уменьшаются основные функции нейтрофилов, включая хемотаксис, дыхательная разрывная активность и способность к уничтожению бактерий.Комплемент, в частности C5a, также играет роль в более поздних стадиях сепсиса.

Избыточное продуцирование C5a во время сепсиса связано с «дезактивацией» нейтрофилов крови, процесс, который был связан с C5a-индуцированной понижающей регуляции своего собственного рецептора, C5aR, на нейтрофилах (Guoetal (2003) FASEBJ 13: 1889).Сниженные уровни C5aR на нейтрофилах коррелируют с пониженной способностью нейтрофилов крови связывать C5a, нарушенными хемотаксическими реакциями, потерей получения супероксида и нарушением бактерицидной активности. Тем не менее, уровни C5aR могут начинать восстанавливаться на более поздних стадиях сепсиса и коррелировать со случаями благоприятного исхода заболевания.

c. Рассеянный склероз

Рассеянный склероз (MS) и животный модельный экспериментальный аллергический энцефаломиелит (EAE) являются воспалительными демиелинизирующими заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС). При MS воспаление нервной ткани вызывает потерю миелина, жирный материал, который действует как вид защитной изоляции для нервных волокон в головном мозге и спинном мозге.При этом демиелинизация оставляет множество областей рубцовой ткани (склероз) вдоль покрытия нервных клеток, что нарушает способность нервов проводить электрические импульсы в и из головного мозга, продуцируя различные симптомы MS. MS, опосредуется активированными лимфоцитами, макрофагами/микроглией и системой комплемента. Активация комплемента может вносить вклад в патогенез этих заболеваний посредством его двойной роли: способности активированного терминального комплекса C5b -9 стимулировать демиелинизацию и способность C5b -9 защищать олигодендроциты (OLG) от апоптоза.

d. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (AD) характеризуется аномальными спаренными спиральными нитями белка tau, который обычно связывается с микротрубочками, и бляшками (внеклеточными отложениями, составленными в основном из бета-амилоидного белка) в головном мозге. Хотя точная причина АД не полностью прозрачна, хроническое нейровоспаление в пораженных регионах мозгов AD предполагает, что провоспалительные медиаторы могут играть роль. Бляшки в головном мозге AD осаждают активированными фрагментами комплемента, такими как, например, C4d и C3d. Аналогично, дистрофические нейриты в головном мозге AD могут быть иммуноокрашены для MAC, что свидетельствует о автокаталитическом поражении этих нейритов и сопутствующей потере нейритов в AD.

Активация комплемента в AD происходит посредством независимого от антитела механизма, индуцированного агрегированным белком амилоид-бета. Кроме того, каскад комплемента может быть активирован с помощью пентраксинов, С-реактивного белка (СРБ) и амилоида Р (АР), которые все повышаются в AD (McGeeretal. (2002) TrendsMolMed 8: 519). Активация комплемента в AD, отмеченная увеличением медиаторов комплемента, не адекватно контролируется компенсаторной повышающей регуляцией регуляторных белков комплемента, таких как, например, CD59.Таким образом, провоспалительные последствия активации комплемента усиливают прогрессирование AD и, вероятно, способствуют разрушению нейритов.

e. Ишемически-реперфузионное повреждение

Ишемически-реперфузионное повреждение является повреждением после ишемического события и последующим восстановлением кровотока и приводит к воспалительной реакции на гипоксический инсульт. Ишемически-реперфузионное повреждение может быть острым, как во время кардиохирургических вмешательств, таких как, например, после открытой

хирургии сердца или ангиопластики, или хроническим, как с застойной сердечной недостаточностью или окклюзионным сердечно-сосудистым заболеванием.

Примеры повреждений, которые могут вызывать ишемически-реперфузионное повреждение, включают инфаркт миокарда (MI) и инсульт. Инициирование воспалительного ответа, вероятно, вызывается увеличением уровней кислорода в ткани, которые происходят с реперфузией и сопутствующим накоплением метаболитов, которые могут генерировать свободные радикалы кислорода, которые являются иммуностимулирующими.Ишемически-реперфузионное повреждение связано с множеством событий, включая тяжесть инфаркта миокарда, ишемические события головного мозга, ишемию кишечника и многие аспекты сосудистой хирургии, кардиохирургии, травмы и трансплантации.

Повреждение проявляется воспалительными событиями врожденной иммунной системы, в частности активацией системы комплемента, в ответ на вновь измененную ткань. Поскольку такая ишемически-реперфузионная травма характеризуется отеком тканей, вызванным повышенной сосудистой проницаемостью, и острым воспалительным клеточным инфильтратом, вызываемым притоком полиморфноядерных лейкоцитов.

Активация системы комплемента играет роль в воспалительных событиях ишемически-реперфузионного повреждения. Повреждение приводит к изменениям клеточной мембраны, влияя на липиды, углеводы или белки внешней поверхности таким образом, что эти открытые эпитопы изменяются и могут действовать как неоантигены (модифицированные аутоантигены). Циркулирующие IgM распознают и связывают неоантигены с образованием иммунных комплексов на поверхности пораженной клетки.Образовавшиеся комплексы антиген-антитело представляют собой классические активаторы классического пути комплемента, хотя все пути, вероятно, вовлечены каким-либо образом в обострение эффектов повреждения.

Вовлечение классического пути комплемента в ишемически-реперфузионное повреждение подтверждается мышами, генетически дефицитными либо по C3, либо C4, которые проявляют равную защиту от

локального повреждения в задней конечности и животной модели повреждения (Austenetal. (2003) IntJImmunopathPharm 16: 1).Наоборот, в почечной модели ишемического повреждения , C3 -, C5-и C6-дефицитные мыши были защищены, в то время как мыши с дефицитом C4- нет, что свидетельствуют о значении альтернативного пути комплемента (Guoetal. (2005) AnnRevImmunol 23: 821). Медиаторы, индуцированные при активации комплемента, инициируют воспалительный ответ, направленный на клеточную мембрану в месте локального повреждения.

Основным эффекторным механизмом комплемента при ишемически-реперфузионном повреждении является приток и активация нейтрофилов к воспаленной ткани компонентов комплемента, таких как, например, C5a. Активация нейтрофилов приводит к увеличению продукции активных форм кислорода и высвобождению лизосомных ферментов в локальных пораженных органах, что в конечном итоге приводит к апоптозу, некрозу и потере или функции органа.Формирование оконечного MAC, C5b -9, также способствует локальному повреждению ткани при ишемически-реперфузионном повреждении.

f. Глазные нарушения

В нормальном глазу система комплемента постоянно активирована на низких уровнях; мембранно-связанные и растворимые внутриглазные регуляторные белки плотно регулируют эту спонтанную активацию комплемента. Активация комплемента с низким уровнем защищает от патогенов, не вызывая какого-либо повреждения ткани и потери зрения.Система комплемента и регуляторные белки комплемента контролируют внутриглазное воспаление в аутоиммунном ответе и играют важную роль в развитии воспаления роговицы, возрастной макулярной дегенерации и диабетической ретинопатии (Ghosh*etal.* (2015) *EndocrRev* 36:272–288) а также в диабетическую сердечно-сосудистой болезни.

Спонтанная активация комплемента может вызвать повреждение ткани роговицы после инфицирования. Ингибирование комплемента представляет собой соответствующую терапевтическую цель при лечении различных заболеваний глаз (см. например, Purushottametal. (2007) MolImmuno.44: 3901-3908).

Возрастная макулярная дегенерация (AMD)

Возрастная макулярная дегенерация представляет собой клинический термин, который описывает разнообразные заболевания, характеризующиеся прогрессирующей потерей центрального зрения. AMD является ведущей причиной потери зрения у лиц пожилого возраста во многих индустриальных странах (Jageretal (2008) NEnglJMed 358: 2606-2617). Потеря зрения происходит за счет прогрессивной дегенерации макулы, области на задней части глаза, содержащей высокую плотность конусных фоторецепторов, специализированную для остроты зрения, центрального зрения.

AMD может проявляться как сухая (неоваскулярная) AMD и/или влажная AMD. Сухая AMD является более распространенной (85-90% случаев) формой AMD, и характеризуется малым, круглым, белым-желтым повреждением (друз) в и под макулы. Усовершенствованная сухая AMD, или географическая атрофия, приводит к утонению сетчатки за счет потери ПРЕ фоторецепторов, ухудшению макулы и возможной слепости. Хотя являются более редкими, потери зрения, связанные с влажной AMD, как правило, являются более резкими, чем в сухой AMD.Влажная AMD включает образование патогенных кровеносных сосудов, называемых хориоидальнойнеоваскуляризацией (CNV), в которой аномальные кровеносные сосуды развиваются под слоем ретинального пигментного эпителия (РПЭ) сетчатки.

CNV инвазия сетчатки от нижерасположенного хороида через трещины в мембране Бруха, внеклеточный матрикс между хороидом и ретинальным пигментным эпителием (РПЭ), или их разрушение может вызвать потерю зрения в AMD (например, за счет субретинального кровоизлияния и/или рубцевания).

Ранние клинические признаки AMD включают утолщение мембраны Бруха и появление друз (Gass, JD (1972) Trans. AmOphalmol. Soc.70: 409-36), которые являются внеклеточными липопротеиновыми отложениями, состоящими из агрегированных белков (те альбумина, аполипопротеина E (АПОЕ)), компонентов пути комплемента (например, фактора комплемента H (CFH), C1q, C3, C5, C5b, C6, C7, C8, C9 и витронектина (Hagemanetal. (2001) Prog. Retin.Eye. Res 29: 95-112; Hageman et al (2005) Proc Nat.Acad. Sci.102: 7227-7232; Mullins et al (2000) FASEB H 14: 835-846; Anderson et al. (2010) Pro. Retin. Eye. Res.29: 95-112), иммуноглобулиныи/илиамилоид-бета (Crabb et al. (2002) ProcNatlAcadSci 99: 14682-14687; Johnsonetal. (2002) 99: 11830-11835)) и липиды и клеточные компоненты, которые локализованы между RPE и мембраной Бруха.

Воспаление в AMD опосредуется дерегуляцией альтернативного пути комплемента. Компоненты комплемента C3 и C5 являются основными составляющими друз у пациентов с AMD (Mullinsetal. (2000) FASEB J 14, 835-46; Johnson et al. (2000) Exp East Res 70, 441-9; Anderson et al. (2002) Am J Ophalmol 134, 411-31; и Leitner et al. (2001) Exp East Res 73, 887-96). Предполагается, что биогенез друз включает хронические воспалительные процессы, которые могут запускать активацию комплемента и образование MAC, которые могут лизировать клетки RPE или нарушать физиологический гомеостаз в клетках RPE, приводя к характеристикам воспаления AMD (Johnsonetal (2001) ExpEyeRes 73, 887-896).

Белки комплемента (например, C3d) также обнаруживали в крови у пациентов с AMD (Scholletal. (2008) PLoSOne 3: e2593), указывая, что AMD-индуцированное воспаление может быть системным.Имеется генетическое доказательство роли в комплементе в патогенезе сухой AMD (Kleinetal. Science 308 (5720): 385-389 (2005); Yatesetal. NEJM 357: 553-561 (2007)), компстатина (и производные компстатинаAPL -1 и APL -2) и POT -4 (PotentiaPharmaceuticals); небольшие пептидные ингибиторы C3 могут замедлять прогрессирование географической атрофии (Ricklinetal (2008) Adv. ExpMed. Biol.632: 273-292) в AMD, что указывает на то, что C3 (те ингибирование C3) может быть жизнеспособной мишенью для обработки AMD.

g. Трансплантация органов и отсроченная функция трансплантанта (DGF)

Комплемент играет роль в патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения. Механизм почечного реперфузионного повреждения зависит от генерации C5a и C5b -9, оба из которых имеют прямую токсичность на почечные канальцы, вносящие вклад в острый трубчатый некроз и апоптоз, и приводя к постишемической острой почечной недостаточности и фиброзе ткани.В свою очередь, генерирование этих компонентов терминального пути зависит от внутрипочечного синтеза C3 и доступности других компонентов комплемента, необходимых для активации комплемента. Уровень экспрессии C3 в донорском органе сильно зависит от холодного ишемического времени (Elhametal. (2010) CurrOpinOrganTransplant. 15: 486-491).

На отторжение при пересадке органа влияет первоначальный воспалительный ответ и последующий адаптивный аллоиммунный ответ, оба из которых подвержены влиянию различных компонентов комплемента. Белки комплемента играют значительную часть при повреждении органа после трансплантации в процессе ишемии модулируют активацию адаптивного иммунного ответа.

Ингибирующий комплемент или модулирование функции молекул белка комплемента может уменьшить повреждение органа трансплантата и увеличить срок службы органа (см. например, Elhametal. (2010) CurrOpinOrganTransplant.15: 486-491). Нацеливающие комплектующие компоненты для терапевтического вмешательства могут уменьшать повреждение органов во время восстановления органа, переноса и после трансплантации. Примером таких органов является почка.Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть введены для уменьшения и/или лечения повреждения органа после трансплантации.

Отсроченная функция трансплантата (DGF), такая как отсроченная функция почек, представляет собой состояние, происходящее в поднаборе пациентов с почвенным трансплантатом, в котором трансплантированный орган не функционирует нормально сразу после трансплантации. Другие возможные трансплантаты включают, но не ограничиваются ими, сердце, легкое, сосудистую ткань, глаз, роговицу, линзу, кожу, костный мозг, мышцу, соединительную ткань, желудочно-кишечную ткань, нервную ткань, кость, стволовые клетки, островки, хрящ, гепатоциты и гематопоэтическиеклетки.

Почечный DGF характеризуется острым некрозом почечного аллотрансплантата и клинически определяется необходимостью проведения диализа сразу после трансплантации. При этом острое повреждение почек в процессе трансплантации часто проявляется как DGF. Патологии, лежащие в основе DGF, составляют комплекс с вкладами от факторов, происходящих от донора, таких как возраст донора и продолжительность ишемии, и реципиентные факторы, такие как реперфузионное повреждение, иммунологические реакции и лечение иммунодепрессивными препаратами.

Компоненты каскада комплемента и активации комплемента играют решающую роль в качестве медиаторов отторжения трансплантата и ишемически-реперфузионного повреждения, приводящего к DGF. Исследования животных установили ключевую роль для комплемента при ишемическом реперфузионном повреждении. Например, Eculizumab,

гуманизированноемоноклональное антитело, направленное против C5, блокирует активацию комплемента и как было показано, предотвращает отсроченную функцию трансплантата в поднаборе пациентов с высоким риском трансплантации почки (см. например,

5 HorizonScanningResearchandIntelligenceCentrebrief, 2016 September; Johnson*etal.*(2015) *CurrOpin Organ Transplant* 20(6):643-651; Yu *et al.* (2016) *Am J Transplant* 16(9):2589-2597).Отложение гранулированного C4d связано с DGF у реципиентов аллотрансплантата почки человека (Kikić *etal.* (2014) *TransplInt* 27(3):312-321).

10 Увеличение продукции C3 связано с отторжением трансплантата почки (Prattetal. (2002) NatMed 8 (6): 582-587; Daminanetal (2011) NephrolDialTransmission 26 (7): 2345-2354). Следовательно, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве терапевтического средства для предотвращения или

15 облегчения или устранения отторжения трансплантата и DGF.

2. Терапевтические применения

a. Иммуноопосредованные воспалительные заболевания

Модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем

20 документе, могут быть использованы для лечения воспалительных заболеваний. Воспалительные заболевания, которые могут быть обработаны протеазами, включают острые и хронические воспалительные заболевания.

25

Примеры воспалительных заболеваний включают заболевания центральной нервной системы (ЦНС), аутоиммунные заболевания, состояния гиперреактивности дыхательных путей, такие как астма, ревматоидный артрит,

30 воспалительное заболевание кишечника и иммунное комплексное (IC)-

опосредованное острое воспалительное повреждение тканей. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE) может служить моделью для рассеянного склероза (MS) (Piddlesdenetal. (1994) JImmunol 152: 5477). EAE может быть индуцирован в ряде генетически восприимчивых видов путем иммунизации миелиновыми компонентами, такими как миелиновый основной белок, протеолипидный белок и миелинолигодендроцитарный гликопротеин (MOG).

Например, MOG-индуцированный ЭАЭ рекапитулирует существенные признаки MS человека, включая хроническое, рецидивирующее течение заболевания, патогистологические триады воспаления, реактивный глиоз и образование больших конфлюэнтных демиелинизированных бляшек. Модифицированные полипептиды u-PA могут быть оценены в моделях EAE животных. Вводят модифицированные полипептиды u-PA, посредством ежедневной внутрибрюшинной инъекции, и контролируют течение и прогрессирование симптомов по сравнению с контрольными животными. Уровни воспалительных компонентов комплемента, которые могут усугублять заболевание, также могут быть измерены путем анализа активности комплемента сыворотки в гемолитическом анализе и количественного анализа компонентов комплемента, таких как, например, C1, C3 и C9.

Активация комплемента модулирует воспаление при заболеваниях, таких как ревматоидный артрит (RA) (Wangetal. (1995) ProcNatlAcadSciU.S.A.92: 8955). Модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы для обработки RA. Например, полипептиды u-PA могут быть инъецированы локально или системно. Модифицированные полипептиды u-PA можно дозировать ежедневно или еженедельно. Пэгилированные полипептиды u-PA могут быть использованы для снижения иммуногенности.

В одном примере коллаген-индуцированный артрит II типа (CIA) может быть индуцирован у мышей в качестве модели аутоиммунного воспалительного заболевания суставов, который гистологически аналогичен RA, характеризующемуся воспалительным синовитом, формированием паннуса, и

эрозии хряща и кости. Для индукции CIAвнутрикожно в основание хвостовика внутрикожно вводят коллаген II типа (B-CII) в присутствии полного адъюванта Фрейнда. Через 21 дня мышей можно повторно иммунизировать с использованием идентичного протокола.Для исследования эффектов полипептида u-PA, 3 недели после первоначального заражения в B-CII можно вводить полипептид u-PA или контроль внутрибрюшинно 2 раза в неделю в течение 3 недель.

Мышей умерщвляли через 7 недель после начальной иммунизации для гистологического анализа. Для оценки терапевтического эффекта полипептида u-PA по установленному заболеванию можно вводить полипептид u-PA ежедневно в течение всего 10 дней после начала клинического артрита в одной или более конечностях. Степень набухания в первоначально пораженных суставах может контролироваться путем измерения толщины лапы с помощью калибров.В обеих моделях сыворотку можно вытянуть из мышей для гемолитических анализов и измерения маркеров комплемента активации, таких как, например, C5a и C5b -9. В другом примере модели приматов доступны для обработки RA. Ответ набухшего сустава можно контролировать у субъектов, обработанных полипептидами u-PA, и контролями для оценки обработки полипептида u-PA.

Модифицированный полипептид u-PA может быть использован для лечения иммунокомплексом (IC)-опосредованного острого воспалительного поражения ткани. Опосредованное IC повреждение вызвано локальным воспалительным ответом против отложения IC в ткани. Последующий воспалительный ответ характеризуется отеком, нейтрофилией, кровотечением и, наконец, некрозом тканей. Опосредованное IC повреждение ткани можно изучать в реакции invivoArthus (RPA).

Вкратце, в реакции RPA в кожу животных вводят избыток антитела (такого как, например, кролик IgG против куриного яйца), такого как, например, крысы или морские свинки, которые ранее были введены внутривенно с соответствующим антигеном (Szalaietal. (2000) JImmunol 164: 463).

Непосредственно перед началом реакции РПА можно вводить полипептид u-PA, или регулятор болюса, одновременно с соответствующим антигеном путем внутривенной инъекции через правую бедренную вену.

Альтернативно, полипептид u-PA можно вводить в течение начального часа реакции RPA, начиная непосредственно после инъекции антигена и непосредственно перед дермальной инъекцией антитела.Воздействие полипептида u-PA на формирование комплемент-зависимого IC-опосредованного повреждения ткани можно оценить в различные моменты времени после начала RPA путем сбора крови для определения гемолитической активности сыворотки, и путем сбора инфицированной области кожи для количественного определения размера поражения.

Терапевтические полипептиды u-PA, такие как описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения сепсиса и тяжелого сепсиса, который может привести к летальному удару. Модель опосредованного комплементом летального шока может быть использована для исследования эффектов полипептида u-PA в качестве терапевтического агента. В одном таком примере крысы могут быть праймированы следовым количеством липополисахарида (ЛПС) с последующим введением моноклонального антитела против мембранного ингибитора комплемента (анти-Crry) (Mizunoetal. (2002) Int ArchAllergyImmunol 127: 55-62).

Полипептид u-PA или контроль можно вводить в любое время в ходе инициирования летального шока, например, перед введением ЛПС, после введения ЛПС или после введения анти-Crry и спасения крыс от летального шока.

b. Нейродегенеративное заболевание

Активация комплемента усиливает прогрессирование болезни Альцгеймера (AD) и способствует потере невритов в головном мозге AD.

Модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения AD. Мышиные модели, имитирующие некоторые нейропатологические и поведенческие признаки AD, могут быть использованы для оценки терапевтических эффектов полипептидов u-PA. Примеры трансгенных мышиных моделей включают введение белка-предшественника амилоида человека (APP) или белка пресенилина 1 (PS1) с продуцирующими заболевание мутациями в мыши под контролем агрессивного промотора. У этих мышей развиваются характеристики AD, включая увеличение бета-амилоидных бляшек и дистрофических нейритов.Двойные трансгенные мыши для мутантных белков APP и PS1 выделяют большие количества фибриллярных бета-амилоидных бляшек и проявляют факторы комплемента, связанные с бляшкой.

Могут быть введены полипептиды U-PA, ежедневными внутрибрюшинными или внутривенными инъекциями, а курс и прогрессирование симптомов контролируют по сравнению с контрольными животными.

d. Сердечно-сосудистые заболевания

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Полипептиды U-PA могут быть использованы при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, включающих ишемию реперфузионного повреждения, возникающую в результате инсульта, инфаркта миокарда, сердечно-легочного шунтирования, аортокоронарного шунтирования, ангиопластики или гемодиализа. Полипептиды U-PA также могут быть использованы при лечении воспалительного ответа, связанного с сердечно-легочным обходом, что может способствовать повреждению тканей. Как правило, полипептид u-PA можно вводить до, одновременно с или после лечения или события, которое

индуцирует опосредованное комплементом ишемического реперфузионного повреждения.

В одном примере полипептид u-PA можно вводить субъекту до лечения субъекта посредством опосредованного комплементом события, индуцирующего ишемическое повреждение, такого как, например, коронарный артериальный шунтирующий трансплантат для ангиопластики. Влияние полипептида u-PA на лечение ишемического реперфузионного повреждения может быть оценено на животных моделях травмы. В одной такой модели ишемия миокарда наводится у кроликов, имеющих разрез, выполненный в их переднем перикарде, путем размещения 3-0 шелкового шва вокруг левой передней нисходящей (LAD) коронарной артерии 5-8 мм от ее начала и затягивания лигатуры таким образом, что сосуд становится полностью закупоренным (Buerkeetal. (2001) JImmunol 167: 5375).

Полипептид u-PA, такой как, например, модифицированный полипептид u-PA, или носитель, такой как физиологический раствор, может быть подан внутривенно в возрастающих дозах в качестве болюса за 55 минут после коронарной окклюзии (т.е. 5 минут до реперфузии). Через пять минут (т.е. через 60 минут ишемии) нить LAD может быть развязана, а ишемический миокард может быть реперфузирован в течение 3 часов. В конце реперфузионного периода затягивают лигатуру вокруг LAD.Влияние полипептида u-PA на ишемию ишемии может быть проанализировано путем оценки влияния на некроз миокарда, уровней креатинкиназы плазмы и маркеров активации нейтрофилов, таких как, например, миелопероксидаза и высвобождение супероксида.

В другой модели комплемент-опосредованного повреждения миокарда, задержанного при перфузии изолированных мышиных сердец буфером Krebs-Henseleit, содержащим 6% человеческой плазмы, обработка модифицированных

полипептидов u-PA может быть использована для ограничения повреждения тканей сердца. В таком примере буфер, используемый для перфузии сердца, может быть дополнен различными дозами модифицированных полипептидов u-PA.Перфузируемые сердца могут быть проанализированы на осаждение C3 и C5в -9 человека, перфузионное давление коронарной артерии, конечно-диастолическое давление и частоту сердечных сокращений.

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы в качестве терапевтических средств до или после искусственного кровообращения (CPB) или коронарного шунтирующего трансплантата для ингибирования воспалительного иммунного ответа, который часто следует обходить и который может вносить вклад в повреждение ткани. Осуществляют рециркуляцию цельной крови invitro.

Экстракорпоральная схема обхода может быть использована для стимуляции изменений тромбоцитов и лейкоцитов и активации комплемента, индуцированной CPB (Rinderetal. (1995) JClin. Invest. 96: 1564). В такой модели полипептид u-PA или контрольный буфер в различных дозах может быть добавлен в транспортную упаковку, уже содержащую кровь из здорового донора и свиного гепарина, непосредственно перед добавлением крови к экстракорпоральному контуру. Образцы крови можно вытянуть на 5,15,30, 45, 60, 75 и 90 минут после рециркуляции и анализа для исследований комплемента, таких как, например, гемолитические анализы и/или анализы активации комплемента для измерения для C5a, C3a, и/или sC5b -9. Образец предварительной обработки крови, проведенной перед его добавлением в экстракорпоральную схему, может быть использован в качестве контроля. Проточную цитометрию образцов крови можно проводить для определения уровней молекул адгезии на популяциях циркулирующих лейкоцитов (т.е. нейтрофилов) в крови, таких как, например, уровни CD11b и P-селектина.

e. Связанная с возрастом макулярная дегенерация (AMD)

Модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD). Возрастная макулярная дегенерация (AMD), которая может быть обработана протеазами, включает влажную AMD, сухую AMD и географическую атрофию.

Доступны многочисленные модели животных AMD, которые имитируют многие характеристики человеческих расстройств (Pennesietal (2012) Mol. Aspects. Med. 33 (4): 487-509)). Мутации в генах пути комплемента показали увеличение или снижение восприимчивости к AMD (Edwardsetal. (2005) Science 308 (5720): 421-424; Hageman et al (2005) Proc Nat. Acad Sci 102 (20): 7227-7232; Klein et al (2005) Science 308 (5720): 385-389). Например, в факторе комплемента H (CFH), который обычно взаимодействует с C3b, однонуклеотидный полиморфизм Y402H предотвращает связывание C3b с фактором B, что приводит к ингибированию образования C3.Y402H связан с повышенным риском развития AMD у людей, и мутация ранее была идентифицирована в 43-59% пациентов AMD (Hainesetal (2005) Science 308 (5720): 419-421; Thakkinstianet. Al (2006) Hum. Mol. Genet.15 (18): 2784-2790; Zareparsi et al (2005) Am J Hum. Genet.77 (1): 149-153).

Генетически модифицированные мыши, которые не обладают способностью сделать CFH развивающие характеристики AMD, включая аномалии сетчатки, сниженную остроту зрения и осаждение комплемента (Coffeyetal (2007) ProcNat. Acad. Sci.104: 16651-16656). мутации в белках комплемента B (Montesetal (2009) ProcNat. Acad. Sci.106 (11): 4366-4371), C2 (Gold et al (2006) Nat. Genet.38 (4): 458-462) и C3 (Maller et al (2007) Nat. Genet.39 (10): 1200-1201; Yatesetal (2007) NewEngl. JMed. 357 (6): 553-561) связаны с повышенным или пониженным риском развития AMD на основе их влияния на экспрессию и/или активность различных белков комплемента (Reynolds*etal.* (2009) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50(12): 5818–5827).

Модифицированные протеазы u-PA, такие как модифицированные протеазы u-PA, представленные в настоящем документе, где активность, такая как субстратная специфичность или селективность, u-PA протеазы для расщепления белка C3 комплемента может быть изменена, могут быть использованы в качестве терапевтических средств. Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, вводят, например, интравитреально или субретинально, или интраретинально инъекцией, и проводят мониторинг течения и прогрессирования симптомов по сравнению с контрольными животными или субъектами.Уровни компонентов комплемента, которые могут усугублять заболевание, также могут быть измерены путем анализа активности комплемента сыворотки в гемолитическом анализе и количественном анализе компонентов комплемента, таких как, например, C1, C3 и C9.

Активация комплемента играет роль в развитии заболевания в возрастной макулярной дегенерации (AMD) (Bradley*etal.*, (2011) *Eye* 25:683-693; Gemenetzi*etal.* (2016) 30:1-14).

Модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы для обработки AMD. Например, полипептиды u-PA или фармацевтическая композиция, содержащая полипептиды u-PA, такие как модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут быть введены интравитреально, или интраретинально, или субретинально, или перикулярно. Модифицированные полипептиды u-PA можно дозировать ежедневно или еженедельно или менее часто, например, ежемесячно или менее часто, например, би-ежемесячно.

Для AMD модифицированные полипептиды uPA, которые больше не являются "модифицированными" для расширенной продолжительности в глазу (например, слитые белки, ПЭГилирование и т.д.) ежемесячное дозирование, вероятно (двухмесячное дозирование также рассматривается). После соответствующей "модификации" может быть возможно каждые 3 месяца (или

менее часто). Модифицированные полипептиды u-PA могут быть модифицированы, например, путем ПЭГилирования для снижения потенциальной иммуногенности и/или увеличения периода полужизни в сыворотке.

5

e. Трансплантирование органа

Отсроченная функция трансплатнанта (DGF)

Модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения отсроченной функции трансплантата (DGF), включая, например, DGF в результате ишемии-реперфузионного повреждения у реципиентов трансплантата почек. Полипептиды U-PA также могут быть использованы при лечении воспалительного ответа, связанного с органным трансплантатом, который может вносить вклад в повреждение тканей.

Как правило, полипептид u-PA можно вводить до, одновременно с или после лечения или события, которое индуцирует опосредованное комплементом ишемическое реперфузионное повреждение. В одном примере полипептид u-PA можно вводить субъекту до лечения субъекта посредством опосредованного комплементом события, индуцирующего ишемическое повреждение, такого как, например, почечный трансплантат или аллотрансплантат почки. Воздействие полипептида u-PA на лечение отсроченной функции трансплантата, например отсроченной функции трансплантата в результате ишемически-реперфузионного повреждения, может быть оценено на животных моделях травмы, которые имитируют характеристики, отображенные в аллотрансплантатах или трансплантатах почки человека.

Наличие ранних биомаркеров ранней дисфункции трансплантата, приводящих к DGF, включая биомаркеры повреждения трубчатой эпителиальной клетки, может указывать необходимость в терапии. Идентифицированы биомаркерыDGF (т.е. сывороточный креатин)

(Malyszko et al (2015) Nature Scientific Reports 5: 11684; Wanga et al (2015) PLoS One 10 (9): e0136276). Раннее обнаружение биомаркеровDGF и терапевтического вмешательства, таких как, например, терапевтическая обработка модифицированного полипептида u-PA, может улучшить результаты лечения.

Активация комплемента модулирует прогрессирование заболевания при нарушениях, таких как отсроченная функция трансплантата после трансплантации органа, например трансплантата почки (Yu*etal.* (2016) *AmJofTransplantation* 16(9):2589-2597). Модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы для обработки DGF. Например, полипептиды u-PA могут быть введены для системной доставки или могут быть введены непосредственно в трансплантат или окружающие ткани.

Модифицированные полипептиды u-PA можно вводить до, во время или после трансплантации.Модифицированные полипептиды u-PA можно дозировать ежедневно или еженедельно или менее часто, например, ежемесячно или менее часто, таких как би-ежемесячно. В некоторых случаях вводят единую системную дозу модифицированного полипептида u-PA. Также рассматриваются многочисленные инфузии модифицированного полипептида u-PA в течение нескольких часов.

Модифицированные полипептиды u-PA могут быть доставляться хронически (постоянно) , при необходимости, например, модифицированные полипептиды u-PA, такие как модифицированные полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены на суточной основе или на другом графике для поддержания эффективного количества в реципиенте аллотрансплантата. Модифицированные полипептиды u-PA могут быть использованы для продления выживаемости аллотрансплантата у реципиента, в частности хронической выживания аллотрансплантата. Пэгилированные полипептиды u-PA могут быть использованы для снижения иммуногенности.

3. Комбинированная терапия

Полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, могут быть использованы в комбинации с другими существующими лекарственными средствами и терапевтическими агентами для лечения заболеваний и состояний. Такие обработки могут быть выполнены в сочетании с другими противовоспалительными лекарственными средствами и/или терапевтическими агентами.Примеры противовоспалительных лекарственных средств и агентов, пригодных для комбинированной терапии, включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID), включающие салицилаты, такие как аспирин, традиционные NSAID, такие как ибупрофен, напроксен, кетопрофен, нобуметон, пироксикам, диклофенак, или индометацин, и селективные ингибиторы Cox -2, такие как целекоксиб (продаваемый под торговой маркой Celebrex ®) или Ротекоксин (продаваемый под торговой маркой Vioxx ®).

Другие соединения, полезные при комбинированной терапии включают антиметаболиты, такие как метотрексат и лефлуномид, кортикостероиды или другие стероиды, такие как кортизон, дексаметазон или преднизон, анальгетики, такие как ацетаминофен, аминосалицилаты, такие как месаламин, и цитотоксические агенты, такие как азатиоприн (продаваемый под торговой маркой Imuran ®), циклофосфамид (продаваемый под торговой маркой Cytoxan ®) и циклоспорин А

Дополнительные агенты, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, включают модификаторы биологической реакции. Модификаторы биологического ответа могут включать провоспалительные ингибиторы цитокинов, включая ингибиторы TNF-альфа, такие как этанэрцепт (продаваемый под торговой маркой Enbrel ®), инфликсимаб (продаваемый под торговой маркой Remice ®), или адалимумад (продаваемый под торговой маркой Humira ®), и ингибиторы IL -1, такие как анакинра (продаваемый под торговой маркой Kineert ®).

Модификаторы биологической реакции также могут включать противовоспалительные цитокины, такие как IL -10, В-клеточные

нацеливающие агенты, такие как анти-CD20 антитела (продаваемые под торговой маркой Ритуксимаб ®), соединения, нацеленные на Т антигены, блокаторы молекул адгезии, антагонисты хемокинов, ингибиторы киназы, такие как ингибиторы митоген-активированный белок (MAP) киназа, c-JunN-концевая киназа (JNK), или ядерный фактор (NF) kB (NFκB), и рецептор, активируемый пролифераторомпероксисомы гамма (PPAR-γ) .

Дополнительные средства, которые могут быть использованы в комбинированной терапии, включают иммунодепрессанты. Иммуносупрессанты могут включать такролимус или FK -506; микофенольную кислоту; ингибиторы кальцинейрина (CNI); CsA; сиролимус или другие средства, известные для подавления иммунной системы. Полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, также могут быть использованы в комбинации с агентами, которые вводят для лечения сердечно-сосудистого заболевания и/или вводят во время процедур для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как, например, описанные в настоящем документе, которые вносят вклад в воспалительные состояния, связанные с опосредованным комплементом ишемически-реперфузионным повреждением.

Например, предложенные полипептиды u-PA могут быть введены в комбинации с антикоагулянтами.Примеры примерных антикоагулянтов включают, но не ограничиваются ими, гепарин, варфарин, аценокумарол, фениндион, ЭДТА, цитрат, оксалат и прямые ингибиторы тромбина, такие как аргатробан, лепирудин, бивалирудин и ксимелагатран.

Полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, также могут быть использованы в комбинации с агентами, которые вводятся для обработки DGF. Полипептиды U-PA, предложенные в настоящем документе, могут, например, вводиться в комбинации с иммуносупрессорным агентом. Такая комбинация полезна при продлении выживания аллотрансплантата у реципиента.В предпочтительных вариантах осуществления изобретения комбинация составлена и приготовлена таким образом, что она подходит для введения реципиенту аллотрансплантата, например, применяют стабильные составы. В

некоторых вариантах осуществления комбинация составлена и приготовлена таким образом, что она пригодна для одновременного введения модифицированных полипептидов u-PA и иммуносупрессивного лекарственного средства реципиенту аллотрансплантата. В некоторых вариантах осуществления комбинация составлена и приготовлена таким образом, что она подходит для последовательного (в любом порядке) введения модифицированных полипептидов u-PA и иммуносупрессорного лекарственного средства реципиенту аллотрансплантата.

Полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, также могут быть использованы в комбинации с другими агентами, которые вводят для лечения макулярной дегенерации. Например, модифицированные полипептиды u-PA можно вводить с любым одним или более из ранибизумаба (продаваемого под торговой маркой Lucentis ™); бевацизумаба (продаваемого под торговым наименованиемAvasin ™);пегаптаниба натрия (продаваемый под торговым наименованием Macugen ™); афлиберцепта (продаваемый под торговой маркой Eylea ™); и вертепорфина (продаваемый под торговым названием Visudyne ™). Полипептиды U-PA, предложенные в настоящем документе, также могут быть использованы в комбинации с имплантируемым телескопом, лазерной обработкой или лазерной фотокоакоагуляцией, хирургией и/или фотодинамической терапией, отдельно или в сочетании с терапевтическим вертепорфином, для лечения макулярной дегенерации.

Дополнительные агенты, такие как другие ингибиторы комплемента, могут быть использованы в качестве противовоспалительных лекарственных средств в комбинированной терапии с модифицированными полипептидами u-PA, описанными здесь.

Примеры таких других ингибиторов комплемента включают фактор CVF, полианионные молекулы, такие как гепарин, декстран сульфат, поливинилсульфат, полилизин, или сурфамин, природные молекулы, такие как K -76 COOH, розмариновая кислота, или экстракт китайской лекарственной травы Ephedra, синтетические молекулы, такие как афамастатмезилат (FUT - 175), синтетический ингибитор C1s (C1s-INH -248), или ингибитор против C1s и fD (BCX -1470), пептидные ингибиторы, такие как компастатин, ингибиторы антител комплемента, такие как анти-C5 (N19-8), гуманизированное анти-C5 (H5G1.1), анти-C6 или анти-C8 антитела, и растворимые формы мембранных регуляторов комплемента, такие как растворимый CR1 (sCR1), растворимый DAF (sDAF), растворимый MCP (sMCF), или растворимый CD59 (sCD59) (Morganetal. (2003) MolImmuno.40: 159).

Фармацевтические композиции, содержащие полипептиды u-PA, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения любого одного или более воспалительных заболеваний или состояний, опосредованных активацией комплемента. Также предложены комбинации полипептидов u-PA и другого лечения или соединения для обработки воспалительного заболевания или состояния. Полипептиды u-PA и противовоспалительное средство могут быть упакованы в виде отдельных композиций для введения вместе или последовательно или периодически.

Альтернативно, они могут быть представлены в виде одной композиции для введения или в виде двух композиций для введения в виде одной композиции. Комбинации могут быть упакованы в виде наборов, возможно с дополнительными реагентами, инструкциями для использования, флаконами и другими контейнерами, шприцами и другими предметами для использования модифицированных полипептидов u-PA.

I. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1

Клонирование и экспрессия модифицированных полипептидов u-PA и скрининг на модифицированные полипептиды u-PA, которые расщепляют C3 на сайте QHAR/AS

A. Клонирование u-PA

Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислоты 179-431 с мутацией C122S по нумерации химотрипсина (представленной в SEQIDNO: 5) полипептида u-PA человека (UniprotP00749; изложенная в SEQIDNO: 1) была клонирована в вектор экспрессии pE-SUMO-AMP C-конца с небольшим убиквитин-подобным модификатором (SUMO) меткой. Конструкция включает сигнальный пептид (аминокислоты 1-20) и домен протеазы (аминокислоты 179-431).

B. Получение модифицированных полипептидовu-PA

Модифицированные полипептиды u-PA получали с помощью сайт-направленного мутагенеза Quikchange (Stratagene) в соответствии с инструкциями производителя с конкретно сконструированными олигонуклеотидами, которые служат в качестве праймеров для включения сконструированных мутаций в вновь синтезированную ДНК. Проводят ПЦР-реакцию, содержащую ДНК дикого типа u-PA в качестве матрицы и олигонуклеотидныепраймеры, предназначенные для содержания желаемой мутации (мутаций).

После ПЦР каждый продукт реакции расщепляли с помощью DpnI для удаления метилированных родительских цепей ДНК. Затем ДНК трансформировали в E. coliXL -1 Bluесуперкомпетентные клетки (Stratagene) и высевали на селективный агар, содержащий 50 мкг/мл карбенициллина. Плазмидную ДНК выделяли из отобранных клонов и секвенировали для проверки включения предполагаемой мутации (мутаций) в выбранном местоположении (ях) в ДНК, кодирующей u-PA, и отсутствия каких-либо дополнительных, нежелательных мутаций.

C. Получение полипептидов u-PA

1. Трансформация

ДНК, кодирующую дикий тип и каждый из вариантных полипептидов u-PA, клонировали в вектор экспрессии pE-SUMO-AMP C-конец с небольшим убиквитин-подобным модификатором (SUMO) меткой и продоменом, как подробно описано в разделе A выше, и полученные конструкции трансформировали в клетки BL21 Gold (DE3) E.coli (AgilentTechnologies, номер каталога: 230132).

Приблизительно 50 мкл химически компетентных клеток BL21 Gold (DE3) трансформировали с 0. 5 мкл соответствующей плазмидной ДНК (обычно содержащей 1 пг-50 нг общей ДНК). Клетки и ДНК инкубировали на льду в течение 30 мин, затем клетки подвергали тепловому шоку при 42° C в течение 45 с и затем инкубировали на льду в течение 2 мин. В смесь добавляли 450 мкл среды с комнатной температуройTerrificBroth (TB) (VWRInternational, номер каталога 100219-866), и клетки инкубировали в среде TB в течение 1 часа со встряхиванием при 240 об/мин при 37° C. 20 Мкл этой трансформирующей смеси подавали в среду 2xYT + 100 мкг/мл карбенициллина из Teknova (Cat #: Y4420) и инкубировали в течение ночи при 37° C.

2. Экспрессия полипептидов u-PA

Клетки, содержащие ДНК, кодирующую требуемый полипептид u-PA (как правило, полученный из одной, подтвержденной колонии от описанного выше процесса трансформации) выращивали в приблизительно 50 мл среды, приготовленной путем объединения 50 мклкарбенициллина, 0,3 мл 20%-ного раствора лактозы, 5 мл фосфатного буфера и 45 мл среды базового TerrificBroth (TB) (Teknova, номер каталога L0350). Клетки и ростовую среду вращают со скоростью 400 об/мин в шейкере InforsMultiptron при 37° C.Через 18-22 ч роста

бактерии осаждали центрифугированием при 7000 об/мин в центрифужной пробирке объемом 50 мл в BeckmanSorvalRC6 Plus с центрифугой FiberliteF13-14 x50cs (Thermo-Fisher) в течение 10 минут при 4° С. После центрифугирования надосадочную жидкость декантируют.

Клеточный осадок из 50 мл культуры ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса клеток А (50 мМТрис, pH 8,0, 50 мМNaCl, 2 мМ ЭДТА, 0,1 мг/мл лизоцима). Клеточный осадок ресуспендировали в буфере А путем встряхивания при 240 об/мин в течение 1 ч при 37°С, полученную смесь подвергают центрифугированию при 7000 об/мин в течение 15 минут, и надосадочную жидкость декантируют.

Полученные гранулы ресуспендировали в 10 мл реагента для экстракции BugBuster ® (MerckMillipore, NC9591474), содержащего 20 мклБензоназы ™ (MilliporeSigma). Клетки ресуспендировали путем встряхивания при 240 об/мин в течение 1 ч при 37°С После встряхивания оставшийся нерастворимый материал осаждают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 15 мин при 4°С, и надосадочную жидкость декантируют.

Полученный осадок ресуспендировали путем гомогенизации в 10 мл промывочного буфера А [50 мМТрис (pH 8. 0), 300 мМ NaCl и 1% Triton X - 100] с использованиемгомогенизатора Power Gen 500 (Fisher Scientific, 14-261-04 P). Эту смесь, содержащую ресуспендированные полипептидные тела включения u-PA (IB), центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут при 4° С, и супернатант отбрасывали.

Новые гранулы ресуспендировали в 10 мл промывочного буфера В (50 мМТрис (pH 8,0)) и повторно гомогенизировали до тех пор, пока осадок не был хорошо диспергирован.Полученную смесь снова центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин при 4°С, надосадочную жидкость декантируют, и осадок оставляют на воздухе в течение 10-15 минут. Этот осадок тел включения полипептида u-PA (IB) может храниться при -20° С или использоваться непосредственно для развертывания и повторного складывания, описанного ниже.

3. Развертывание uPA

Нерастворившиеся тела включения полипептида SUMO-u-PA растворяют и денатурируют в 5 мл буфера разворачивания [6M GuHCl, 50 мMTrispH 8, (Teknova, Catalognumber: G0380)]. Добавляют свежеприготовленный DTT до конечной концентрации 10 мМ на день операции рефолдинга. Этот раствор ИБ перемешивают при 240 об/мин при 37°C в течение не менее 1 часа (обычно 2 часа) или до полного растворения тел включения. Полностью растворенный раствор ИБ является прозрачным, но может проявлять коричневатый оттенок.

4. Складывание u-PA

5 мл раствора развернутого полипептида u-PA разделяют на две аликвоты 2,5 мл, а каждую аликвоту добавляют к 200 мл рефолдирующего буфера [1,5 М Аргинин, 50 мМТрис pH 8,0, 150 мMNaCl, 5 мMGSH (L-Глутатион Окисленный , Sigma-Aldrich) и 4,0 мMGSSG (L-Глутатион Окисленный, Sigma-Aldrich)]. Этот раствор, содержащий полипептиды u-PA в рефолдирующем буфере, инкубировали на шейкере при 150 об/мин в течение 24 часов при комнатной температуре для обеспечения возможности складывания. Полученный в результате белковый раствор переносили в 12000-14000 Дальтон (MWCO) Spectra/Por ® регенерированную целлюлозную диализную трубку (VWR), которая составляла приблизительно 35 см в длину, и диализовали в 25 мMBis-Tris, pH 6.1. Образцы диализовали, по меньшей мере, в течение ночи, и, более типично, в течение нескольких дней.

Образцы диализовали только в течение суток, инкубировали при комнатной температуре, и образцы диализовали в течение более одного дня, инкубировали при 4° СОптимальное отношение общего объема диализирующего буфера к общему объему образца составляло по меньшей мере 100. Более низкие соотношения обычно продуцируют нижние выходы правильно сложенного

полипептида u-PA. После диализа образцы протеаз удаляли из диализной трубки и фильтровали с использованием 500 мл 0,22 мкм колбы (Millipore).

4. Очистка на колонне зимогена

Затем раствор белка очищают с использованием системы SulfopropylSepharoseFastFlow (SPFF). Колонку готовили добавлением 6 мл суспензии SPFFSuperflow(GELifesciences) (с приблизительно 3 мл смолы) в каждую колонку EconoColumn(BioRad), и раствор для хранения оставляли сливаться из смолы.10 мл 25 мMBis-TrispH 6,1, 1 M NaCl затем добавляли в колонну, содержащую смолу, и раствор оставляли протекать через колонну. Затем 10 мл 25 мMBis-TrispH 6. добавляют в колонну, содержащую смолу, и раствор пропускали через нее. Дно колонны закрывают и хранят с добавлением 10 мл 25 мMBis-TrispH 6,1 буфера для уравновешивания смолы.

Повторно сложенный и диализованный раствор полипептида u-PA наносили на уравновешенную колонку SPF с последующим добавлением 10 мл 25 мMBis-Tris pH 6,1, 50 мMNaCl. Затем неактивированный полипептид u-PA зимоген элюировали 4 мл 25 мMTrispH 7,5, 500 мMNaCl, который собирали в 50 мл пробирки Falcon. Затем образец разбавляют 25 мMTris pH 7,5 до общего объема 12 мл.

5. Активация u-PAзимогена

Образец 12 мл, содержащий очищенный полипептид u-PA зимоген, разводили добавлением 12 мл буфера активации (25 мMTris pH 7,5, 20 мMбензамидин). Затем полипептид u-PA зимоген превращают в соответствующую активную u-PA протеазу с убиквитин-подобной специфической протеазой SUMO -1 (ULP -1) из Saccharomycescerevisiae. При этом активирование бета-PA полипептида зимогена осуществляют путем добавления 120 мкг ULP -1 к очищенному зимогену, кратковременного

завихрения раствора и инкубации образца в течение ночи при комнатной температуре.

6. Очистка активированных полипептидов u-PA

Активные полипептиды u-PA очищают с помощью ионообменной хроматографии. Перед хроматографией образец фильтруют с помощью 50 мл фильтровального блока. Центрифужную колонку VivapureQ предварительно кондиционировали 5 мл 25 мМTris pH 7,5, 1M NaCl и 10 мл 25 мМТрис pH 7,5 с последующим центрифугированием при 500 g в центрифуге SorvallLegendRT в течение 5 минут.

Каждый образец, содержащий активированный полипептид u-PA, загружали на индивидуальную Q-спин колонку в 19 мл партий и центрифугировали при 500 g в течение 5 минут для каждой серии. Собирают проточную, содержащую активированную u-PA без SUMO метки и зимогена. Доводят pH полученного образца u-PA добавлением 12 мл 25 мМ лимонной кислоты, pH 5,0 и 60 мкл 1 М лимонной кислоты. Полученный белковый раствор затем наносили на предварительно кондиционированную спин-колонку VapvureS.Эту колонку предварительно кондиционировали 5 мл 25 мМTris pH 7,5, 1M NaCl и 10 мл 25 мМТрис pH 7,5 с последующим центрифугированием колонки при 500 g в течение 5 мин.

Образцы загружают на S-колонку (HiTrapSPHP; GEHealthcare) в 19 млпартии и колонку центрифугируют при 500 g в течение 5 мин. Поток, проходящий от этого процесса, выбрасывали. Затем колонку промывают 10 мл 25 мМ цитрата натрия, pH 5,0, 20 мМNaCl. После промывки колонки накопительную трубку заменяют новой трубкой, содержащей 7 мл буфера для разведения 50 мМ цитрата натрия, pH 5,0. Затем проводят элюирование полипептида U-PA из колонки 7 мл 25 мМ натрия фосфата с pH 7,0, 250 мМNaCl. Элюат, содержащий полипептид u-PA, затем концентрируют и подвергают буферному обмену в цитратно-солевом буферном растворе (CBS; 20 мМ цитрата натрия pH 5,0, 50

мMNaCl) с использованием блока центробежного фильтра AmiconUltra -15 для достижения конечной концентрации≥60 μM ($A_{280}$of ≥2.6).

Оптическую плотность растворов измеряют с помощью устройства Nanodrop. Качество препарата первоначально оценивали с помощью SDS-PAGE.Два мкг образца полипептида u-PA в буфере 1XSampleBuffer, содержащемBond-BreakerTCEP, загружали на каждую лунку в 12-луночный 4-12% PAGENovexBis-Tris гель и запускали в 1XMES проточный буфер при 200 В в течение 40 мин. Белки были визуализированы путем окрашивания геля ComassieBlue с последующим деокрашиванием. Фракции, содержащие единичные полосы, мигрирующие приблизительно на 25 кДа, замораживали в жидком азоте и хранили при -80° C до использования.Качество отдельных образцов полипептида u-PA дополнительно оценивали с помощью анализов активности и масс-спектроскопии.

D. Выбор и идентификация модифицированных полипептидов u-PA, которые расщепляют C3, чтобы инактивировать его

Модифицированные полипептиды u-PA идентифицировали путем скрининга библиотеки модифицированных полипептидов u-PA на модифицированный серпин (PAI -1), как описано, например, подробно в патенте США № 8, 211,428 (см. также опубликованную заявку на патент США № US-2014-0242062-A1). Для скрининга используют ингибирующий серпин или его фрагмент, способный образовывать ковалентное ацильное ферментное промежуточное соединение между серпином и протеазой.

Как правило, в качестве серпина используют тот, который invivo обычно нацелен на протеазу.В анализе серпин, модифицированный заменой его петли (RSL) для включения целевой последовательности (те активного участка в C3), захватывает модифицированные протеазы, которые расщепляют целевой участок с образованием стабильных комплексов. Затем выделяют/идентифицируют захваченную модифицированную протеазу. СерпинPAI -1 модифицировали путем замены остатков, указанных ниже, с

QHARASHLG (остатки 737-745 из C3,SEQIDNO: 47), которая является активным участком C3 человека.

Все модифицированные U-PA полипептиды подбирают таким образом, чтобы они расщепляли в пределах активного участка C3. В частности, они расщепляют между R и A

QHAR ↓ ASHL

ATIII (ниже) с введенной последовательностью QHARASHLG (соответствующий инактивирующему сайту расщепления в C3 (остатки 737-745 SEQIDNO: 47)):

10 20 30 40 50 60
CHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTG
GETQQQIQA

70 80 90 100 110 120
AMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMP
HFFRLFRST

130 140 150 160 170 180
VKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISHLLGTGAVDQLTRLVLVNALYFN
GQWKTPFP

190 200 210 220 230 240
DSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDT
LSMFIAAP

250 260 270 280 290 300
YEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGNMTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENL
GMTDMFR

310 320 330 340 350 360
QFQADFTSLSDQEPLHVALALQKVKIEVNESGTVASSSTLRRQHARASHLEIII
DRPFLF

370
VVRHNPTGTVLFMGQVMEP

Мутации выше модифицированного PAI-1следующие:

RCL	LRRQHARASHL	341	350
Мутация	V1C	1	1
Мутация	N150H	150	150
Мутация	K154T	154	154
Мутация	Q319L	319	319
Мутация	A340L	340	340
Мутация	V341R	341	341
Мутация	I342R	342	342
Мутация	V343Q	343	343
Мутация	S344H	344	344
Мутация	M347A	347	347
Мутация	A348S	348	348
Мутация	P349H	349	349
Мутация	E350L	350	350
Мутация	M354I	354	354

Таблица 14, в примере 2 ниже, устанавливает мутации, и обеспечивает SEQID для примерных доменов протеаз модифицированных полипептидов u-PA, которые содержат мутации. Нумерация представляет собой нумерацию химотрипсина. Модифицированные полипептиды u-PA были сгенерированы и выбраны для инактивации C3, с указанными мутациями. Следует понимать, что мутации могут быть включены в прекурсор, полноразмерные и зрелые модифицированные полипептиды u-PA.Замена C122S или другая консервативная замена для S включена для уменьшения агрегации; в то же время является необязательной. Для модифицированной u-PA для применения для генной терапии или для ПЭГилирования замена C122S не включена в модифицированную u-PA или в кодирующую нуклеиновую кислоту. C122 может служить в качестве сайта для конъюгата фрагмента ПЭГилирования или другой модификации. При экспрессии invivo агрегация обычно не является проблемой.Кроме того, активная форма представляет собой двухцепочечную форму, связанную дисульфидной связью, свободный Cys в остатке 122 обычно

не модифицирован до Ser так, что он доступен для образования дисульфидной связи.

Пример 2

Расщепление белка комплемента C3*invitro*

Активность модифицированных полипептидов u-PA для инактивационного расщепления C3 определяли путем измерения количества интактного человеческого C3, оставшегося после инкубации субстратного белка C3 комплемента человека с различными концентрациями каждой модифицированной протеазы в течение 1 часа при 37° C. В соответствии с данным анализом, сигнал генерируется в присутствии интактного человеческого C3 и теряется при расщеплении C3.

2 мкМ плазменного очищенного C3 (ComplementTechnologies; Tyler, TX) инкубировали с модифицированными полипептидами u-PA (0-250 нМ) в течение 1 часа при 37° C в буфере, содержащем 50 мМTris, pH 8,0, 50 мМNaCl, и 0,01% Tween -20. Активность модифицированных полипептидов u-PA гасилась добавлением EGR-CMK (HaematologicTechnologies, EGRCK -01) до конечной концентрации 10 мкМ, а смесь hC3/модифицированный u-PA полипептид была выдержана в течение 30 минут при температуре окружающей среды.

Остаточные уровни нерасщепленного C3 человека количественно оценивали с использованием усиленного люминесцентного бесконтактного анализа (торговая марка AlphaScreen ®; PerkinElmer). Покрытые IgG-акцепторные гранулы, при 100 мкг/мл (PerkinElmer # 6760606) инкубировали с 5 нММышиного альфа-hC3a (Abcam # ab11872-50) в 50 мМTris, pH 8,0, 50 мМNaCl, 0,01% Tween -20 и 0,2% BSA с образованием акцепторной смеси.

Акцепторную смесь экранируют от света и помещают на вращающийся встряхиватель в течение 30-60 минут. Реакционные смеси hC3/модифицированного полипептида u-PA (полученные выше) разводили в 1600 раз в 50 мМTris, pH 8,0, 50 мМNaCl, 0,01% Tween -20, 0,2% BSA и 4

мклаликвоты были помещены в дублированные лунки 384-луночного планшета (PerkinElmer # 6007299). 8мкл смесимАт/акцептормAb ^-hC3 инкубировалис 8 мкл 25 нМбиотинилированногокозьегоальфа-hC3 pAb (полученногосиспользованиемнабораEZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin от Thermo Scientific #21327 изнебиотинилированноговариантасогласноComplement Technologies #A213).

Затем пластину экранируют от света и инкубируют в течение 30 минут при температуре окружающей среды.После этого в каждую лунку добавляли 4 мкл 100 мкг/мл покрытых стрептавидином донорных гранул (PerkinElmer # 6760606) и инкубировали в течение 60 минут, с экранированием от света. Затем измеряли сигнал (возбуждение = 680 нм, эмиссия = 570 нм) с использованием считывателя планшетов с мультиметкойEnvision 2104 (PerkinElmer).Этот сигнал (соответствующий концентрации остальных hC3 ([hC3]) был построен как функция концентрации Alterase ® ([Alterase]), и данные были подставлены в уравнение четырех параметров ниже для определения концентрации модифицированного полипептида u-PA (концентрация Alterase ®), необходимая для расщепления на 50% доступного hC3 (EC50), наклона Хилла, а также максимального (Max) и минимального (Min) сигнала в анализе.

$$[hC3] = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{[Alterase]}{EC_{50}}\right)^{Hill}}$$

Расщепление hC3 повариантy u-PA, содержащемумутации R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/ Y149R (см. SEQIDNO: 21) измеряли независимо в сумме 13 раз, используя 9 различных партий протеазы. Среднее значение EC50 для данного модифицированного полипептида u-PA определили как 19 нМ (n = 13, SD = 2,2); в эксперименте, для которого результаты представлены в таблице 14 ниже, она составляла 24,5 нМ.

Около 600 модифицированных полипептидов u-PA содержали домен протеазы, с мутациями, изложенными в Таблице 14. Результаты приведены в таблице 14

ниже. Большинство тестируемых модифицированных полипептидов u-PA расщепляли белок C3 комплемента человека значительно более эффективно (те ниже ED50), чем домен протеазы u-PA дикого типа, содержащий замену C122S; многие с ED50 ниже 100 нМ.Полипептиды включают замену C122S для предотвращения агрегации при экспрессии, например, домена протеазы. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид u-PAимеет полную длину, и активирован для образования двухцепочечного активированного полипептида.

Для таких вариантов осуществления модифицированный домен протеазы u-PA не включает C122S-замены (279 по зрелой нумерации); цистеин образует дисульфидную связь (между 148C и 279C по зрелой нумерации, со ссылкой на SEQIDNO: 3).

Среди тестируемых вариантов u-PA те, которые были менее мощными, чем у дикого типа u-PA, в частности, те варианты, для которых не наблюдается расщепление (те, указанное как NA в таблице 14 ниже) hC3 наблюдали в течение одного часа анализа. Другие варианты с низкой активностью расщепляются менее чем на 25% hC3 во время анализа и, следовательно, не были назначены ED50. На основе этих результатов специалист может выбрать мутации, которые увеличивают активность расщепления C3.

ТАБЛИЦА 14

SEQ ID NO*	**Последовательность мутации**	**ED50 (нМ)**
749	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	0.92
678	R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L	2.38
277	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97b	2.47

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	A/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K	
280	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179R	2.49
278	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.04
614	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	3.47
279	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.48
276	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	3.51
281	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S	3.87
291	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	4.38
690	F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192Y	4.47
272	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.68
287	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	4.75
751	R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	4.76
676	R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157R	4.78
668	F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	4.92
977	V38E/T39W/V41R/D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S	4.94

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
682	R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H	5.01
792	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.14
225	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	5.21
750	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H	5.26
10	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	5.33
675	R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157S	5.52
802	R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	5.57
288	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K	5.82
744	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S	6.17
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	6.24
753	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	6.24
669	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	6.35
286	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	6.38
981	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	7.23

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
656	R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.33
705	R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	7.4
824	V38D/V41Q/D60aH/Y60bS/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	7.48
731	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	7.52
677	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R	7.55
679	F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S	7.59
613	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	7.64
707	F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q169K	7.64
688	R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H	8.04
752	R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	8.07
19	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.13
290	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.23
616	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.3
670	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
285	F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.44
283	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8.6
284	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	8.78
683	F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N	8.86
727	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	8.9
799	R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	8.95
949	R37aS/V38E/Y40V/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217V	9.04
831	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E	9.09
33	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	9.27
624	F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	9.54
223	I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	9.65
617	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	10.2
703	R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.3
706	N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R110dS/P114S/C122S/Y149R/M157K	10.3
732	F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.3

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
796	R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.4
14	F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	10.6
29	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.6
979	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K	10.6
24	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	10.7
633	F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8
12	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10.8
708	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/T242A	11.1
557	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	11.3
724	F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.3
882	V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E	11.4
335	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	11.5
746	R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T	11.6
615	F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	11.7
684	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K/Q192T	11.8

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
701	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/D60aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	11.8
260	I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	11.9
218	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	12
978	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	12.1
680	F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157T/Q192H	12.4
980	R35H/G37bD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	12.4
794	R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	12.6
611	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12.7
926	V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217E	12.8
224	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	12.9
689	F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13
650	R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.1
685	R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T	13.3
628	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	13.5
717	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L	13.6

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K	
275	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K	13.7
658	F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	14.1
373	R35V/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.4
800	R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.5
957	V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T	14.5
983	R35H/V38E/T39Y/V41R/T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S	14.6
513	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	14.7
300	R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	14.7
745	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A	14.8
821	V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R	14.8
674	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	15.1
823	V38D/V41L/Y60bP/T97aM/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R	15.3
627	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	15.4
13	F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	15.7

SEQ ID NO*	**Последовательность мутации**	**ED50 (нМ)**
681	F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T	15.9
382	V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	16
959	V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99L/C122S/Y151Q/R217E	16
950	V38E/Y40L/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217S	16.1
956	V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217T	16.4
973	V38E/T39Y/V41R/D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S	16.4
20	R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	16.6
597	F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	16.8
664	F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	16.8
733	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	17.4
469	R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217D	17.5
830	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A	17.7
653	F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17.8
264	F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	17.9
604	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	18
714	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	18.1
743	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18.1

SEQ ID NO*	**Последовательность мутации**	**ED50 (нМ)**
666	I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/V41R/Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.2
36	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	18.2
217	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A	18.3
263	F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	18.4
221	F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	18.6
289	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187R/K223R/K224R	18.9
687	R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192T	19
986	R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K	19.4
18	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19.5
222	I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	19.6
271	R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	19.9
982	R35H/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	19.9
538	F30Y/V38D/Y40F/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	20.2
953	V38E/Y40A/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T	20.4
665	I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	20.6
292	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	20.7

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
219	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	21.6
747	R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA /H99Q/C122S/Y151L/Q192T	21.7
514	F30H/R35L/H37D/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K /R217E	21.8
713	F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y 60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	21.8
619	F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L9 7bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	22.1
505	I17V/F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	22.2
623	F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L9 7bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.6
11	R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C1 22S/Y149R/M157K/Q192H	22.8
360	R35V/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22.8
729	F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y 60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	22.9
834	R35Q/V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L	22.9
961	R37aS/V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151Q/R217T	23.4
364	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23.5
486	F30H/V38D/V41R/A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	23.7
311	T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	23.7
265	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L 97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	23.8
34	Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	23.9
586	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/ M157K/Q192H/K243Q	24.1
346	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24.1

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
262	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	24.4
21	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24.5
832	R35Q/V38D/V41R/T97aS/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	24.8
369	V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	25.1
30	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25.3
621	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K	25.4
754	R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192S	25.5
835	R35S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L	25.7
836	R35S/V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	26.1
562	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S	26.3
738	R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.3
338	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	26.7
341	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	26.8
741	R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26.9
795	R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.1
798	R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27.1
671	R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C	27.3

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	122S/Y149R	
230	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	27.9
829	R37aS/V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	27.9
484	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.1
693	F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.1
694	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	28.3
261	F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	28.4
494	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K	28.5
797	R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28.7
984	R37aH/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A	28.8
515	F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	28.9
503	F30H/R36L/V38E/V41R/K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	29
370	V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V	29.1
736	R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.2
726	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.3
704	R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/V41R/D60aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.4
657	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	29.6
963	R36S/V38E/Y40L/V41N/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	29.6

SEQ ID NO*	**Последовательность мутации**	**ED50 (нМ)**
401	T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S	29.7
9	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	29.8
28	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29.8
940	R35S/R37aA/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149V	30.2
612	F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	30.3
715	F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	30.4
171	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K	30.6
511	F30H/R35H/H37I/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S	30.6
875	V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	30.7
702	R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30.9
402	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S	31.1
398	T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	31.4
881	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	31.5
924	R36S/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	31.5
936	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L	31.5
350	Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	31.6
496	F30Y/V38E/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M	31.9
231	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	31.9
516	F30H/R35Q/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	32

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
818	V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32
324	H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	32.1
948	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	32.2
368	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	32.2
351	Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	32.5
551	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	33.1
43	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	33.2
696	F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	33.4
495	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	33.5
972	V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S	33.5
242	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	33.6
884	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	33.7
801	R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	33.8
673	R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	34
958	R36S/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E	34.3
15	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34.5
340	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.5
339	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	34.8
282	F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187S/K223S/K224Y	34.9

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
39	Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	35.2
504	F30H/R35H/V38D/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K /R206H	35.4
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	35.7
273	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/ M157K	35.7
943	R35A/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	35.9
827	V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q	36.2
517	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L /Y151L/M157K/R217D	36.4
620	F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L9 7bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	36.7
399	T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S	36.8
608	F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aV/L9 7bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	36.9
934	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	37.2
387	Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T	37.2
645	R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149 R	37.4
869	V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	37.8
878	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	37.8
718	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y6 0bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.2
873	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	38.2
876	V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	38.4
550	F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K /T158A	38.5
728	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aA/Y	38.5

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	
712	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	38.6
404	T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	39.2
507	F30H/R36H/V38D/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	40
720	F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	40
268	V38E/Y40Q/V41L/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W	40.4
498	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	40.5
509	F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K	40.8
742	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	40.9
686	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157K/Q192H	41
710	F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.2
618	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	41.3
872	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S	41.6
822	V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R	42.1
403	T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	42.1
446	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	42.2
735	R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.3
543	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192	42.4

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	H	
475	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F	42.5
697	H37M/R37aD/V38E/T39A/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.7
171	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K	42.8
552	T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K	42.9
734	R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	42.9
561	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E	43.6
481	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S	43.8
648	R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	44.2
595	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	44.6
904	R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6
330	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	44.6
879	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	45
647	R35Q/H37N/V38D/T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S	45.4
663	F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	45.8
23	R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	46.1
975	V38E/T39L/V41R/D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	46.8
601	F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/	46.9

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	H99Q/C122S/Y149R/M157K	
722	F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K	47.7
748	H37T/R37aL/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R	47.9
325	H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	47.9
667	F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	48.6
868	V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	48.9
326	H37G/R37aD/G37bD/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	49
42	T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	49
874	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	49.1
584	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K	49.3
534	R35S/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157Y	49.8
925	R37aS/V38D/T39Y/Y40F/V41R/H99L/C122S/R217T	49.9
349	Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	49.9
390	Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	50
506	F30H/R35S/V38E/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	50.1
877	V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S	50.1
900	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	50.9
737	R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.1
22	H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/	51.1

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	C122S/Y149R	
598	F30Y/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	51.4
545	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157A/Q192Y	51.5
954	V38E/Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T	51.6
870	V38D/T39Y/Y40Q/V41L/T97aY/L97bA/H99Q/C122S	51.7
942	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	51.7
358	R35S/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	52.4
535	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T	52.9
356	R35K/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	53.2
692	F30Y/R35V/R36H/H37T/V38E/T39A/Y40L/V41Q/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	53.7
184	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217D	54
249	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	54.1
672	R36H/H37S/V38E/T39W/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.1
371	V38D/V41R/L97bR/C122S/Y151L/R217V	54.3
553	F30Y/R36S/V38D/T39I/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/S146P/M157K/T158S	54.6
365	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	54.6
37	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	54.9
347	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	54.9
709	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	55.3

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
487	F30H/G37bD/V38D/T39H/V41R/L97bA/H99Q/R110dH/C122S/Y151L/M157K/S240I	55.5
902	R35K/H37A/R37aE/V38H/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	55.9
603	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56
25	R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	56.2
436	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D	56.3
606	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	56.4
337	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E	56.4
587	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/K187R	57.7
232	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	58
44	T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	58.2
329	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	58.5
216	I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	58.6
519	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K/R217D	58.8
270	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K	59.3
348	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	59.3
793	R35N/H37S/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/	59.5

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	H99Q/C122S/Y149R	
226	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9
719	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aL/V38E/T39N/Y40F/V41R/D60aP/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	59.9
625	F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T/R239H	60.1
903	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39F/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	60.1
35	V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	60.2
176	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	60.3
381	H99Q/C122S/Y151L/R217V	60.4
841	R35S/V38D/Y40H/V41L/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	61.5
698	R35F/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	63.4
935	R35V/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	63.5
951	R36L/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217S	63.7
600	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	63.9
607	F30Y/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aA/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	64.2
947	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	64.8
555	F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	65.1
357	R37aD/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	65.3
699	R35A/H37D/R37aN/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	65.8

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
198	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	66
267	V38E/Y40Q/V41Q/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W	66
711	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	66.2
849	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	66.2
518	F30H/R35Q/V38D/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K	66.3
313	V38D/T39L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	66.3
937	R37aP/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	67.2
591	F30Y/R36H/H37S/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	67.5
901	R35Q/H37G/R37aE/V38Y/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	67.6
955	V38E/Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	67.8
833	V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T	68.6
417	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	68.8
695	F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39I/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K	69.2
893	R35G/H37T/R37aE/V38T/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	69.7
932	R37aS/V38D/T39Y/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	70.1
233	F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.3
661	F30H/R35L/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	70.4
629	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L9	70.8

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	7bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192M	
807	V38E/T39L/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151L/Q192T	71.1
199	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	71.3
725	F30Y/R35F/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39H/Y40F/V41R/D60aP/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	71.3
565	F30H/R35Q/H37Y/V38D/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K	71.4
376	L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	72.3
960	R37aS/V38E/Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T	72.6
307	Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	73
466	R36H/G37cD/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157T/R217D	75
839	R35K/V38D/Y40H/V41R/Y60bS/L97bG/H99Q/C122S	75.6
299	R35Q/H37Y/R37aE/V38D/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	77.3
592	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	77.9
520	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	78.3
389	Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S	78.4
400	T39H/V41R/L97bG/H99Q/C122S	78.4
315	V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S	79
740	R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	80.1
716	F30Y/R35A/R36H/H37T/R37aD/V38E/T39Y/Y40L/V41R/D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	80.7
700	R35Q/H37D/R37aA/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/	80.7

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	H99Q/C122S/Y149R	
312	V38D/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	80.7
651	F30Y/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192N	80.9
871	R37aS/V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S	81.2
374	R35V/R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.4
359	R37aE/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.5
938	R35M/R37aQ/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	81.6
38	V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	82.9
243	F30Y/R36H/V38E/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K	83.5
500	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/T147S/M157K	84.7
564	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H/R239H	85.7
721	F30Y/R36H/H37M/R37aD/V38E/T39G/Y40F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	85.9
523	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	87.3
544	F30Y/V38D/Y40L/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192Y	88.1
228	F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	88.8
826	V38D/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	90
985	R37aH/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	90.7
547	F30H/V38D/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	91.3
886	V38D/T39Y/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	91.8

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
944	R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	91.9
32	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	92.3
542	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	93.2
946	R35A/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	93.4
939	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	93.5
508	F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151L/M157K/R217D	93.6
541	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	94.2
377	V38D/H99Q/C122S/Y151L/R217V	94.4
576	F30Y/R35T/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/M157K	94.7
227	I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	94.8
855	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	94.9
372	R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	95
594	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	96.3
820	V38D/V41Q/D60aP/Y60bS/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	96.4
510	F30H/R35Q/H37Q/V38D/V41R/A96D/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D	96.8
240	F30Y/R35Q/H37Y/V38D/Y40H/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/	98.7

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	Y149R/M157K	
891	H37A/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	99.6
605	F30Y/R36H/V38E/T39V/Y40H/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/M157K	99.7
485	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S	99.9
622	F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T	100
585	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/Y60bN/N87D/A96T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/N145S/M157K/M207K	101
309	V38E/Y40Q/V41L/L97bA/C122S	101
952	R37aS/V38E/V41R/L97bG/H99Q/C122S/R217V	101
445	R36H/V38D/Y40L/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192T/R217D	102
649	F30Y/R35Q/R36H/H37G/V38E/T39H/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192M	102
363	R35V/R37aE/Y40Q/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	103
314	V38D/T39L/Y40L/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	104
183	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/R217E	105
655	F30L/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/V41K/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	105
921	R36S/V38D/T39A/Y40F/V41R/L97bA/H99E/C122S/R217T	105
568	F30Y/R35K/H37E/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/M157K	106
691	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	106
739	R35Q/H37T/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	106

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
448	R36H/V38D/Y40I/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192A/R217D	107
540	F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T210S	107
397	T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/C122S	108
208	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	109
211	F30Y/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K	109
546	F30Y/R36S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	109
850	V38D/V41R/D60aP/Y60bD/T97aW/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192A/R217E/K224R	109
842	V38D/V41R/Y60bN/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	109
883	R35H/V38D/V41Q/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	109
967	R35H/V38E/L97bR/C122S/Y151L/R217V	109
447	R36H/V38D/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192G/R217D	110
254	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	111
385	R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S/R217V	111
887	R35Q/H37G/R37aN/V38F/T39H/V41Q/Y60bR/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	112
164	R36S/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157K/R217D	113
210	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	113
838	R35S/V38D/Y40Q/V41R/Y60bS/L97bG/H99Q/C122S	113
898	H37S/R37aD/V38H/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	113
196	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	114

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
310	Y40Q/L97bA/H99Q/C122S	114
355	R37aE/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	114
945	R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149K	115
643	R35Q/H37M/V38D/T39V/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	116
644	R35L/H37E/V38D/T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	116
450	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192D/R217D	118
497	F30Y/Y34N/V38D/Y40H/V41R/Y94F/S95R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T242I	118
323	R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	118
334	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/Q192T/R217E/K224R	118
392	Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S	118
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	119
434	R37aH/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192G/R217D	119
419	R36H/V38D/V41M/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	120
317	V38D/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	120
201	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K	121
549	F30Y/R37aH/V38D/Y40H/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/M157K	121
767	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/K224S	121
888	H37N/R37aD/V38Y/T39F/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	121
452	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122	122

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	S/Y151L/Q192R/R217D	
560	F30Y/R37aS/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	122
837	V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/Q192S/R217A	122
361	R37aD/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	122
880	R35S/V38D/V41T/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E	124
40	Y40Q/V41L/L97bA/C122S	124
173	F30H/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y151L/M157K	125
229	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	125
322	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L	125
895	H37A/R37aE/V38Y/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aV/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	126
892	H37N/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	127
652	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39L/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	129
451	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192T/R217D	130
854	V38D/V41R/Y60bR/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	130
308	V38E/Y40Q/L97bA/H99Q/C122S	133
968	V38E/T56I/H99Q/C122S/Y151L/S190G/R217V	134
556	F30Y/S37dP/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	135
964	R35S/V38E/L97bR/C122S/Y151L/R217V/H241N	135
396	T39Y/V41R/L97bA/C122S	135
384	L97bR/C122S/Y151L/R217V	136
599	F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39L/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	137
596	F30Y/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bD/T97aD/L97bA/	137

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	H99Q/C122S/Y149R/M157K	
894	R35K/H37S/R37aE/V38F/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	141
269	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99L/C122S/Y149K/M157K	142
840	R35Q/V38D/Y40L/V41L/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	142
471	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157E	146
429	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192D/R217D	146
501	F30Y/R36S/V38H/Y40L/V41R/N76K/L97bA/H99Q/C122S/M157K	146
195	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	147
539	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192H	149
927	R37aP/V38D/T39L/Y40I/V41R/H99L/C122S/R217Q	150
293	V38E/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	152
375	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	153
214	V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	154
189	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K/R217E	155
31	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R	155
393	V41R/L97bG/H99Q/C122S	155
890	R35K/H37G/R37aE/G37bS/V38F/T39H/V41Q/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	156
571	F30Y/R35S/H37G/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	158
602	F30Y/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bM/T97aD/L97bA/	159

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	H99Q/C122S/Y149R/M157K	
203	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	160
843	V38D/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192H/R217E/K224R	160
897	H37A/R37aD/V38Y/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aD/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	160
896	H37D/R37aD/V38Y/T39Y/V41Q/Y60bR/T97aL/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	162
353	Y40Q/V41L/L97bA/C122S/Y149R	162
488	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151L/M157K/R239H	163
930	R36S/V38D/T39S/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T	163
906	V38D/T39V/V41R/L97bV/H99E/C122S/R217E	165
962	R37aS/V38E/Y40Q/V41L/L97bG/C122S/Y151P/R217T	166
484	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	167
378	V38D/L97bR/C122S/Y151L/R217V	170
593	F30Y/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	171
825	V38D/V41K/D60aN/Y60bN/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192H/R217E/K224R	172
889	H37A/R37aE/V38F/T39L/V41Q/Y60bR/T97aF/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	174
345	Y40Q/V41L/H99Q/C122S	174
574	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217E	175
730	F30Y/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	176
941	R35K/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149	178

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	R	
209	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	179
321	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/C122S	179
245	N26D/F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K	185
367	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/C122S/Y149R	185
483	F30Y/V38D/Y40M/V41R/L97bA/H99Q/C122S	188
768	V38D/L97bV/H99E/C122S/K224S	192
861	V38D/V41R/D60aQ/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	192
202	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	194
931	R37aS/V38D/T39G/V41R/L97bM/H99E/C122S/R217S	194
521	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/M157K	196
473	F30Y/V38D/Y40H/V41A/L97bA/H99Q/C122S/M157R	197
191	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217E	199
206	F30Y/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	199
327	H37G/R37aD/G37bD/V38F/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	199
41	R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	199
244	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	201
248	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/Y149R/M157K	201
864	R35K/V38D/Y40H/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	201
525	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/E153D/M157	202

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	K	
526	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/D148N/M157K/T188S	202
660	R35E/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192T	202
558	F30Y/R37aS/V38D/Y40H/V41R/E86D/L97bA/H99Q/C122S/M157K/F234Y	203
723	F30Y/R35Q/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	203
563	F30Y/R37aS/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187Q/T208S	205
465	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/Q192R/R217F	208
170	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/R217D	208
583	F30Y/R35T/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aT/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	208
609	F30Y/R35L/H37D/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bT/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	212
352	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/C122S	212
920	R36S/V38D/T39K/Y40F/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217S	213
320	V38D/T39L/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	215
169	V38D/V41R/A96E/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/T178S/Q192E/R217D	217
588	F30Y/R37aP/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/E84D/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T242I	219
190	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K/R217D	222
566	F30Y/R35T/H37Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/	230

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	C122S/Y149R/M157K	
536	R37aL/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S	231
760	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R	234
478	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157R	235
238	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/ Y149T/M157K	235
234	F30Y/R35Q/H37D/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/ C122S/Y149S/M157K	236
207	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/ M157K	238
344	Y40Q/V41L/C122S	238
554	F30Y/Y34S/R37aH/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/ M157K	239
354	R37aE/Y40Q/V41L/L97bA/C122S/Y149R	245
247	N26D/F30Y/V38D/Y40L/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M 157K	247
476	F30Y/V38D/Y40H/V41N/L97bA/H99Q/C122S	250
524	F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bV/H99Q/R116S/C122S/ M157K/T210N	250
212	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K	252
388	Y40H/V41Q/L97bG/C122S/R217T	252
974	V38E/T39H/D60aP/Y60bK/L97bG/H99Q/C122S	252
205	F30Y/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K	255
167	V38D/Y40P/V41K/L97bA/H99Q/C122S	257
573	F30Y/R35T/H37A/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bE/L97bA/H99Q/ C122S/Y149K/M157K/R217Y	263
559	F30Y/R37aH/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/S174 P	267

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
569	F30Y/R35L/H37D/V38D/Y40H/V41R/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	267
578	F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	270
383	L97bR/H99Q/C122S/Y151L	271
572	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/M157K	275
200	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	276
250	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	277
567	F30Y/R35T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217K	277
477	F30S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K	279
819	V38D/V41Q/D60aK/Y60bD/T97aA/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192Y/R217E/K224R	279
186	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217E	280
976	V38E/T39H/D60aP/Y60bW/L97bG/H99Q/C122S	281
662	F30H/R35L/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41Q/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	284
316	V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/H99Q/C122S	284
757	V38D/L97bR/H99Q/C122S/E175D/R217E/K224R	292
923	R37aS/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bM/H99L/C122S/R217S	292
654	F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192Y	297
637	R35E/H37D/V38D/T39N/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	306
766	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/K224A	306
763	V38D/L97bV/H99L/C122S/E175D/K224S	310

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
813	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/K224A	310
912	R37aP/V38D/T39Y/V41R/L97bV/H99Q/C122S/R217T	316
175	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151M/M157K	321
502	F30H/V38D/V41R/L73Q/L97bA/H99Q/E110bD/C122S/Y149N/Y151L/M157K	321
582	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	324
817	V38D/L97bT/H99E/C122S/E175D/K224S	326
204	F30Y/H37T/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	330
522	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K	331
589	F30Y/R37aP/G37bD/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/M157K	331
237	F30Y/R35Q/V38Y/Y40H/V41R/D60aE/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/M157K/R217M	332
764	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217E	333
235	F30Y/R35Q/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K	338
773	V38D/L97bG/H99Q/C122S/R217Q	338
187	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217D	341
933	R35E/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	342
610	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aK/Y60bV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	344
581	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aP/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217K	345
865	R35Q/V38D/Y40M/V41R/Y60bA/L97bG/H99Q/C122S	345

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
252	F30Y/R36H/V38E/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	346
331	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	347
26	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	348
866	R35K/V38D/Y40F/V41R/Y60bT/L97bG/H99Q/C122S	348
579	F30Y/R35H/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aR/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	349
774	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T/Q192H	349
380	L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V	351
860	R35S/V38D/V41L/D60aP/Y60bW/L97bG/H99Q/C122S	353
391	Y40H/V41T/L97bG/C122S/R217T	357
301	V38E/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	364
815	V38D/L97bK/H99L/C122S/E175D/K224A	365
302	L97bG/H99Q/C122S/R217Q	367
646	R35G/H37G/V38D/T39W/V41A/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S	370
636	R35F/H37G/V38D/T39H/V41A/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	371
332	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	371
193	F30Y/H37D/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217E	378
862	R35Q/V38D/Y40H/V41L/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	380
828	V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/Q192S/R217A	385
965	R35S/V38E/H99Q/C122S/S146F/Y151L/V159L/K179N/Q192R/R217V/T242S	408
590	F30Y/R35L/R36H/H37P/V38E/Y40H/V41R/Y60bG/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	409

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
971	V38E/T39R/D60aP/Y60bD/L97bG/H99Q/C122S	412
846	R37aS/V38D/V41R/Y60bT/T97aD/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192A/R217E/K224R	413
318	V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/R217V	418
438	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192D/R217D	421
537	F30N/V38D/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R	428
899	H37G/R37aD/V38Y/T39H/V41Q/Y60bR/T97aD/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	433
659	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	434
844	V38D/V41R/D60aP/Y60bD/T97aP/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	437
460	F30Y/R36H/V38D/V41K/D97E/T97adel/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217D	445
274	L97bA/H99Q/C122S	449
966	F30Y/R37aH/V38E/H99Q/C122S/Y151L/R217V	449
246	N26D/F30Y/V38D/Y40H/V41R/I65T/L97bA/H99Q/C122S/M126I/M157K/Q192H	455
253	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192Y	463
970	V38E/T39S/V41L/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	464
319	V38D/Y40L/V41K/L97bR/H99L/C122S/E175D	466
236	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K/R217S	470
297	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E	470
343	V41L/L97bA/H99Q/C122S	471
366	R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/H99Q/C122S/Y149R	478

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
640	R35F/H37E/V38D/T39S/V41A/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S	487
333	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/E175D/Q192T/R217E/K224R	499
213	V38D/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A	503
256	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192Y	511
529	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157L/Q192H	515
492	F30Y/R37aH/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	516
239	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217S	530
814	V38D/L97bM/H99S/C122S/K224S	538
575	F30Y/R37aD/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M126K/M157K	539
394	V41Q/L97bG/H99Q/C122S	547
435	V38D/Y40P/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192L/R217D	557
258	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	569
908	R36S/V38D/T39H/Y40L/V41R/L97bV/H99V/C122S/R217Q	574
638	R35Q/H37Y/V38D/T39A/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192S	575
845	V38D/V41Q/Y60bP/T97aW/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E175D/Q192K/R217E/K224R	578
907	R37aH/V38D/T39M/Y40A/V41K/L97bR/H99Q/C122S/R217E	582
328	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R	594
811	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217E/K224R	610
848	R37aS/V38D/V41R/D60aS/Y60bP/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/E17	614

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	5D/Q192R/R217E/K224R	
570	F30Y/R35H/H37T/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bD/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K/R217K	622
295	V38E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	630
499	F30Y/R35H/V38D/T39S/Y40H/V41R/S75P/L97bA/H99Q/C122S/M157K/I163M/Q204H/K243E	632
528	F30Y/V38D/Y40M/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R/Q192M	641
395	V41T/L97bG/H99Q/C122S	646
463	R36H/V38D/V41M/A55S/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	647
928	V38D/T39V/Y40L/V41S/H99V/C122S/R217V	653
577	F30Y/R35H/H37D/V38D/Y40H/V41R/D60aK/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	659
759	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217E/K224S	661
769	V38D/L97bK/H99L/C122S/R217E	673
174	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K	688
867	R35Q/V38D/Y40F/V41T/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S	698
462	R36H/V38D/V41M/F59I/D97E/T97adel/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217D	702
969	F30Y/V38E/L97bR/C122S/Y151L/R217V	702
914	V38D/T39H/Y40F/V41K/L97bM/H99T/C122S/R217E	717
386	R37aS/V41R/L97bG/C122S/R217V	726
379	V38D/L97bR/H99Q/C122S/R217V	731
885	R37aS/V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/Q192T/R217V	738
27	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	743
362	R35V/R37aE/V38E/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149	765

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	R	
241	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	778
527	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K223N/P236S	781
255	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Q/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	802
490	F30Y/R37aH/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/R110dH/C122S/M157K/V160I	808
630	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39V/Y40H/V41W/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	819
771	V38D/L97bV/H99L/C122S/K224A	824
444	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192D/R217D	825
479	F30Y/R36H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151M/M157Y/Q192A	830
812	V38D/L97bT/H99L/C122S/E175D/R217K	851
294	V38E/T97aE/L97bA/H99Q/C122S	862
580	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/D60aE/Y60bK/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/R217I	917
816	V38D/L97bR/H99V/C122S/E175D/R217E/K224R	930
853	V38D/V41Q/Y60bP/T97aY/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192K/R217E/K224R	960
922	R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/L97bG/H99S/C122S	989
852	V38D/V41Q/D60aN/Y60bP/T97aN/L97bR/H99I/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	993
635	R35Q/H37D/V38D/T39H/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192T	998
548	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K	1000

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
259	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	1030
847	V38D/V41K/D60aE/Y60bP/T97aA/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	1040
851	V38D/V41Q/D60aN/Y60bP/L97bR/H99L/C122S/Y151L/E175D/Q192R/R217E/K224R	1040
336	H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/K224R	1040
639	R35Q/H37Y/V38D/T39F/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192G	1130
215	F30Y/R37aH/V38D/Y40Q/V41I/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157W/Q192Y	1140
631	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39A/Y40H/V41W/Y60bV/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	1170
859	R36H/V38D/T97aR/L97bG/H99Q/C122S/E175F	1180
177	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/Y151F/M157K	1190
305	V38D/L97bG/H99Q/C122S	1190
909	R36S/V38D/T39K/Y40F/V41R/L97bN/H99E/C122S/R217S	1230
251	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192H	1240
423	V38D/L97bA/H99Q/C122S	1310
916	V38D/T39L/Y40L/V41K/L97bH/H99L/C122S/R217A	1320
642	R35Q/H37G/V38D/T39W/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Q192G	1340
929	R37aS/V38D/T39V/V41E/L97bG/H99Q/C122S/R217T	1390
626	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39L/Y40H/V41W/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	1450
863	R37aS/V38D/V41R/D60aT/Y60bN/L97bG/H99Q/C122S	1450
805	V38E/T39W/V41T/D60aP/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149	1480

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	L/Y151G/Q192T	
770	V38D/L97bR/H99L/C122S/E175D/R217T/K224S	1570
808	V38D/L97bR/H99M/C122S/E175D/R217E	1570
424	R36S/V38D/L97bR/H99E/C122S/R217D/K224R	1580
432	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/T97adel/A98G/L97bdel/H99L/C122S/Y151F/Q192D/R217D	1600
809	V38D/L97bR/H99M/C122S/E175D/R217E/K224R	1660
634	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39V/Y40H/V41W/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A	1760
197	I17L/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	1790
632	F30Y/R35Y/R36H/H37P/V38E/T39R/Y40H/V41W/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/Q192F	1900
810	V38D/L97bR/C122S/E175D/R217E/K224R	1990
761	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217S/K224S	2040
532	F30H/V38D/Y40H/V41Q/L97bA/H99Q/C122S/Q192H	2110
482	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151R/M157R	2190
491	F30Y/A32E/Y34N/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	2210
422	A32S/V38D/H99E/C122S/K224A	2230
493	F30Y/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	2240
762	V38D/L97bR/H99V/C122S/E175D/R217E/K224N	2240
533	F30Q/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151H/M157R/Q192Y	2300
179	F30H/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y151F/M157K	2390
772	V38D/L97bR/H99V/C122S/E175D/R217E/K224S	2490
756	V38D/L97bR/H99E/C122S/Y172F/E175D/R217E	2720
154	V38D/T97adel/L97bdel/C122S	2950
180	F30H/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y149N/Y151F/M157K	3230
765	V38D/L97bG/H99Q/C122S/E175D/R217K/K224A	3310

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
5	C122S	3380
192	F30Y/R35Q/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217G	3860
461	R36H/V38D/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/V213A/R217D	4030
182	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/R217G	4210
489	F30Y/A32E/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4280
172	F30Y/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y151F/M157K	5890
178	F30Y/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/M157K	6030
181	F30Y/V38D/V41R/L97bV/H99Q/C122S/Y149N/Y151F/M157K	7110
530	F30H/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S/Q192L	7340
194	F30Y/H37D/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217G	7760
755	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217A/K224S	7770
758	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217A/K224Q	7770
775	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151K/M157R/Q192E	7770
776	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151K/M157S/Q192E	7770
777	F30Y/V38D/Y40H/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151K/Q192E	7770
778	F30M/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151G/Q192T	7770
779	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151M/M157R/Q192T	7770
780	F30H/V38D/Y40P/V41K/L97bA/H99Q/C122S/Y151H/M157E/Q192A	7770
296	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D	7770
804	V38E/T39W/V41T/D60aP/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151G/Q192T	7770
303	V38D/H99Q/C122S/R217Q	7770

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
304	V38D/L97bG/C122S/R217Q	7770
856	V38D/V41R/L97bT/C122S/Y151F/R217E	7770
858	V38D/V41R/L97bN/H99E/C122S/E175D/Q192M/R217E	7770
911	R36H/V38D/T39R/Y40F/V41R/H99S/C122S/R217T	7770
918	R36S/V38D/T39A/V41R/L97bV/H99S/C122S/R217T	7770
905	R36L/V38D/T39R/Y40L/V41T/L97bD/H99P/C122S/R217S	7770
913	R36S/V38D/T39K/Y40M/V41K/L97bI/C122S/R217E	7770
919	R37aH/V38D/T39R/Y40F/L97bT/C122S/R217E	7770
910	V38D/T39K/Y40F/V41Q/L97bI/H99S/C122S/R217T	7770
917	V38D/T39F/Y40L/V41K/L97bT/H99S/C122S/R217T	7770
480	F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157T/Q192L	9990
474	F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151R/M157K	9990
472	F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151F/M157K/Q192W	9990
185	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K/R217G	9990
188	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149F/M157K/R217G	9990
266	F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K/Q192P	9990
781	R37aH/V38E/T39S/D60aR/Y60bG/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/Y151S	9990
782	R37aH/V38E/T39A/V41R/D60aG/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149V/Y151F/Q192R	9990
783	R37aH/V38E/T39H/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/Y151N/Q192T	9990
784	R37aH/V38E/T39G/V41A/D60aG/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151K/Q192T	9990

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
785	V38E/T39D/V41A/D60aA/Y60bR/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151K/Q192T	9990
786	V38E/T39A/V41R/D60aH/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/Y151N/Q192T	9990
787	V38E/T39F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149A/Y151G/Q192T	9990
789	R37aH/V38E/V41A/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149A/Y151M/Q192T	9990
790	R37aH/V38E/T39S/V41A/D60aG/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149S/Y151H	9990
791	R37aP/V38E/T39G/V41R/Y60bR/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149T/Y151P/Q192T	9990
788	V38E/T39D/V41A/D60aS/Y60bR/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151K/Q192T	9990
298	V38D/L97bR/H99E/C122S/E175D/K224R	9990
806	V38E/T39W/V41Q/Y60bE/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151G/Q192T	9990
803	V38E/T39W/V41T/Y60bK/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149I/Y151G/Q192T	9990
857	V38D/V41K/L97bA/H99L/C122S/Y151R/R217E	9990
915	R36S/V38D/T39K/Y40M/V41K/L97bH/H99T/C122S/R217S	9990
641	R35D/H37R/V38D/T39V/V41T/Y60bT/L97bA/H99Q/C122S/Q192A	16600
5	C122S	NA
154	V38D/T97a_L97bdel/C122S	NA
155	L73R/L97bG/H99Q/C122S	NA
409	V38D/V41T/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175K/R217H	NA
407	V38D/V41S/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175K	NA
NA	V38D/V41S/D97E/A96_-	NA

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
	nulldelinsVG/A98_H99del/C122S/E175K/R217H	
408	V38D/V41A/A96_T97adelinsERG/A98_H99del/C122S/E175N	NA
NA	V38D/V41L/A96_A98del/-null_H100insRGL/C122S/Y172E/E175P	NA
406	V38D/V41S/A96D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175S	NA
NA	V38D/V41A/A96del/-nulldelinsRG/A98_H99del/C122S/E175N/R217delinsF	NA
405	V38D/V41S/A96_T97adelinsERG/A98_H99del/C122S/E175A	NA
156	V38D/L73R/L97bG/H99Q/C122S	NA
NA	V38D/A96_-nulldelinsVG/D97E/A98_H99del/C122S	NA
NA	V38D/V41Q/A96_-nulldelinsAG/D97E/A98_H99del/C122S/R217K/K224R	NA
NA	R35S/V38_Y40delinsDRF/D60adelinsY/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151L	NA
NA	R35T/V38_V41delinsDRF/V41M/D60aP/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151L	NA
NA	R35K/V38_-nulldelinsDQHR/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151W	NA
410	R35K/V38D/T39S/Y40F/V41M/D60aN/A96D/D97L/A98K/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L	NA
NA	R35K/V38D/T39S/Y40F/V41M/D60aN/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151L	NA
NA	R35S/V38E/T39S/Y40H/V41R/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151W	NA
NA	R35K/V38D/T39K/Y40F/A96del/-nulldelinsLK/A98_H99del/C122S/Y151delinsG	NA
411	V38D/V41R/A96E/D97G/T97adelinsSG/A98_H99del/C122S	NA
412	V38D/L97bG/H99P/C122S/R217V/K224Q	NA
412	V38D/L97bG/H99P/C122S/R217V/K224Q	NA

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
413	V38D/A96G/D97R/A98G/T97adel/H99I/L97bdel/C122S	NA
NA	V38D/A96_-nulldelinsRGI/A98G/C122S	NA
414	V38D/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/L97bM/C122S	NA
NA	V38D/V41R/A96del/-null_T97ainsG/-null_L97binsG/A98_H99del/C122S/R217A	NA
415	V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217F	NA
NA	V38D/V41R/-nulldelinsDG/D97N/T97aG/A98_H99del/C122S/R217delinsF	NA
NA	V38D/V41R/A96E/-null_L97binsG/D97E/A98_H99del/C122S/E175K/R217E/K224S	NA
416	V38D/V41Q/A96E/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217H	NA
416	V38D/V41Q/A96E/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217H	NA
NA	V38D/V41S/A96del/-nulldelinsRG/A98_H99del/C122S/R217delinsY	NA
NA	V38D/V41R/A96del/-nulldelinsGG/A98_H99del/C122S/R217D	NA
418	V38D/V41K/A96D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217K/K224N	NA
419	R36H/V38D/V41M/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217D	NA
419	R36H/V38D/V41M/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	NA
420	V38D/V41H/A96D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/R217delinsF	NA
421	V38D/D97E/T97aG/A98_H99del/C122S/E175G/R217H	NA
NA	V38D/A96P/D97_-nulldelinsVG/A98_H99del/C122S	NA
157	L97bP/H99L/C122S	NA
NA	-null_H99delinsRVG/L97bM/C122S	NA
NA	V41R/A96del/-null_T97ainsG/-null_L97binsG/A98_H99del/C122S	NA
NA	-null_H99delinsRG/D97G/L97bM/C122S/R217E/K224R	NA

SEQ ID NO*	Последовательность мутации	ED50 (нМ)
423	V38D/L97bA/H99Q/C122S	NA
425	V38D/V41Q/A96N/D97G/T97aI/A98G/L97bdel/H99L/C122S	NA
427	V38D/V41K/A96K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S	NA
426	R35S/V38D/V41T/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S	NA
428	R36H/V38D/V41S/A96E/D97R/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/K224R	NA
158	R37aP/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/M157K/R217F	NA
159	R37aS/G37bD/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S/R217F	NA
160	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/A98R/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157K/R217D	NA
161	R37aH/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/S174P/R217D	NA
162	R37aH/V38D/V41G/A96G/D97E/T97aA/A98G/L97bdel/H99M/C122S/Y151N	NA
163	R36S/V38D/Y40L/V41R/A96P/D97V/T97aR/A98G/L97bdel/H99L/C122S	NA
165	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192E/R217D	NA
166	F30Y/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/M157K/R217D	NA
431	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
433	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151W/Q192M/R217D	NA
437	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y15	NA

SEQ ID NO*	**Последовательность мутации**	**ED50 (нМ)**
	1N/Q192M/R217D	
439	R36H/V38D/Y40H/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192V/R217D	NA
440	R36H/V38D/Y40L/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151R/Q192L/R217D	NA
441	R36H/V38D/Y40V/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151F/Q192F/R217D	NA
442	R36H/V38D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
443	R36H/V38D/Y40L/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
449	R36H/V38D/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
453	R36H/V38D/Y40F/V41K/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151R/Q192E/R217D	NA
454	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151N/Q192V/R217D	NA
455	R36H/V38D/Y40L/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151N/Q192D/R217D	NA
456	R36H/V38D/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
457	R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151K/Q192E/R217D	NA
458	R36H/V38D/Y40I/V41A/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192L/R217D	NA
459	R36H/V38D/Y40H/V41M/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/R217D	NA
464	R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/T97aN/A98G/L97bdel/H99L/C122S	NA

SEQ ID NO*	**Последовательность мутации**	**ED50 (нМ)**
	/G193R/R217F	
467	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Q192R/R217D	NA
468	F21S/R36H/V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/E175D/R217D	NA
470	R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/G193R/R217D	NA
168	V38D/Y40P/V41K/L97bA/H99Q/C122S/M157K	NA
430	V38D/V41R/A96D/D97G/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151M/Q192E/R217D	NA
512	F30H/R35T/H37M/V38D/V41R/D60aS/Y60bT/L97bA/H99Q/A112V/C122S/Y151L/M157K/R217T	NA
220	V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S	NA
531	F30N/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S/Q192H	NA
257	F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39S/Y40H/V41W/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192F	NA
306	V38D/L97bG/H99Q/C122S/S195A/R217Q	NA
342	V38D/C122S/S190H/G216A	NA

*SEQID представляет собой примерную протеазную область, содержащую замены

Пример 3

Анти-C3 активность вариантов u-PA в плазме яванского макака

Активность анти-C3 exvivo некоторых модифицированных полипептидов u-PA измеряли у приобретенной плазмы яванского макака (Biotechnology). Среднюю эффективную дозу (ED50) модифицированных

полипептидов u-PA для расщепления C3 рассчитывали с помощью ELISA. Вкратце, приводимые в качестве примера модифицированные полипептиды u-PA последовательно разводили 1: 1,5 раза от 1000 нМ до 39,0 нМ (9 точек разведения). Стандарт hC3 последовательно разводили 1: 1,5 раза от 450 до 39 (7 точек разведения) в 1% BSA в 1XPBST(Фосфатный забуференный физиологический раствор Твин -20)

Рецептура для 1XPBST включает:

1. Растворяют в 800 мл дистиллированной воды

8 г NaCl

0,2 г KCl

1,44г Na2HPO4

0,24 г KH2PO4

2 мл tween -20

2. Регулируют pH до 7,2

3. Доводят объем до 1л дополнительной дистиллированной H2O

4. Проводят стерилизацию автоклавированием.

80 % плазму Cynomolgusvitreous (от BioChemed) в буфере, содержащем 50 мМTris, pH 8,0, 50 мМNaCl, и 0,01% Tween -20, и C3, инкубируют с модифицированными полипептидами u-PA при конечной концентрации 0,1 мкМ при 37° C в течение 10 минут. 80%-Ную плазму разводили 1: 15,625 в 1% БСА в 1XPBST с использованием системы обработки жидкости Biomek (BeckmanCoulter). Плоские ИФА (Bio-Rad), покрытые очищенным антителом a213 (анти-C4; Quidnelspecialtyproducts) в 2. 0 мкг/мл, инкубировали с 50 мкл/лунку образца или стандарта и детектировали антителом против hC3a

(ab11872; Abcam) в 1% BSA в 1xPBST. Лунки дополнительно покрывали конъюгированным с HRP антителом (JacksonImmunoResearch; номер каталога: 115-035-003) при разведении 1: 30000 в 1% BSA в 1xPBST и разрабатывали с помощью WesternBrightECL - (хемилюминесцентная) подложка HRP для обнаружения.

ED50 определяют как концентрацию протеазы, которая дает 50%-ную потерю C3. Результаты показывают повышенную потерю (т.е. расщепление) C3 в присутствии модифицированных полипептидов u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 8-14 и 16-20. Домен протеазы полипептида u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 8, расщепляется ED50, которая была в несколько раз выше остальных. Результатыприведены в таблице 15 ниже.

Таблица 15: анти -C3 активностьв плазме яванского макака

Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO***	**ED_{50} 80% плазма (10 мин, нМ)**
F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8	1700
F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9	176
F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10	114
R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	11	309
F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12	286
F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	13	222
F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/	14	145

Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K		
F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	16	481
F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17	215
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18	244
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19	214
R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20	175

* SEQID представляет собой примерную протеазную область, содержащую замены

Пример 4

Анти-C3 активность модифицированных полипептидов u-PA у яванского макака

Активность модифицированных полипептидов u-PA оценивали расщеплением субстратного белка комплемента человека C3. 2 мкМ очищенного человеческого C3 (ComplementTechnologies; Tyler, TX) инкубировали с модифицированными полипептидами u-PA (0-250 нМ) в течение 1 часа при 37° C в приобретенном стекловидном теле обезьян (BioChemed). Затем активность модифицированных полипептидов U-PA гасили добавлением ингибитора урокиназыGlu-Gly-Argхлорметилкетон (EGR-CMK; HaematologicTechnologies, EGCK -01) до конечной концентрации 10 мкМ, и смесь hC3/модифицированныйu-PAполипептид оставляли стоять в течение 30 минут при температуре окружающей среды.Остаточные уровни непереваренного C3 человека количественно оценивали с помощью ELISA. Модифицированные полипептиды u-PA, включают те, которые содержат замены

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/
T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R,
Y40Q/V41L/L97bA/C122SиY40Q/V41L/L97bA/C122S,
иY40Q/V41R/L97bA/C122S,

Результаты показаны в таблице 16 ниже.

Table 16: расщепление C3 в стекловидном теле

Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO***	**Число оборотовC3 (час$^{-1}$)**
u-Рдикого типаu-PAcC122S	5	0.3
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	15	29
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21	48
Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40	8
Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34	42
V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35	17
V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36	56
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	37	18
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	38	12
R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41	5
T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42	17
T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43	26
T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	44	17

* SEQID представляет собой примерную протеазную область, содержащую замены

Пример 5

Стабильность Exvivoмодифицированных полипептидовu-PApolypeptidesв стекловидном теле яванского макака

Стабильность exvivo модифицированных полипептидов u-PA оценивали в приобретенном стекловидном теле яванского макака или фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Модифицированные полипептиды u-PA, которые проявляют стабильность в стекловидном теле, могут быть использованы для лечения AMD.

80 % стекловидное тело яванского макака (полученного из Bicoheed; CatalogNosBC7615-V1, BC60815-V1, BC33115-V6) в буфере, содержащем 50 мМTris, pH 8,0, 50 мMNaCl, и 0,01% Tween -20 или PBS-контроль инкубировали с модифицированными полипептидами u-PA в конечной концентрации 0,1 мкМ. Эти смеси инкубировали при 37° С в течение 7 дней, а остаточную протеазную активность анализировали с помощью 100 мкМфлуорогенного субстрата AGR-ACC (7-амино-4-карбамоилметил-кумарина) в 50 мМTris, pH 8,0, 50 мMNaCl, 0. 01 % Tween -20 (результаты анализа оценивали при длине волны возбуждения = 380 нм и длине волны излучения = 460 нм). Результаты показывают, что модифицированные полипептиды u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 21-33, проявляют сравнимую активность в плазме яванского макака и PBS.

Результаты приведены в Таблице 17 ниже.

Таблица 17: Стабильность модифициpованных полипептидовu-PAв стекловидном теле

		Активноть (%) на 7 день	
Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO***	**стеклов идное**	**PBS**
u-PAдикого типа протеазный домен cC122S	5	102	111

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21	83	94
H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	22	73	79
R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	23	88	92
R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	24	87	99
R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	25	105	103
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	26	93	108
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	27	88	100
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	28	93	97
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	29	58	61
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	30	86	92
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R	31	90	111
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R	32	89	108
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S	33	74	99

* SEQID представляет примерную протеазную область, содержащую замены

Стабильность exvivo вариантов анти-C3 u-PA в таблице 18 ниже оценивали после инкубации в стекловидное тело яванского макака как на 7, так

и на 28 день. Результаты показывают, что несколько вариантов сохраняют значительную активность даже после 28-дневной инкубации. Результатыприведены в таблице 18 ниже.

5

Таблица 18: Стабильность модифицированных полипептидовu-PAв стекловидном теле

		Активность (%)	
Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO***	**день 7**	**день 28**
u-PAдикого типа cC122S	5	106	90
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	15	43	n/d
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	21	83	34
Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	34	42	n/d
V38E/Y40Q/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S	35	28	n/d
V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S	36	17	n/d
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/H99Q/C122S	37	73	n/d
V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/C122S	38	71	n/d
Y40Q/V41L/L97bA/C122S	40	56	28
R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S	41	100	74
T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S	42	92	61
T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S	43	98	58
T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S	44	86	42

* SEQIDпротеазного домена, содержащего замены

Пример 6

***ExVivo*фармакодинамический анализ в плазме крови человека**

Модифицированные полипептиды u-PA (домены протеаз), инкубировали с 80% человеческой плазмой перед добавлением эритроцитов для оценки расщепления белка комплемента C3 в гемолитическом анализе активности комплемента. Выполняют функциональные анализы в присутствии плазмы крови человека по активности анти-C3 протеаз в фармацевтически приемлемой среде и, например, исследует, являются ли они чувствительными к инактивации сыворотками или другими ингибиторами протеаз, присутствующими в крови человека.

Модифицированные полипептиды u-PA, предложенные здесь, не были ингибированы, в общем, в присутствии плазмы человека. Это имеет значение для лечения заболеваний и нарушений и состояний, таких как DGF, в которых вводимые модифицированные полипептиды u-PA подвергаются воздействию плазмы человека, например, когда вводятся внутривенно. Для применений, таких как обработка AMDинтравитреальной или интраретинальной или субретинальной инъекцией, не важно, чтобы модифицированные полипептиды u-PA не подвергались воздействию плазмы.

Измеряют значение ED50, которое представляет собой концентрацию протеазы, при которой достигается 50% ингибирование активности комплемента. Домен протеазы u-PA дикого типа (SEQIDNO: 5, с C122S) и различные иллюстративные модифицированные домены протеазы u-PA последовательно разбавляли от 3 мкМ до 0,11 мкМ (9 точечных серийных разведений 1: 2) для измерения ED50. Домен протеазы u-PA дикого типа (SEQIDNO: 5) и модифицированные домены протеазы u-PA предварительно инкубировали с конечной концентрацией 80% плазмы в 0. 2 мл трубки путем объединения 4 мкл разведенного раствора протеазы и 16 мкл плазмы человека (с цитратом натрия в качестве антикоагулянта; InnovativeResearch, Inc.).

Это приводило к дальнейшему разбавлению протеазы для получения конечной концентрации от 0,6 мкМ до 0,0022 мкМ протеазы для протокола EC50. В анализы включали контроль без протеазы (18 мкл плазмы и 2 мклPBST) и

фоновый контроль (только 20 мклPBST). Реакционную смесь инкубировали при 37° С в течение 1 часа. Реакционные смеси дополнительно разбавляли до 20% плазмы с добавлением 70 мклPBST.

Сенсибилизированные эритроциты барана (Diamdex, Miami, FL) концентрируют до 10X , удаляют 2,7 мл буфера и ресуспендируют осадок клеток в оставшемся 0,3 мл буфере. Концентрированные сенсибилизированные эритроциты добавляют в полипропиленовые 96-луночные планшеты в объеме 12 мкл на лунку.

К эритроцитам добавляли предварительно инкубированные протеазно-плазменные смеси при 6 мкл или 60 мкл с получением конечной концентрации 1% плазмы или 10% плазмы, соответственно, в конечном объеме 120 мкл (PBST, добавленного в конечный объем). Раствор инкубируют с встряхиванием при комнатной температуре в течение 45 минут. Клетки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут для осаждения неразрушенных клеток, и 100 мклсупернатанта удаляли и помещали в прозрачный 96-луночный микротитрационный планшет.

Высвобождение гемоглобина из лизированных эритроцитов контролируют путем считывания оптической плотности (ОП) при 415 нм. Гемолиз фракции рассчитывают вычитанием фонового контроля, затем делением опытных образцов по безпротеазному контролю (позитивный контроль), где фракцию гемолиза положительного контроля устанавливают в 1,00. ED50 (нМ) гемолиза протеазами измеряли путем построения зависимости гемолиза фракции от-концентрацию протеазы на аппроксимации логистической кривой с 4 параметрами (SoftMaxProsoftware, MolecularDevices, CA).

Результаты представлены в табл. 19 ниже, которая задает ED50 (нМ) для гемолиза в 80% человеческой плазме дикого типа u-PA с мутацией C122S, представленной в SEQIDNO: 5, и модифицированных полипептидов u-PA. Как показано в таблице 19, ED50 для u-PA дикого типа в 80% человеческой плазме выше 6 мкМ; тогда как примерные модифицированные полипептиды домена протеазы u-PA обладают значительно повышенной способностью ингибировать комплемент, как указано ниже ED50 (например, между 173 нМ и 1,028 мкМ).

Таблица 19: ингибирование C3 в человеческой плазме

Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO.***	**ED_{50} 80% человеческая плазма (60 мин, нМ)**
u-PA дикого типа (протеазный домен) cC122S	5	> 6000
F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8	1028
F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9	257
F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	10	195
R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H	11	208
F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12	227
F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	13	220
F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	14	185
F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149	16	220

Таблица 19: ингибирование C3 в человеческой плазме		
Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO.***	**ED_{50} 80% человеческая плазма (60 мин, нМ)**
R/M157K		
F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17	173
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18	253
R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	19	318
R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20	196

* SEQIDпротеазного домена, содержащего замены

Пример 7

Кинетический анализ активации плазминогена с использованием непрямого хромогенного анализа

Кинетический анализ активации плазминогена с использованием непрямого хромогенного анализа проводили для определения активности полипептидов дикого типа и модифицированных полипептидов u-PA, полученных в виде очищенных белковых препаратов (см. Madison et al. (1989) Nature, 339: 721-724; Madison et al. (1990) J Biol. Chem, 265: 21423-21426).Приэтомсвободныйп-нитроанилинвысвобождаетсяизхромогенногосубстратаSpectrozyme PL (H-D-норлейцилгексагидротирозил-лизин-п-нитроанилиддиацетата, American Diagnostics, Inc) поддействиемплазмина, генерируемогодействием u-PA наплазминоген. Высвобождение свободного п-нитроанилина измеряли спектрофотометрически при OD405 нм.

Для анализа 100 мкл реакционных смесей, содержащих 0,25-1 нгu-PA ферментов, подлежащих тестированию, 0,62 мМспектрозимаPL и 0,2 мМLys-плазминогена (AmericanDiagnostics, Inc), объединяли в буфере, содержащем 50 мМTris-HCL (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 1,0 мМ ЭДТА и 0,01% (об./об.) Tween 80. Реакционную смесь инкубировали при 37° C в 96-луночном, плоскодонном микротитрационном планшете (Costar, Inc) и оптическую плотность при 405 нм (OD405) считывали каждые 30 с в течение 1 часа в MolecularDevicesThermomax. Кинетические константы kcat, Km и kcat/Km (константа специфичности) рассчитывали (см. например, Madison, E. L. (1989) Nature 339: 721-724).

Результаты приведены в Таблице 20 ниже. Результаты показывают, что модифицированные полипептиды u-PA обладают значительно пониженной ферментативной активностью для субстратного плазминогена. Все модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, обладают сниженной активностью и специфичностью для плазминогена; и все имеют многократное увеличение специфичности и активности на C3, и для ингибирования активации комплемента по сравнению с немодифицированнымu-PA

Таблица 20: Кинетический анализ активации плазминогена

Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO.***	**k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)**
u-PAдикого типа cC122S	5	1.54E+04
F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	8	4.03E+02
F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K	9	<1.0E+01
F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	12	<1.0E+01

Таблица 20: Кинетический анализ активации плазминогена		
Нумерация по химотрипсину	**SEQ ID NO.***	**k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)**
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	18	<1.0E+01
R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R	20	<1.0E+01
F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K	17	<1.0E+01

* SEQIDпримерного домена протеазы, содержащего замены

Пример 8

Анти-C3 активность и стабильность анти-C3 u-PA варианта стекловидного тела яванского макака *invivo*

Оценивали активность invivo и стабильность модифицированного полипептида u-PA, представленного в SEQIDNO: 21, которая является протеазным доменом, содержащим замены R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R. Стабильность в стекловидном теле и способность расщеплять C3 являются параметрами, указывающими кандидата на лечение AMD.

Двенадцать яванских обезьян были приписаны к одной группе обработки. Для исследования животных интравитреально вводят одну дозу 125 мкг модифицированного полипептида u-PA в один глаз. Вводят выделенный домен протеазы, последовательность которого представлена в SEQIDNO: 21, которая имеет молекулярную массу приблизительно 25 кДа. В правый глаз вводили испытуемое вещество изделием, и в левый глаз вводили контрольный носитель.Четыре животных умерщвляли в каждой из следующих моментов времени: 24 часа после дозы, на 2 день и на 6 день. Образцы стекловидных тел собирали из правого и левого глаза и анализировали на модифицированную

полипептидную стабильность u-PA и уровень C3 после обработки модифицированным полипептидом u-PA или контролем ; C3 и концентрацию модифицированного полипептида u-PA определяли с помощью ELISA, как подробно описано выше.

Концентрацию модифицированного полипептида u-PA, присутствующего в образцах стекловидного тела, полученных через 24 часа после введения дозы, в день 2 и в день 6 определяли с помощью ELISA. Затем активность модифицированных полипептидов u-PA гасили добавлением EGR-CMK (HaematologicTechnologies, EGRCK -01) до конечной концентрации 10 мкМ, и смесь hC3/модифицированного u-PA оставляли на 30 минут при температуре окружающей среды.

Период полужизни модифицированного полипептида u-PASEQIDNO: 21 был определен как приблизительно 2 дня, который должен соответствовать приблизительно 5 дней в человеческой системе (DengetalMAbs 3 (1): 61-66 (2011)). Восстановление invivo (те пиковый уровень модифицированного полипептида u-PA, деленный на дозу модифицированного u-PA (SEQIDNO: 21) рассчитывали с помощью ELISA из наблюдаемого максимального уровня модифицированного полипептида u-PA.

Теоретическое прогнозируемое значение для восстановления 100% invivo составляло 2,5 мкМ. Измеренное invivo значение восстановления модифицированного домена протеазы u-PA (SEQIDNO: 21), содержащего замены:

35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R составило приблизительно 80% от прогнозируемого значения или приблизительно 2,0 мкМ.

Уровни C3 в стекловидном теле были оценены с помощью ELISA, как подробно описано в примере 3. Уровни C3 в контрольном глазу, с введенным носителем в качестве контроля, находились в диапазоне от 0,4 нМ до 50 нМ (2 пробы из глаз, обработанных носителем, существенно отличались от других 10,

вероятно, вследствие загрязнения крови стекловидного тела). Базовый уровень C3 до введения u-PA составлял приблизительно 2,2 нМ. После 1 дня и 7 дней не обнаруживали C3.Через 28 дней концентрация C3 в глазу, обработанным модифицированным полипептидом u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 21, составляла приблизительно 2,2 нМ, что эквивалентно уровню до лечения. Таким образом, модифицированные полипептиды u-PA, предложенные в настоящем документе, являются кандидатами для лечения AMD.

Пример 9

Примеры мутаций u-PA и подтверждение сайтов расщепления

Приведенные в качестве примера положения и мутации в полипептидах u-PA, включая полноразмерные, предшествующие и протеазные домены и их каталитически активные части, представлены в таблице 22 (ниже).

Таблица 22: Примеры мутаций в u-PA

Нумерация по химотрипсину	Зрелая нумерация	wt	Мутация в полипептидеSEQ IDNO:21	Примерная мутация	Conservative to Mutations
30	173	F		Y,	W, F
35	178	R	Q	Q, W, Y	Y, W, F, N
36	179	R		H	N, Q
37	180	H	Y	Y, E, P D, N, G, K, Y	D, E, Q, H, P, R, Q, E, W, F
37a	181	R	E	E, P, Q, N	D, Q, H
38	185	V	E	E	
39	186	T	Y	W, Y, F	M, L
40	187	Y		Q, F	M, L, Y, N, Q

Таблица 22: Примеры мутаций в u-PA					
Нумерация по химотрипсину	**Зрелая нумерация**	**wt**	**Мутация в полипептидеSEQ IDNO:21**	**Примерная мутация**	**Conservative to Mutations**
41	**188**	**V**	R	R, L	K
60a	**208**	**D**	P	P	S
60b	**209**	**Y**	Q	L, Q, S, A, Y, T	N, T, G, S, I, V, Q
97a	**249**	**T**	I	E, I,	D, L, V
97b	**250**	**L**	A	A, G	G, S
99	**252**	**H**	Q	Q	N
149	**306**	**Y**	R	K, R	Q, E
157	**314**	**M**		K	R, Q, E
192	**353**	**Q**		H	N, Q

Замены находятся в любой форме u-PA, включая домен протеазы (SEQIDNO: 2 или 5); полную длину (SEQIDNO: 1 или 4) и зрелую форму (SEQIDNO: 3 или 6). Замены могут быть объединены, в том числе в качестве примеров в настоящем документе, включая вплоть до 15-18 или более замен.

Данные показывают, что модифицированные полипептиды u-pA с этими мутациями, расщепляют и инактивируют C3 во множестве видов, таких как человеческие и яванские обезьяны. Расщепление C3 человека может находиться между остатками 740 и 741 (SEQIDNO: 47), и это расщепление инактивирует C3:

Q H A R↓A S H L 737-744
P4 P3 P1 ↓P1' P4'.

Как показано выше, и по всему описанию модифицированные полипептиды u-PA расщепляют и инактивируют C3. Модифицированные полипептиды u-PA

были выбраны для расщепления в этой области, и подтверждают их тестированием. Например, C3 инкубировали либо с модифицированным доменом протеазы u-PA (SEQIDNO: 21), содержащим замены: R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/ Y149R или с модифицированным доменом протеазы u-PA (SEQIDNO: 40) с заменами Y40Q/V41L/L97bA/C122S при отношении количеств фермента к субстратам 1: 10 или 1: 50 в течение в общем одного часа.

Образцы получали из этих реакционных смесей при 0,5,10, 20, 40 и 60 мин, и реакцию расщепления прекращали непосредственно в каждом образце путем добавления TFA и мгновенного замораживания в сухом льду.Перед дальнейшим анализом этих образцов боковые цепи цистеина восстанавливали и алкилировали, e-аминогруппу боковых цепей лизина блокировали обработкой O-метилизомочевиной и пептидные аминоконцы затем метили NHS-SS-биотином.

Полученные биотинилированные пептиды C3 захватывали и дополнительно расщепляли трипсином и протеазой GluC.

После этого второго расщепления протеазой пептидные продукты снова были захвачены. Затем биотин удаляли из захваченных пептидов путем восстановления, и пептидную смесь анализировали LC-MC/MC. В каждый момент времени через 0 минут наблюдали фрагмент MW 8289, указывающий на расщепление на аргинине в участке QHAR в C3. В этих реакциях не наблюдалось дополнительных сайтов расщепления C3. Следовательно, модифицированные полипептиды u-PA, представленные здесь, расщепляют на QHAR.

Q H A R ↓ A S H L	737-744
P4 P3P2 P1↓P1' P4'.	

Пример 10

Токсичность u-PA в стекловидном теле яванского макака

Безопасность и переносимость модифицированных полипептидов u-PA оценивали invivo у обезьян яванского макака. Три яванских макаки были приписаны к каждой из трех групп обработки. Для исследования животных интравитреально вводят либо 12,5 мкг, 37,5 мкг или 125 мкг в глаз, каждого модифицированного полипептида u-PA. Правый глаз получал исследуемый полипептид, и левым глазом- носитель в качестве контроля.

Клинически наблюдались животные (т.е. проверяли потребление пищи и проводили офтальмологические исследования). Проводят офтальмологическое исследование с помощью щелевой лампы биомикроскопии и косвенных наблюдений офтальмоскопа, после чего проводят фотосъемку глазного дна или оптическую когерентную томографию (ОКТ) перед дозированием (Т = 0) и на 2, 8 и 15 сутки после дозирования. Все наблюдения продолжают до 4 недель или до разрешения.

Для всех животных оценивали не наблюдательно-неблагоприятное влияние на уровень (NOAEL). При этом для животных вводят модифицированный полипептид u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 42, 37,5 мкг. Не было отмечено никаких побочных эффектов для животных, которым вводили модифицированный полипептид u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 21; следовательно, NOAEL для животных, которым вводили модифицированный полипептид u-PA с последовательностью, представленной в SEQIDNO: 21, составляло≥125 мкг (эквивалент ≥375 мкг/глаз у человека).

Пример 11

Проводят расчеты для идентификации возможных иммуногенных точек в u-PA дикого типа, вариантхС122Su-PA дикого типа (SEQIDNO: 5) протеазных доменов и приведенных в качестве примера вариантов u-PA-протеазных доменов для подтверждения того, что мутации в приведенных в качестве

примера вариантах не вводят каких-либо иммуногенных точек. Также были проведены расчеты для сравнения общего профиля точек для вариантов, представляющих интерес, в сравниваемых белках.

Обзор методов

Важным этапом в реакции Т-клеток на чужеродные белки является связывание и презентация составляющих пептидов (происходящих из расщепления чужеродного белка) на любой из хозяев HLA-комплексов, экспрессируемых в антигенпрезентирующих клетках. Идентификация пептидов, полученных из белка, которые прогнозируются для связывания с известными HLA, могут быть использованы как указание возможных горячих точек в последовательности для вызова Т-клеточного ответа.При рассмотрении варианта белка с известными иммуногенными свойствами, сравнение профиля предсказанных HLA-связывающих агентов может помочь определить, вносили ли изменения в любые новые иммуногенные точки.

Профили могут быть сформированы с использованием публично доступных баз данных. Например, публично доступный сервис прогнозирования связывания (NetMHCII 21,2-сервер), TechnicalUniversityofDenmark, был использован для прогнозирования связывания с HLA. Сервер NetMHCII 2.3 прогнозирует связывание пептидов с HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP и мышиными аллелями MHC II класса с использованием искусственных нейронных сетей. Прогнозы могут быть получены для 25 HLA-DR аллелей, 20 HLA-DQ, 9 HLA-DP и 7 аллелей II класса H2 мыши.Значения прогноза приведены в нMIC50, как % к набору 1000000 случайных природных пептидов. На выходе указаны сильные и слабые связывающие пептиды.

Это было использовано для прогнозирования аффинности связывания всех возможных пептидов из 15 смежных аминокислот в примерных вариантах (SEQIDNO: 40 и SEQIDNO: 21) домен протеазы дикого типа (SEQIDNO: 2) и домен протеазы дикого типа с C122S (SEQIDNO: 5) против панели из 14

вариантов HLA-DR (см. таблицу B, ниже) на основе первичной последовательности пептида. Для каждой пары пептид/HLA,

сервер NetMHCII обеспечивает прогнозируемое сродство связывания, а также классификацию в качестве герметичного связующего ($K_d \leq 500$), слабого связующего ($K_d \leq 50$), или несвязующего (Kd> 500 нМ). Для последовательности белка, содержащей N аминокислот, это приводит к сумме T = (N-14) x 14 возможных пар связывания пептид-HLA.

Используя прогнозы связывания с сервера NetMHCII, результаты использовали для идентификации возможных горячих точек в этих белковых последовательностях, на основе областей, где был идентифицирован ряд пар-кандидатов связывания. Эти изменения сравнивали с известными изменениями в соответствующих белковых последовательностях.

Для каждого белка общий показатель (балл) связывания на основе числа прогнозируемых плотносвязанных пептидов-HLA пар (TB), количества предсказанных слабосвязанных пептидов-HLA пар (WB) и общего количества пар пептид-HLA, рассматривался (T) как:

$$Балл = (TB + 0.5 * WB) / T$$

ТаблицаB–молекулы HLA-DRвходящие как возможные связующие

HLA-DRB1*1101

HLA-DRB1*0101

HLA-DRB1*0301

HLA-DRB1*0401

HLA-DRB1*0404

HLA-DRB1*0405

HLA-DRB1*0701

HLA-DRB1*0802

HLA-DRB1*0901

HLA-DRB1*1302

HLA-DRB1*1501

HLA-DRB3*0101

HLA-DRB4*0101

HLA-DRB5*0101

Данный балл продемонстрировал хорошее согласие с прогнозами иммуногенности insilico, создаваемыми компанией EpiVax (Providence, RI), которая использует иммуноинформатику и методики invitro для прогнозирования иммуногенности, при использовании поднабора из 8 НЖК. Используют этот поднабор из 8 HLA. Те же расчеты были выполнены на панели стандартных белков для обеспечения сравнительного набора для сравнения вариантов u-PA.

Влияние мутаций на прогнозируемые HLA-связывающие профили

Количество раз заданной позиции последовательности для любого из вариантов доменов протеаз u-PA картируют для каждого-HLA комплекса при отрезке Kd 50 нМ и 500 нМ. Шкала в каждой колонне является фиксированной, но отличается между колоннами и сравнивается с полипептидами дикого типа для оценки того, изменились ли мутации в иммуногенном профиле. Не наблюдали существенных отличий среди полипептидов.

Показатели агрегационной иммуногенности

Для вычисления показателя агрегационной иммуногенности для каждой последовательности общее количество пептид-HLA связывающих пар при каждом пороговом значении связывания на панели из 8 HLAs (табл. С), которые ранее были проверены по Epivmax (Providence, RI), как было показано, обеспечивают хорошее согласие с опубликованными в баллах иммуногенности

insilico. Epivmax представляет собой компанию, которая использует иммуноинформатику и методы invitro для прогнозирования

Эти значения затем использовали для вычисления общей оценки, как описано в приведенных выше способах.

Таблица CHLA-DR-подгруппа, используемая для общей оценки иммуногенности

HLA-DRB1*0101
HLA-DRB1*0301
HLA-DRB1*0401
HLA-DRB1*0701
HLA-DRB1*0802
HLA-DRB1*1101
HLA-DRB1*1302
HLA-DRB1*1501

Ниже показано количество пар пептид-HLA для поднабора из 8 HLA и оценки для uPA:

ID последовательности	**# сильный (*TB*)**	**# слабый (*WB*)**	**Общий возм. (*T*)**	**Оценка**
2 (WT)	98	526	1888	.191
5 (WTS)	109	542	1888	.201
40	107	528	1912	.194
21	96	514	1912	.185

Результаты показывают, что иммуногенность вариантов не должна отличаться от полипептидов дикого типа. Результаты того же анализа для панели сравнительных белков показаны ниже:

Последовательность	**# сильный (*TB*)**	**# слабый (*WB*)**	**Общий возможный (*T*)**	**Оценка**
Фоллитропин-бета	13	120	920	.079
Фибриноген-альфа	125	582	5040	.083
Инсулин	32	107	768	.111
Альбумин	192	743	4760	.118
Амилаза	210	711	3976	.142
Тромбопоэтин	266	609	2712	.210
Интерферон-бета	175	353	1384	.254
Интерлейкин-11	233	316	1480	.264

Пример 12

Активация плазминогена по wt-и вариантным полипептидам u-PA

Каталитическая эффективность для активации Glu-плазминогена по wt-и анти-C3 вариантам полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе, была протестирована, как описано ниже. Данные из этих экспериментов показали, что белки варианта анти-C3 u-PA демонстрируют значительно сниженную активность в отношении плазминогена, физиологически значимый субстрат дикого типа u-PA. В комбинации с данными из примера 7 эти данные демонстрируют, что полипептиды анти-C3 u-PA проявляют не только по существу большую активность по отношению к новому субстрату, C3, но также существенно сниженную активность в отношении нормального физиологического субстрата, wtu-PA.

Мутации, введенные в анти-C3 варианты, описанные в данной заявке, имеют значительно измененную субстратную специфичность анти-C3 вариантных полипептидов по сравнению с мутациями в wt-u-PA.

Активация плазминогенаwt-и анти-C3 вариантными полипептидамиu-PA

1) Анализ с использованием одновременной точечной реакции (37° C в течение 30 минут)

a) Условия реакции

Активность активации плазминогена измеряли для дикого типа u-PA/C122S (SEQIDNO: 5), а также вариантов полипептида анти-C3 u-PA, содержащих мутации Y40Q/V41L/L97bA/C122S (SEQIDNO: 40) и R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R (SEQIDNO: 21). Концентрации протеаз в реакционной смеси составляли 25 нМ (wt-u = PA) или 250 нМ (вариант анти-C3 u-PA) и субстрата (т.е. концентрация Glu-плазминогена) составляла 2,5 мкМ. Реакционный объем составлял 20 мкл и реакцию продолжали в течение 30 минут при 37° C. Каждую реакцию завершают добавлением 2 мкл 1 M DTT и 7 мкл 4X буфера, и нагревали до 80° C в течение 45 сек.Законченные реакционные смеси загружают в индивидуальные лунки 4-12% бис-ТРИС геля и прогоняют в буфере XT MES при 200 В в течение 45 мин и затем окрашивают SimplyBlueSafeStain.

b) Измерение продукта реакции (т.е. плазмина)

Анализ окрашенного SDS-геля показал, что wtu-PA расщепляет весь плазминоген, присутствующий в реакции, преобразуя его в двухцепочечный, активный плазмин в течение 30-минутной инкубации. Напротив, активность варианта u-PA Y40Q/V41L/L97bA/C122S (SEQID 40) в этой реакции существенно ниже, чем wt-u-PA, в то время как отсутствие активации плазминогена наблюдали при помощи варианта u-

PAR35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R в этой реакции.

2) Кинетика активации Glu-плазминогена анти-C3 u-PA полипептидами

Кинетический анализ активации Glu-плазминогена с помощью wt- или анти-C3 uPA вариантных полипептидов проводили, как описано ниже. Реакции активации проводили при 37° C в буфере I = 0,16 M Hepes/NaCl/EDTA, содержащем 0,1% BSA. Полипептиды U-PA присутствуют в концентрациях 1 (wt) или 10 (вариант) нМ.

Константы скорости второго порядка (kcat/KM) получают из установленной линейной зависимости начальных скоростей реакции гидролиза (по продукте реакции плазмине) хромогенного субстрата S -2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA · 2HCl) от концентрации Glu-плазминогена (те u-PA субстрата) (0-4 мМ). См. также таблицу 24.

SEQ ID NO.	**Мутации**	k_{cat}/K_M **($M^{-1}s^{-1}$)**	**± S.D.**	**% CV**	**n =**	**Отношение к WT**
5	C122S (WT)	2.28E+04	2.62E+03	11.5%	4	1
423	V38D/L97bA/H99Q/C122S	1.38E+03	1.79E+02	12.9%	4	17
8	F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K	4.59E+02	6.42E+01	14.0%	4	50
254b*	C[4]S/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bH/T97aI/	9.91E-01	1.88E+00	190.0%	4	23034

SEQ ID NO.	Мутации	k_{cat}/K_M($M^{-1}s^{-1}$)	± S.D.	% CV	n =	Отношение к WT
	L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192A					

Мутация C4Sне является протеазным доменом

Сравнение между 15 вариантами показало результаты в Таблице 24, приведенной ниже, отмеченной как «Активация Glu-плазминогена анти-C3 u-PA вариантами.

Для Таблицы 24:

Glu-плазминоген активировали с помощью C122SuPA или выбранных вариантов uPA при концентрациях протеаз 1 нМ или 10 нМ.

Реакции проводили при 37° C в буфере I = 0,16 M Hepes/NaCl/EDTA, содержащем 0,1% BSA

Константы скорости второго порядка (kcat/KM) получают из установленной линейной зависимости начальных скоростей реакции гидролиза хромогенного субстрата S -2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA · 2HCl) от концентрации Glu-плазминогена (0-4 мкМ).

Пример 13

Пример протеазного домена U-PA расщепления белка комплемента C3 в стекловидном стекловидном теле яванского макака

Иллюстративные мутанты представлены в таблице 23 ниже со ссылкой на домен протеазы U-PA, представленный в SEQIDNO: 5. Затененные клетки указывают на то, что модифицированные полипептиды u-PA мутированы на этом остатке по сравнению с эталонным полипептидом u-PA, представленным в SEQIDNO: 5. Незаштрихованные клетки указывают на то, что модифицированные полипептиды u-PA содержат одну и ту же аминокислоту, что и эталонный полипептид u-PA, представленный в SEQIDNO: 5. Активность модифицированного полипептида u-PA была определена путем расщепления белка C3 комплемента субстрата,

как подробно описано и представлено в примере 2, и представлено в качестве остаточных уровней C3 (нМ) после u-PA обработки. Расщепление C3 с помощью модифицированных полипептидов u-PA проводили в стекловидном теле яванского макака или фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), как подробно описано в примере 3.Результаты, приведенные в таблице 23, ниже, показывают, что модифицированные полипептиды u-PA проявляют большую активность против C3 по сравнению с эталонным доменом протеазы u-PA, последовательность которого представлена в SEQIDNO: 5. Активность в стекловидном теле и PBS показывает процент остаточной активности через 7 дней. Модифицированные полипептиды u-PA относительно стабильны по сравнению с эталонным доменом протеаз дикого типа SEQIDNO: 5, с некоторыми, обладающими большей стабильностью, чем другие. Кандидаты на терапию, в том числе в таблице ниже, являются теми, которые имеют высокую активность расщепления C3, и более высокую стабильность, в частности, в стекловидном теле.

Таблица 23: Примеры свойств модифицированных полипептидов u-PA

	Мутация по нумерации химотрипсина														C3 активность (%) на 7 день	
SEQ ID NO.*:	R35	H57	K57a	V38	I39	V41	D60a	Y60D	I97a	L97b	H99	C122	Y149	hC3 расщепление (нМ)	стекловидное	PBS
5	R	H	R	V	T	V	D	Y	T	L	H	S	Y	3380	102	111
21	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	19	83	94
22	R	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	51	73	79
23	Q	H	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	46	88	92
24	Q	Y	R	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	6	87	99
25	Q	Y	E	V	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	R	10	105	103
26	Q	Y	E	E	T	R	P	Q	I	A	Q	S	R	161	93	108
27	Q	Y	E	E	Y	V	P	Q	I	A	Q	S	R	519	88	100
28	Q	Y	E	E	Y	R	D	Q	I	A	Q	S	R	30	93	97
29	Q	Y	E	E	Y	R	P	Y	I	A	Q	S	R	11	58	61
30	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	T	A	Q	S	R	25	86	92
31	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	L	Q	S	R	155	90	111
32	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	H	S	R	92	89	108
33	Q	Y	E	E	Y	R	P	Q	I	A	Q	S	Y	9	74	99

* SEQIDпротеазного домена, содержащего замены

Среди прочего эти данные и другие данные показывают, что:

R35Q: эта мутация увеличивает собственную анти-C3 активность (т.е. в буфере) приблизительно в 2,7 раза и приблизительно в 4,3 раза в присутствии 80% человеческой плазмы

H37Y: эта мутация увеличивает активность анти-C3 приблизительно в 2,4-2,5 раза в буфере и в присутствии 80% человеческой плазмы

R37aE: эта мутация уменьшает собственную анти-C3 активность приблизительно в 3,2 раза; однако в присутствии 80% человеческой плазмы не оказывает влияния на анти-C3 активность

V38E: эта мутация улучшает стабильность белка в буфере и стекловидном теле и улучшает анти-C3 активность в 80% человеческой плазме в ~ 1,5 раза

T39Y: данная мутация увеличивает собственную анти-C3 активность и анти-C3 активность в 80% человеческой плазме приблизительно в 7,5-8,5 раз

V41R: Эта мутация увеличивает собственную анти-C3 активность и анти-C3 активность в 80% человеческой плазме приблизительно в 25-27 раз

D60aP: Эта мутация увеличивает собственную анти-C3 активность и анти-C3 активность в 80% человеческой плазме приблизительно в 1,2-1,6 раза

Y60bQ: Эта мутация уменьшает собственную анти-C3 активность примерно в 1,7 раза и снижает стабильность белка в стекловидном теле после инкубации в течение 7 дней при 37° C в ~ 1,4 раза; но в присутствии 80%-ной плазмы человека, повышается анти-C3-активность примерно в 1,1 раза

T97aI: Данная мутация увеличивает собственную анти-C3 активность и анти-C3 активность в присутствии 80% человеческой плазмы приблизительно в 1,2-1,3 раза

L97bA: Эта мутация увеличивает активность анти-C3 приблизительно в 6,4-8,2 раза в буфере и в 80% человеческой плазме

H99Q: Эта мутация увеличивает анти-C3 активность приблизительно в 2,9-4,8 раза в буфере и 80% человеческой плазмы

Y149R: Эта мутация уменьшает анти-C3 активность приблизительно в 1,6-2,1 раза в буфере и 80% человеческой плазмы.

Аналогичные результаты были достигнуты для замен в модифицированных полипептидах u-PA с пониженной мутацией, которые содержат:

I41D/C122S/G151N/Q192T (см. например, модифицированный полипептид u-PA, последовательность которого представлена в SEQIDNO: 40, а также полноразмерная и предшественник и зрелые формы, содержащие эти замены).

Данные указывают на то, что модифицированный u-PA, представленный в данном документе, расщепляет и инактивирует C3 во множестве видов. Например, расщепление C3 человека для инактивации его может находиться между остатками 740 и 741 (SEQIDNO: 47):

Q H A R↓A S H L	737-744
P4 P3 P1 ↓P1' P4'.	

Пример 14

Клонирование, экспрессия и получение слитых белковu-PA-человеческий сывороточный альбумин (HSA)

A. Клонирование слитого белка u-PA-HSA

Создан конструкт для экспрессии гибридного белка u-PA-HSA (SEQIDNO: 1015). Фрагмент u-PA-линкер-HSA собирают из синтетических олигонуклеотидов и/или продуктов ПЦР и клонируют в вектор pcDNA3,4-TOPO (Invitrogen; CatNOa14697) для экспрессии под контролем человеческого цитомегаловируса (CMV) промотор/энхансер или собственного вектора экспрессии (LakePharma). Последовательность сигналов секреции (SEQIDNO: 999 (METDTLLLWVLLLWVPGSTG)) была клонирована выше от N-концевого домена u-PA (аминокислоты 1-158 SEQIDNO: 3), и примерный модифицированный домен протеазы u-PA (представленный в SEQIDNO: 987), и связанный через линкер (SEQIDNO: 1002 (GGSSGG)) с кодирующей областью человеческого сывороточного альбумина (HSA; SEQIDNO: 991):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFL
QHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL
FFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKF
GERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDR

ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV
ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCC
AAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTK
KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH
EKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE
KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFA
EEGKKLVAASQAALGL.

Конструкция включает сигнальный пептид (аминокислоты 1-20), u-PAN-концевой домен, модифицированный домен протеазы SEQIDNO: 21, за исключением C в положении 122 (представленный в SEQIDNO: 987), линкер GS (GGSSGG, SEQIDNO: 1002), за которым следует область кодирования HSA. Полная конструктивная последовательность, приведенная в SEQIDNO: 1015, представляет собой:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWC
NCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQ
TYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCA
DGKKPSSPPEELKFQCGQKTLRPRFK**II**GGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEY
YRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLI
LHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTI**C**LPSMYNDPQFGTSCE
ITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQ
WKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLP
WIRSHTKEENGLAL**GGSSGG**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQ
QCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY
GEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL
KKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRD
EGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
TKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA
EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYS
VVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELF
EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRM
PCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYV

PKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL.

B. Получение полипептидов слияния u-PA-HSA

1. Трансформация и экспрессия полипептидов слияния u-PA-HSA

ДНК, кодирующую модифицированный полипептид слияния u-PA-HSA, клонировали в вектор экспрессии pcDNA3_4 (ThermoFisher) или собственный вектор (LakePharma) С-терминал в сигнальную последовательность секреции, как подробно описано в разделе А

Модифицированные слитые белки u-PA-HSA затем экспрессировали в объеме 1 л среды экспрессии в течение 6 дней в клетках экспрессии HEKexpi293 или expCHO от ThermoFisher или TunaCHO ™ при LakePharma.

3. Афинная очистка слитых полипептидовu-PA-HSA

Зимоген слитых белков u-PA-HSA очищали с использованием системы, продаваемой как CaptureSelect™ HumanAlbuminAffinityMatrixsystem (ThermoFisherScientific; Cat. No. 19129701Lor 19127005) согласно инструкциям производителя. Колонку готовили добавлением приблизительно 10 мл смолы CaptureSelect™ AffinityMatricesresin (ThermoFisher)Capreselect™ . После того как раствору для хранения было позволено протекать через колонку, 10 объемов колонки (CV) PBS (137 мMNaCl, 2. 7 мMKCI, 10 мMNa2HPO4, 2 мMKH2PO4, pH 7,4) добавили для промывки. Далее на колонку наносили слитые белки u-PA-HSA, и затем промывали 5-10 CVPBS. Связавшиеся слитые белки u-PA-HSAэлюировали 10 CVэлюирующего буфера (20 мMТрис, 2 M MgCl2, pH 7,0). Затем в колонку добавили 10 CV глицина (0,2 M, pH 3,0) и нейтрализуют 10% Трис-HCl (1,5 M, pH 7,4) и повторно уравновешивают в PBS.Пробы потока на стадии элюирования собирали и анализировали на уменьшенном и

неуменьшенном гель-электрофорезе SDSPAGE для оценки чистоты образца. Слитые белки u-PA-HSAдиализуют в течение 16 часов в PBS при 4° C

3. Активация плазмина модифицированных слитых полипептидов u-PA-HSA

Плазмин селективно расщепляет одну связь в u-PA дикого типа и других слитых полипептидах u-PA, имеющих последовательность активации u-PA дикого типа, для активации зимогена u-PA-HSA с образованием двухцепочечногог слитого белка u-PA-HSA, связанного через дисульфид с С-концевым активным протеазным доменом, привязанным к N-концевому u-PA-домену посредством дисульфидной связи. Для этих экспериментов используют конструкцию, имеющую последовательность, представленную в SEQIDNO: 1015, которая содержит модифицированный u-PA полипептид SEQIDNO: 21, за исключением того, что C122S, по нумерации химотрипсина, представляет собой C122C для обеспечения свободного цистеина, и сигнальная последовательность (остатки 1-20 SEQIDNO: 1015) не включена. После активации полученный продукт имеет две цепи (со ссылкой на SEQIDNO: 1015): цепь A, которая имеет остатки 21-178, и цепь B, которая имеет остатки 179-1022, u-PA (остатки 179-431), линкер (остатки 432-437) и HSA (остатки 438-1022).Цепи a и B связаны дисульфидной связью между C168 и C299 (что соответствует C122 по нумерации химотрипсина).

Домен HSA остается конъюгированным через линкер GGSSGG с С-концом домена протеазы. Активирование происходитс после процедуры: суспензию плазмин-агарозной смолы (MolecularInnovations; CatNo. HPL -1) получали промыванием смолы 1xPBS 3 раза.

Затем 200 мкл суспензии смолы в 1xPBS на миллиграмм слитого полипептида u-PA добавляли к раствору, содержащему диализованный слитый полипептид u-PA-HSA в PBS.Активацию зимогена полипептида u-PA осуществляют путем осторожного встряхивания раствора белка/смолы в течение 3 часов при комнатной температуре. Модифицированный полипептид u-PA-HSA зимоген

был далее преобразован в соответствующую активную модифицированную u-PA-HSA протеазу.

Активированные модифицированные полипептиды u-PA-HSA извлекают из плазминовой смолы с использованием 0,2 мкм фильтров (2,0 мл) и центрифугируют для восстановления активированного модифицированного u-PA-HSA из смолы плазмина по инструкциям производителя. Для максимизации восстановления можно предусмотреть дополнительные методы фильтрации (в отличие от вращения смолы и извлечения супернатанта путем экстракции пипеткой). Другие фильтрующие устройства также могут быть использованы для последующей фильтрации смолы. Активированные слитые белки u-PA-HSA хранили при 4° C или замораживали в аликвотах. Подтверждение полной стадии активации визуализировали посредством SDS-PAGE в восстановительных условиях для отделения N-концевого домена от гибридного конъюгатаHSA домена протеазы.

4. Ингибирование активированных модифицированных слитых белков u-PA-HSA

Для некоторых экспериментов было желательно использовать каталитически неактивную форму слитого полипептида u-PA-HSA (остатки 21-1022 SEQIDNO: 1015, как описано выше; см. например, SEQIDNO: 1019). Для получения белка, обозначенного как ингибированный модифицированный u-PA-HSA (u-PA-HSAi), активированный модифицированный u-PA-HSA (u-PA-HSAa) инкубировали с необратимым ингибитором активного сайта, Glu-Gly-Arg-хлорметилкетоном (EGR-CMK), чтобы предотвратить любой аутокатализ модифицированных полипептидов u-PA-HSA или инактивацию/расщепление в экспериментах invivo (см. например, примеры 15 и 16). Для получения u-PA-HSAiлиофилизированныйEGR-CMK (MolecularInnovations; CatNoGGACK) восстанавливали до 100 мМ в 10 мМHCl.

К образцу активированного модифицированного u-PA-HSA добавляли концентрированную EGR-CMK (u-PA-HASa) при концентрации для достижения конечной концентрации ингибитора 1 мМ ингибитора EGR-CMK в 1xPBS, и смесь оставляли инкубироваться в течение 1 часа при комнатной температуре.

Для оценки того, был ли полностью ингибирован u-PA-HASa, деградация модифицированного u-PA-HSAi была сравнена с модифицированной u-PA-HASa в эксперименте по устойчивости.

Вкратце, модифицированные u-PA-HSAi и модифицированные u-PA-HSAa инкубировали в течение 0 часов, 1 день или 7 дней при 37° C. Деградацию модифицированных u-PA-HSAi и u-PA-HSAa визуально контролировали путем восстановительного и невосстановительногоSDS-PAGE гель-электрофореза в восстановительных и невосстановительных условиях.

Полосы визуализировали с помощью Comassie или другого аналогичного коммерчески доступного красителя.Результаты показывают, что предварительная инкубация с ингибитором стабилизирует полипептид, так как не наблюдалось продуктов деградации для модифицированного u-PA-HSAi в любой момент времени до 7 дней, по сравнению с наблюдаемой деградацией модифицированного u-PA-HASa после инкубации в течение 1 дня или 7 дней при 37° C

5. Очистка полипептидов u-PA-HSAaиu-PA-HSAiпосле активации

В процессе окончательной очистки отделяют активные и ингибированные модифицированные полипептиды u-PA-HSA от высоко- и низкомолекулярных примесей с использованием эксклюзионной хроматографии. Очистка исключает высокомолекулярные частицы, которые элюируются в виде дискретного пика до основного пика u-PA-HSA. Частицы с высокой молекулярной массой не были дополнительно проанализированы, однако могут представлять собой агрегаты или мультимеры, которые образуются во время стадий экспрессии или активации в процессе.Также исключаются вторичные низкомолекулярные виды, не содержащие альбумин, генерируемые во время экспрессии или активации.

Очистку ведут следующим образом; ~ 300 мкл образца модифицированного u-PA-HSAi (0,8 мг) или ~ 400 мкл образца модифицированного u-PA-HSAa (0,8 мг) загружают на эксклюзионнуюхроматографическую колонку (hPirep 16/60 SephacrylS -200 HR; GEHeatcare, CatNoGE17-1166-01) в PBS при pH 7,0 при скорости потока 0,5 мл/мин. Белки, как правило, очищают в соответствии с инструкциями производителя для смолы (GEHealthcare) с основным пиком, содержащим модифицированный u-PA-HSAi или u-PA-HSAa.

Качество препаратов и степень разделения дополнительно оценивали восстанавливающим и невосстанавливающим гель электрофорезом SDS-PAGE. Элюированные фракции модифицированных полипептидов u-PA-HSAi или u-PA-HASa выгружают в каждую «полосу» 12-луночного невосстанавливающего геля SDS-PAGE и проводят при 40V до тех пор, пока полосы не будут достаточно отличимы, и различные по размеру частицы белка визуализируются с помощью окрашивания серебром для улучшения чувствительности по стандартному пятну Кумасси.Фракции, содержащие единичные полосы, мигрирующие с ожидаемой молекулярной массой 75 кДа, объединяли и быстро замораживали в жидком азоте при конечной концентрации приблизительно 2 мг/мл и хранили при -80° С до использования.

Конечную концентрацию определяли по поглощению при 280 нМ с помощью спектрофотометра NanoDrop. Размер и экспрессия белка были позже подтверждены пятном Кумасси и SDS-PAGE.Качество отдельных образцов полипептида u-PA-HSA дополнительно оценивали с помощью анализов активности и масс-спектроскопии.

Пример 15

Фармакокинетическая оценка модифицированного домена u-PA-протеазы и модифицированного слитого белка u-PA-HSA после интравитреальной инъекции

Оценивали фармакокинетику и окулярную токсичность модифицированного слитого полипептида u-PA-HSA. Слитый белок содержит протеазный домен

модифицированного полипептида u-PA (SEQIDNO: 987, который представляет собой SEQIDNO: 21, за исключением того, что C122S представляет собой C122C), как описано выше в примере 14. Слитый белок имеет последовательность, представленную в SEQIDNO: 1019, которая является остатками 21-1022 SEQIDNO: 1015.

Как описано в примере 14, домен протеазы модифицированного u-PA представлен в SEQIDNO: 987. Фармакокинетический профиль активированных и ингибированных модифицированных белков слияния u-PA-HSA (SEQIDNO: 1015) оценивали invivoy кроликовDutchBelted и сравнивали с фармакокинетическим профилем модифицированного домена протеазы u-PA только как изложено в SEQIDNO: 21.

Восемь кроликов назначают в каждую из трех групп лечения (группа 1: модифицированный u-PA-HASa; группа 2: модифицированный u-PA-HSAi; группа 3: модифицированный домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 21)). Животным вводят 50 мкл либо 2,1 мг/мл модифицированного u-PA-HSAi и u-PA-HASa, либо 1,15 мг/мл модифицированного u-PA (SEQIDNO: 21), в глаз, через интравитреальную инъекцию (IVT). Для группы, обработанной модифицированной u-PA, содержащей модифицированную протеазу, правый глаз получает модифицированный u-PA полипептид, в левый глаз инъецировали PBS в качестве контрольного носителя.

В таблице ниже обобщены группы и условия, и оценки.

Группа	**Препарат**	**Концентрация (мг/мл)**	**Доза**	**Метод/ время**	**Моменты времени**	**Жидкости и ткани**
1	модифици	2.1	50	Осушени	1, 3, 7, и	Водное тело,

(n=8)	рованныйu-PA-HSA активированный (u-PA-HSAa)	мг/мл	мкл/глаз внутривитреально	е/ перед эвтаназией	14 дней daysпосле дозы (n=2/ момент времени)	стекловидное тело, сетчатка, сосудистая оболочка, плазма
2 (n=8)	модифицированный u-PA-HSA ингибированный (u-PA-HSAi)	2.1 мг/мл	50 мкл/глаз внутривитреально	Осушение/ перед эвтаназией	1, 3, 7, и 14 дней days после дозы (n=2/ момент времени)	Водное тело, стекловидное тело, сетчатка, сосудистая оболочка, плазма
3 (n=8)	Протеазный домен модифицированного u-PA (SEQIDNO: 21)	1.15 мг/мл	50 мкл левый глаз внутривитреально/ правый глаз контроль	Осушение/ перед эвтаназией	1, 3, 7, и 14 дней days после дозы (n=2/ момент времени)	Водное тело, стекловидное тело, сетчатка, сосудистая оболочка, плазма

*OSиODотносятся соответственно к правому и левому глазу

1. Глазная толерантность модифицированных белков u-PAи слитогоu-PA-HSA

В течение периода дозирования и до эвтаназии проводят клинико-окулярные наблюдения и регистрируют массу тела. Окулярные исследования проводили на обоих глазах на 1, 3, 7 и 14 дни (Группы 1 и 2) или на 1, 3 и 7 дни (Группа 3) после дозирования, а окулярное раздражение оценивали с использованием шкалы Draize. Система (Draize*etal.*, (1944) *JPharmExperTher* 82 (3) 377-90) оценивает раздражение глаз в роговице, радужной оболочке и

конъюнктиве и обеспечивает критерии оценки раздражения на 0-2 или 0-4 шкале.

Балл "0" указывает на нормализацию роговицы, радужной оболочки или конъюнктивы. Во всех временных точках оценено окулярное раздражение 0, оценивают его с использованием критерия Draize для всех животных за исключением одного кролика с 2 баллами, свидетельствующих об его «окраске», где указанные сосуды определенно инъецируют выше нормального сепсиса и при его разбухании выше нормального развития конъюнктивы. Для одного кролика в группе 2 (u-PA-HSAi) наблюдают эти оценки в течение нескольких часов после интравитреального введения u-PA-HSAi в день 1. Наиболее важно, чтобы не было токсичности, наблюдаемой после интравитреального введения модифицированных белков слияния u-PA и модифицированного u-PA-HSA.

2.Фармакокинетика модифицированного белка u-PA и модифицированного слитого белка u-PA-HSA

Для определения концентраций модифицированных u-PA и модифицированных u-PA-HSA полипептидов (нМ) и фармакокинетических параметров терминальные образцы глазных тканей и жидкостей собирают после энуклеации обоих глаз на 1, 3, 7 и 14 дни с использованием двух животных в каждый момент времени.

После эвтаназии оба глаза каждого кролика собирают и иссекают для сбора глазных тканей и жидкостей (водный гумат (AH), стекловидное тело (VH), сетчатку и хориоидею) для оценки экспрессии и активности u-PA и u-PA-HSA.После сбора взвешенные количества стекловидного тела кролика, сетчатки и хориоидеи гомогенизировали в ударопрочных микропробирках (США Scientific), содержащих керамические бусины 2,8 мм.

Для VH, сетчатки и тканей хориоидеи в каждую трубку добавляют постоянную аликвотузабуференного фосфатом физиологического раствора на миллиграмм

ткани. Образцы сетчатки и хориоидеи разводили 9: 1 (объем разбавителя: объем ткани) и образцы VH разбавляли 4: 1 (объем разбавителя: объем VH) фосфатно-солевым буфером.Образцы гомогенизировали (гомогенизатор Preellys ®) при температуре от 0 до 10° C, при 5500 об/мин в течение 3 × 30 вторых циклов с 20 секундами пауз между циклами до полной гомогенизации.

Концентрацию, определенную с помощью ELISA (нМ) и активность (nM) модифицированных полипептидов u-PA и модифицированных полипептидов u-PA-HSA в VH, определяли с использованием анализа ELISA и активности, соответственно. Для определения концентрации анти-u-PA сэндвич ELISA проводили следующим образом: захватывающее антитело PA1-36166 (Invitrogen) покрывали на планшетах ELISA в течение ночи при 4° C или 2 часа при комнатной температуре в концентрации 1,0 мкг/мл в 100 мМ карбонатном буфере, pH 9,5.

Затем планшеты промывали 3XPBST (1XPBS, содержащим tween), затем блокировали 1% BSA в PBS-tween в течение ночи при 4° C или 2 часа при комнатной температуре. 50 мл каждого образца инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием с последующей промывкой 3xPBS и инкубированием с детектирующим антителом PA1-36015 (Invitrogen при 0,25 мкг/мл в течение 30 мин).Вновь промывают и затем инкубируют с конъюгированным с HRP козьим антителом (Rockland) при разведении 1: 30000 в течение 30 мин при встряхивании при комнатной температуре. После промывки 6X с PBST, связавшиеся модифицированные полипептиды u-PA и модифицированные полипептиды u-PA-HSA визуализировали путем обнаружения с помощью 1-этапного TMB (34028, Thermo), обработкой 2N серной кислотой перед считыванием поглощения при 450 нм.

Затем проводят количественное определение модифицированных полипептидов u-PA и модифицированных полипептидов u-PA-HSA в VH по активности с последующим анализом на основе гидролиза флуоресцентного пептидного субстрата (FRET) и калибруют до стандартной кривой модифицированных полипептидов u-PA известной активной концентрации. Этот анализ использует пептидный субстрат FRET на основе

последовательности расщепления комплемента человека 3 (C3). Последовательность пептида-RQHAR/ASHL, где "/"

указывает на место расщепления. N-концевая сторона пептида маркирована флуорофоромDABCYL, а C-концевая сторона обозначена флуорофоромEDANS. Расщепление пептида отделяет пару EDANS/DABCYLFRET для генерирования флуоресцентного сигнала, который измеряется в устройстве считывания флуоресцентной пластины.

Анализ проводили следующим образом: тестируемые образцы, как правило, разводят до минимально необходимого разведения 1: 20 в буфере для анализа (100 мМТрис, 50 мМNaCl, 0,01% Твин -80, pH 7,4). Разведенные пробы дополнительно разводят 1: 2 с 80 мкМ субстрата FRET в 96-луночном планшете. Сразу после комбинации разбавленных испытуемых образцов и субстрата сигнал флуоресценции после гидролиза субстрата FRET оценивали в считывателе флуоресцентной пластинки с измерениями каждые 30 секунд в течение 2 часов.

Ферментативный гидролиз пептидного субстрата FRET генерирует флуоресцентный продукт EDANS. Скорость генерации интенсивности флуоресценции интерполируют по стандартной кривой EDANS с получением скорости выработки продукта EDANS. Удельная активность может быть рассчитана двумя способами. Сначала скорость выработки продукта умножают на коэффициент разбавления для получения объемной удельной активности в единицах нмоль продукта в минуту реакции на мл пробы (нмоль/мин/мл). Объемная удельная активность указывает на общее количество активного фермента в образце. Во-вторых, рассчитывают удельную активность путем деления объемной удельной активности на концентрацию фермента пробы с получением удельной активности фермента в единицах нмоль продукта в минуту реакции на мг фермента (нмоль/мин/мг).

Для тестирования на определение кажущейся концентрации протеаз неизвестных образцов (например,, invivoPK образцов), объемную удельную

активность образца (нмоль/мин/мл) делят на ферментативную удельную активность контрольного модифицированного u-PA или модифицированного полипептида u-PA-HSA (нмоль/мин/мг) для получения кажущейся концентрации протеазы в образце (мг/мл).

Данные для каждого глаза и животного представлены в таблице ниже. Полученные для каждого глаза концентрации усредняют на животное. Затем концентрации лекарственного средства для каждого животного усредняют в каждый момент времени для компенсации межживотной изменчивости. Средства в каждой временной точке были вычислены и представлены в таблице ниже. Полученные данные затем подвергали следующей аналитической методологии:

Сначала, используют полупараметрический кусочно-робастный регрессионный подход, разработанный Lee и др.Lee *et al.*, (1990) *J. Lab Clin. Med. 115*:745-748; and Lee *et al.* (1997) "The use of robust regression techniques to obtain improved coagulation factor half-life estimates. XVIth Congress of the International Society for Thrombosis and Hemostasis," Florence, Italy) длярасчетавременииполужизни.

Данные оценивали с использованием программы Demitasse, которая была проверена на достоверность и использована для заданий FDA.Для анализа площади под кривой времени (AUC) и других параметров PK используют некомпартментную модель на основе трапециевидного правила. Параметры PK рассчитывали и изложены в таблицахниже.

Таблица

Условия	**Время (д)**	**Концентрация препарата по ELISA (нМ)**	**Концентрация препарата по активности (нМ)**
Модифицированный u-PA-HSAi	0	842.90	n.d.
	1	385.08	n.d.
	1	**122.79**	**n.d.**

Условия	Время (д)	Концентрация препарата по ELISA (нМ)	Концентрация препарата по активности (нМ)
	1	289.90	n.d.
	1	270.36	n.d.
	3	289.25	n.d.
	3	257.84	n.d.
	3	254.54	n.d.
	3	265.59	n.d.
	7	120.94	n.d.
	7	138.35	n.d.
	7	144.15	n.d.
	7	113.22	n.d.
	14	30.13	n.d.
	14	27.53	n.d.
	14	36.28	n.d.
	14	25.37	n.d.
Модифицированный u-PA-HSAa	0	842.90	842.90
	1	368.35	749.14
	1	264.23	344.78
	1	311.69	460.72
	1	**<LOD**	**0.35**
	3	199.27	505.84
	3	168.21	283.60
	3	132.80	179.47
	3	181.28	239.77
	7	64.47	156.92
	7	61.08	82.45
	7	73.70	98.58
	7	51.94	51.25

Условия	Время (д)	Концентрация препарата по ELISA (нМ)	Концентрация препарата по активности (нМ)
	14	9.69	31.96
	14	7.55	72.49
	14	5.35	15.63
	14	6.79	10.38
Модифицированный u-PA (SEQIDNO: 21)	0	1838.69	1838.69
	1	214.47	203.44
	1	222.15	251.46
	1	182.63	183.70
	3	**<LOD**	**6.48**
	3	130.01	110.85
	3	98.91	75.91
	7	21.55	25.24
	7	31.49	19.44

*Графы, выделенные жирным, находятся за пределами определения и/или рассматриваются как выходящие за пределами или исключены

Таблица

День изучения	Модифицированный u-PA-HSAi (ELISA)	Модифицированный u-PA-HSAa (ELISA)	Модифицированный u-PA (ELISA)
1	267.03	314.76	206.42
3	266.81	170.39	114.46
7	129.16	62.80	26.52
14	29.83	7.35	n/a

День изучения	Модифицированный u-PA-HSAi (активность)	Модифицированный u-PA-HSAa (активность)	Модифицированный u-PA (активность)
1	n.d.	388.75	212.86
3	n.d.	302.17	64.41
7	n.d.	97.30	22.34
14	n.d.	32.61	n/a

Тестируемый объект	ELISAрезультаты (t-период полужизни-дни)	Результаты активности(t-период полужизни-дни)
Модифицированный u-PA-HSAi	3.42 (MRT = 5.56)	n.d.
Модифицированный u-PA-HSAa	2.42 (MRT = 3.79)	3.27 (MRT = 4.71)
Модифицированный u-PA (SEQIDNO: 21)	2.01 (MRT = 3.29)	1.95 (MRT = 3.01)

На основе анализов ELISA и активности модифицированный домен протеазы u-PA (содержащий модифицированный полипептид u-PASEQIDNO: 21) имеет период полужизни примерно 2 дней. Слияние с HSA увеличивает время полужизни белка. Активированный модифицированный u-PA-HASa имел время полужизни 2,42 суток и 3,27 дней, как измерено с помощью ELISA и активности, соответственно. Период полужизни увеличивали для u-PA-HSA, подвергнутого протоколу ингибирования с помощью ELISAполужизни 3,42 суток.Таким образом, слияние u-PA с HSA увеличивает время полужизни белка invivo, а слитый белок сохраняет протеазную активность invivo.

Пример 16

Клонирование экспрессия и получение слитых белков u-PA

A. Клонирование слитых полипептидов u-PA

Слитые белки u-PA получали с партнерами слияния на N-конце или C-конце.

1. Примеры слитых белков

Были созданы несколько альтернативных конструкций для экспрессии слитых белков u-PA (описано ниже). Например, были созданы N-концевые слитые белки (см. например, Fig2A).-конструкции, содержащие (от N-конца до C-конца): (1) сигнал секреции (например, мышиный Ig каппа-цепь V-III области (IgGk) (SEQIDNO: 999); (2) партнер слияния (например,, IgG1 Fc (SEQIDNO: 992)); (3) линкер, такой как AGS (SEQIDNO: 1003); к (4) последовательности активации u-PA дикого типа (SEQIDNO: 997; аминокислоты 167-178 SEQIDNO: 1); и (5) модифицированный домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987). Пример N-концевого слитого белка представлен в SEQIDNO: 1004.

Также были созданы C-концевые слитые белки (см. например, фиг. 3). В некоторых примерах конструкции, содержащиеся (от N-конца до C-конца): (1) сигнал секреции (мышиный Ig каппа-цепь V-III области (IgGk) (SEQIDNO: 999); или человеческий интерлейкин -2 (hIL2) (SEQIDNO: 1000)); (2) последовательность активации u-PA дикого типа (SEQIDNO: 997 или 998), последовательность активации фурина (SEQIDNO: 995, 996, или 1041), или последовательность активации NO; (3) модифицированный домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987 или 21) или домен протеазы u-PA дикого типа (SEQIDNO: 2 или 5); (4) линкер (SEQIDNO: 1002 или 1003); и (5) партнер слияния (те IgG1 Fc (SEQIDNO: 992); человеческий сывороточный альбумин (HSA) (SEQIDNO: 991); cFv, который связывается с коллагеном IIm (C2scFv) (SEQIDNO: 993); или домен связывания гиалуроновой кислоты (HABD) (SEQIDNO: 994)). Примеры

С-концевых слитых белков представлены в SEQIDNO: 1006-1010,1012,1013, 1016 и 1040 (см. например, Figs.3A и 3B).

Также были созданы С-концевые слитые белки, содержащие u-PAN-концевую область. Эти конструкции содержат (от N-конца к С-концу): (1) сигнал секреции (мышиный Ig каппа-цепь V-III области (IgGk); SEQIDNO: 999); (2) дикий -N-концевая область u-PA (аминокислоты 21-178 SEQIDNO: 1 или SEQIDNO: 1042); (3) последовательность активации u-PA (SEQIDNO: 997 или 998) или последовательность активации фурина и(SEQIDNO: 995, 996, или 1041); (4) модифицированный u-PA каталитический домен (SEQIDNO: 987 или SEQIDNO: 5, за исключением С122, посредством нумерации химотрипсина или SEQIDNO: 21); (5) линкер (SEQIDNO: 1002 или 1003); и (6) партнер слияния (те IgG1 Fc (SEQIDNO: 992); человеческий сывороточный альбумин (HSA) (SEQIDNO: 991)).

Примеры С-концевых слитых белков представлены в SEQIDNO: 1011, 1014, 1015 и 1036 (см. например, Fig.3C). см. также SEQIDNO: 1010, которая содержит последовательность активации фурина вместо u-PA.

Также были созданы слитые белки, содержащие SUMO на N-конце и партнер слияния на С-конце. Эти конструкции содержат (от N-конца к С-концу): (1) сигнал секреции (мышиный Igkappa цепи V-III области (IgGk) (SEQIDNO: 999)); (2) HIS линкер и SUMO последовательность (SEQIDNO: 990); (3) каталитический домен модифицированного u-PA (SEQIDNO: 987); (4) линкер (SEQIDNO: 1002); и (5) партнер слияния (те, IgG1 Fc (SEQIDNO: 992); или человеческий сывороточный альбумин (HSA) (SEQIDNO: 991)). Примеры С-концевых слитых белков представлены в SEQIDNO: 1016 и 1017.

Полноразмерный белок u-PA, который не был слит с партнером слияния, был сгенерирован в качестве контроля (см. например, Фиг. 2B). и (2) N-концевой домен u-PA (SEQIDNO: 1040; аминокислоты 21-166 SEQIDNO: 1); (3) последовательность активации u-PA (SEQIDNO: 997); и (4) модифицированный

домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987).Пример полноразмерного белка u-PA представлен в SEQIDNO: 1005. Нижеприведенократкоеизложениеконструкций, которыебылисозданы:

5

SEQ ID NO:	**Сигнальная последовательность**	**Партнер слияния**	**Последовательность активации**	**Расположение партнера слияния**	**Протеазный домен u-PA**
1004	IgGκ	IgG1 Fc	u-PA cCys	N-конец	SEQ ID NO: 987
1005	IgGκ	Нет	ПолноразмерныйuPAc/ Cys	Нет партнера слияния	SEQ ID NO: 987
1006	hIL2	IgG1 Fc	Нет	C-конец	SEQ ID NO: 21
1007	hIL2	HAS	Нет	C-конец	SEQ ID NO: 21
1008	hIL2	C2 scFv	Нет	C-конец	SEQ ID NO: 21
1009	hIL2	HABD	Нет	C-конец	SEQ ID NO: 21
1010	IgGκ	IgG1Fc	u-PA фурин с Cys	C-конец	SEQ ID NO: 21
1011	IgGκ	IgG1Fc	Полноразмерный дикого типа uPAc/ Cys	C-конец	SEQ ID NO: 987
1012	hIL2	IgG1 Fc	Нет	C-конец	SEQ ID NO: 5
1013	hIL2	HAS	Нет	C-конец	SEQ ID NO: 5
101	IgGκ	HAS	Фуринс Cys	C-конец	SEQ ID NO:

SEQ ID NO:	Сигнальная последовательность	Партнер слияния	Последовательность активации	Расположение партнера слияния	Протеазный домен u-PA
4					987
1015	IgGκ	HAS	u-PA cCys	C-конец	SEQ ID NO: 987
1016	IgGκ	HAS	Фурин без Cys	C-конец	SEQ ID NO: 21
1017	IgGκ	HAS	SUMO	C-конец	SEQ ID NO: 21
1018	IgGκ	IgG1 Fc	SUMO	C-конец	SEQ ID NO: 21

Контрольный белок имеет последовательность, представленную в SEQIDNO: 1005. Контрольный белок содержит u-PAN-конец (остатки 1-158 SEQIDNO: 3), последовательность активации u-PA дикого типа и домен протеазы u-PA (SEQIDNO: 987), и нет партнера по слиянию. Слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1004, включает в себя партнер слияния (Fc) на N-конце.Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1006-1009, имеют различные партнеры по слиянию на C-конце и лишены N-концевой последовательности активации для модифицированного домена протеазы u-PA.

Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1010 и 1011, содержат Fc на C-конце и активируются по-разному: слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1010, содержит последовательность активации фурина; и слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1011 содержит N-концевую область u-PA и последовательность активации u-PA дикого типа. Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1012 и 1013, являются такими же, как слитые белки, представленные в последовательностях SEQIDNO: 1006 и 1007, соответственно, но имеют домен протеазы u-PA дикого типа вместо модифицированного домена протеазы u-PA.

Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1014-1016, содержат HSA на С-конце и активированы по-разному: слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1014, содержит последовательность активации фурина; слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1015, содержит последовательность активации u-PA дикого типа; и слитый белок, представленный в SEQIDNO: 1016, содержит фуриновую область для активации.

Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1017 и 1018, содержат SUMO в качестве активационного домена на N-конце и HSA или IgG-Fc на С-конце, соответственно. Сайты активации фурина добавляли к слитым белкам, изложенным в последовательностях SEQIDNO: 1010, 1014 и 1016, так что белок может быть активирован во время экспрессии, тем самым исключая потребность в стадии активации в процессе дальнейшей обработки.

2. Создание конструкций

(a) Получение конструкций u-PA

Конструкции собирают из синтетических олигонуклеотидов и/или продуктов PCR и клонируют в вектор pcDNA3.4-TOPO (Invitrogen; CatNoA14697) для экспрессии под контролем незамедлительно-раннего промотора/усилителя цитомегаловируса человека (CMV).

(b) Получение конструкций ofSUMO-u-PA

Для экспрессии слитых белков, содержащих SUMO-метку (представленную в SEQIDNO: 1017 и 1018), ДНК, кодирующую модифицированный полипептид u-PA с C122S (представленной в SEQIDNO: 21), клонировали в кодон-оптимизированный вектор экспрессии pE5 (ThermoScientific; последовательность, представленную в SEQIDNO: 988). Плазмида pE5 содержит сайт множественного клонирования С-конец для последовательности SUMO для клонирования партнера слияния (HSA или Fc) и модифицированного

домена протеазы u-PA.Конечный слитый белок представляет собой (1) партнер слияния (HSA или FC); (2) модифицированный домен протеазы u-PA с C122S (SEQIDNO: 21); с (3) N-концом 6xHis очистной меткой; и (4) SUMO.

B. Получение полипептидов слияния u-PA

Ожидаемые молекулярные массы белков слияния u-PA представлены ниже:

		Ожидаемая молекулярная масса	
Имя	**Ожидаемая молекулярная масса**	**С активацией**	**Без активации**
1004	111,012	Modified u-PA: 28,445.36 Fc: 27,078.73	55506.07
1005	46,389	Modified u-PA: 28,445.36 uPA: 17,961.36	46388.7
1006	108,467	54233.44	
1007	95,286	95285.85	
1008	55,226	55226	
1009	40,297	40297	
1010	111,146	54233.44	55573
1011	144,386	uPA: 17,961.36 Модифицированныйu-PA - Fc: 54,249.50	72192.85
1012	108,461	54230.5	
1013	95,283	95282.91	

1. Трансформация, экспрессия, складывание и рефолдинг слитых белков u-PA

Слитые белки с последовательностями, изложенными в SEQIDNO: 1004-1013, трансформировали и экспрессировали, как подробно описано в примере 14, выше.

2. Трансформация, экспрессия, складывание и рефолдинг белков слияния u-PA-SUMO (убиквитин-подобный модификатор)

Слитые белки с последовательностями, изложенными в SEQIDNO: 1017 и 1018, были получены, как подробно описано ниже.

Клонирование модифицированного SUMO модифицированного полипептида u-PA для экспрессии E. coli

Клетки BL21 Gold (DE3) Ecoli трансформируют со слитый белок u-PA в экспрессионный вектор (SEQIDNO: 988), который получают методом ThermoScientific , используя стандартный способ теплового шока. Плазмидную ДНК ресуспендируют в 50 мкл воды MQ с получением 100 нг/мл исходного раствора. Плазмидную ДНК и клетки BL21 GoldDE3 размораживают на льду. 0,5 мкл ДНК добавляют к 50 мкл клеток в стерильной микроцентрифужной пробирке и инкубируют на льду в течение 30 минут. Смесь клеток/ДНК подвергают тепловому шоку путем выдерживания при 42° С в течение 45 секунд.

Смесь клеток/ДНК немедленно переносят на лед и инкубируют на льду в течение 2 мин. В смесь клеток/ДНК добавляют предварительно подогретую (37° С) среду SOC, а полученную смесь SOC/клетка/ДНК инкубируют при 37° С со встряхиванием. Клетки в SOC (2-200 мл) высевают и помещают на пластины LB-карбенициллина, которые инкубируют в течение ночи при 37° С. Из инкубатора извлекают пластины, содержащие колонии бактерий, уплотняют парапленкой и хранят при 4° С. Получают глицериновые заготовки индивидуальных трансформированных колоний стандартными методами и хранят при -70° С.

С. Оценка экспрессии слитых белков в культуре клеток млекопитающих

Концентрацию белка из супернатанта культуры клеток Expi293 (см. пример 14) оценивали с помощью ELISA и качественно методом вестерн-блоттинга. Экспрессию белка после вестерн-блоттинга оценивали по шкале от 1 до 5, где 1 представляет собой наивысшую экспрессию и 5 представляет собой отсутствие экспрессии.

Для каждой конструкции испытывали шесть образцов. Результаты приведены в таблицах ниже. Результаты показывают, что согласно ELISA и вестерн-блоттингу, слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1004, 1007-1009 и 1013, плохо экспрессируются. Белки, представленные в SEQIDNO: 1005, 1010 и 1011, имели наивысшую экспрессию, оцениваемую качественным вестерн-блоттингом и ELISA.

Таблица: Экспрессия белка по ELISA

Образец SEQ ID	**ELISA титр (мг/л)**	**u-PA ELISA (мг/л)**
1004	0.4	0.4
1005	75.39	149.7
1006	2.2	2.6
1007	0.3	0.3
1008	0.06	0.1
1009	0.26	0.3
1010	15.89	17.3
1011	21.66	19.3
1012	7.5	16.2
1013	5.46	4.7

R squared=0.9993; limit of detection=0.109 ng/mL; limit of quantitation=1.375 ng/mL

R-квадрат = 0,9993; предел обнаружения = 0,109 нг/мл; предел количественного определения = 1,375 нг/мл

Таблица: Экспрессия белка по вестерн-блоттингу	
SEQ ID NO:	**SDS-PAGE / Western Ranking**
1004	4
1005	1
1006	3
1007	3
1008	5
1009	5
1010	1
1011	1
1012	3
1013	4

C. Стратегияактивациислитыхбелков

Для активации u-PA использовали различные стратегии. Белки, представленные в SEQIDNO: 1004-1005, 1011 и 1015, активируются плазмином, как подробно описано выше в примере 14. Белки, представленные в последовательностях SEQIDNO: 1010, 1014 и 1016, предположительно активируются внутриклеточным фурином в процессе экспрессии. Предполагется, что белок, представленный в SEQIDNO: 1006-1008, был автоактивизирован во время экспрессии.

Белки, представленные в SEQIDNO: 1017 и 1018, активируются обработкой протеазой SUMO. Для активации SUMO-u-PA конструкций, как правило, добавляли 10 единиц SUMO протеазы на 1 мг белка и инкубировали в течение ночи при 4° C. Дальнейшая очистка на колонке HisTrap с хелатом никеля эффективно удаляет His-меченый SUMO-фрагмент.

SEQ ID NO:	Последовательность активации	Стратегия активации
1004	uPAwt w/ Cys	Обработка плазмином
1005	ПолноразмерныйuPA w/ Cys	Обработка плазмином
1006	Нет	Расщепление во время экспрессии создает активированную протеазу
1007	Нет	Расщепление во время экспрессии создает активированную протеазу
1008	Нет	Расщепление во время экспрессии создает активированную протеазу
1009	Последовательность активации C3	Последовательность C3 автоактивировала пост-экспрессию
1010	uPA фуринw/o Cys	Активация фурином во время экспрессии; активация не является необходимой во время дальнейшей обработки
1011	ПолноразмерныйWTuPAw/ Cys	Обработка плазмином
1012	Нет	Расщепление во время экспрессии создает активированную протеазу
1013	Нет	Расщепление во время экспрессии создает активированную протеазу
1014	Фуринс Cys	Внутриклеточная активация фурином во время экспрессии; активация не является необходимой во время дальнейшей обработки
1015	uPAcCys	Обработка плазмином
1016	Фурин безCys	Внутриклеточная активация фурином во время экспрессии; активация не является необходимой во время дальнейшей обработки
1017	SUMO	Обработка протеазой SUMO
1018	SUMO	Обработка протеазой SUMO

E. Измерение активности ферментов

Объемную удельную активность супернатантовexpi293 HEK, содержащих слитые белки u-PA на 40 мкМ пептида C3 FRET человека, оценивали, как описано в примере 15. Интерполированную начальную скорость разведения (nMEDANS/мин/мкл образца) рассчитывали. Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1004, 1005, 1008 и 1011-1013, не показали никакой активности. Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1006, 1007, 1009 и 1010, продемонстрировали активность протеазы u-PA. Модифицированный u-PA с фуриновой последовательностью активации N-концевой к u-PA со слиянием с IgFC на C-конце (представленный в SEQIDNO: 1010) показал самую высокую активность. Результаты приведены в таблице ниже.

SEQ ID NO.	**Активность (нMEDANS/мин/мклобразец)**	**Может автоактивироваться**	**Отсутствие активности на мыши C3**
1004	-0.1		
1005	-0.1		
1006	3.7	X	X
1007	3.2	X	X
1008	0.3	X	
1009	2.7	X	
1010	56.0	X	
1011	-0.1		
1012	0.0	X	
1013	0.1	X	

F. Аффинная очистка

Слитые белки, представленные в SEQIDNO: 1010 и 1011, обладали наибольшей экспрессией, оцениваемой вестерн-блоттингом и ELISA. Фурин-вариантный u-PA-Fc и полноразмерные слитые белки uPA-Fc, представленные в SEQIDNO: 1010 и 1011, соответственно, представляют собой белок А, очищенный афинной очисткой, с использованием рекомендованных для производителем условий (GEHealthcare).

G. Очистка и оценка активности высокоэкспрессирующих слитых белков

После аффинной очистки концентрации белка оценивали по поглощению при 280 нм и с помощью ELISAu-PA (см. пример 15), в то время как чистоту оценивали с помощью гель-электрофорезаSDS-PAGE и эксклюзионной хроматографии (SEC), как описано выше в Примере 14. Оба слитых белка экспрессировали.Чистоту, оцениваемую гель-электрофорезом и окрашиванием, и по аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC), считали плохой для слитого белка, последовательность которого представлена в SEQIDNO: 1010 (u-PAфуринw/oCys). Чистоту по гель-электрофорезу считали хорошей для слитого белка, SEQIDNO: 1011 (полноразмерная WTuPAw/Cys). Результаты приведены в таблице ниже:

SEQ ID NO.	**Колонна**	**Полный объем (мл)**	**Концентрация (мг/мл)**		**Полный выход белка (мг)**		**Чистота по гелю**	**Чистота по SEC**
			A280	ELISA	A280	ELISA		
1010	ProA	8.6	4.23	0.60	36.38	5.19	Плохо	Плохо
1011	ProA	13.6	1.69	1.04	22.98	14.09	Хорошо	Плохо

Активность фермента u-PA после аффинной очистки оценивали по анализу пептида C3 FRET человека, как описано выше в примере 15. Результаты приведены в таблице ниже:

SEQ ID NO.	Объемная удельная активность (нмоль/мин/мл)	A280: Удельная активность фермента (нмоль/мин/мг)	A280: Относительная активность ku-PASEQIDNO:21	ELISA: Удельная активность фкрмента (нмоль/мин/мг)	ELISA: ActivityАктивнос относящаяся в протеазному домену варианта PA (SEQIDNO 21
1010	466.81	110.36	2%	773.05	45%
1011	0.10	0.06	0%	0.10	0%

Активность фермента u-PA после аффинной очистки оценивали по анализу пептида C3 FRET человека, как описано выше в примере 15. Активность фермента оценивали после активации плазмина, как описано выше в примере 14. Результатыприведены в таблицениже:

5

SEQ ID NO.	Удельная активность фермента (нмоль/мин/мг)	Относительная активность (нмоль/мин/мг)ku-PASEQIDNO: 21	MW	Удельная активность фермента (нмоль/мин/нмоль)	Относительная активность (нмоль/мин/нмоль) по сравнению с u-PASEQIDNO: 21
21	692	100%	28429	19.7	100%
1011	198	29%	144385	14.3	73%
1015	178	26%	95301	20.2	103%

H. Описание слитых белков с модифицированными полипептидами u-PA, которые расщепляют C3

Ниже описаны слитые белки с полипептидами u-PA. Приведенные в качестве примера последовательности приведены в нижеследующем описании.

1. Каталитические домены

Каталитический домен (домен протеаз) может представлять собой любой из доменов протеаз модифицированных полипептидов u-PA, представленных в настоящем документе (см. пример 2, таблица 14,

где представлены ED50 для доменов протеаз, содержащих различные модификации, как описано в настоящем документе, и в Примерах), в частности, любой с ED50 менее 100 нМ, как описано в примере 2, или менее 50 нМ, 30 нМ или 10 нМ. Примером модифицированного домена протеазы uPA является то, что изложено в SEQIDNO: 21, за исключением того, что при использовании его для активации с получением двухцепочечного полипептида остаток 122 (посредством нумерации химотрипсина) представляет собой C, не S как в SEQIDNO: 21.

Таблица.Протеазные домены модифицированного полипептида uPA:

SEQIDNO: 987:

IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKE
DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEG
RCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLI
SHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMLT
GIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL;

SEQIDNO: 21 протеазный домен модифицированного полипептида uPApolypeptidecодержит мутациюC122S

:IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKE
DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEG
RCAQPSRTIQTISLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLI
SHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLT
GIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL

содержит аминокислотную замену по сравнению с нативнымпротеазнымдоменом полипептида uPASEQIDNO: 2:

IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSL[**I/M**]SPCWVISATHCFIDYP
KKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRS
KEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTV
VKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGR
MTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL;

или по сравнению с протеазным доменом, в котором Св остатке 122 (по нумерации химотрипсина) являетсяSкак в SEQIDNO: 5:

IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCFIDYPKKE
DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEG
RCAQPSRTIQTISLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLI
SHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLT
GIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL.

Как показано в настоящем документе, модифицированные полипептиды u-PA проявляют измененную протеолитическую активность и биохимические свойства по сравнению с нативными полипептидами u-PA, которые модифицированы таким образом, что они обладают повышенной активностью для расщепления C3, как описано в настоящем документе, и имеют пониженную активность для расщепления своего нативного субстрата.

2. Сигналы секреции

Для обеспечения внеклеточной секреции модифицированного полипептида u-PA при экспрессии белка в конструкцию может быть включен сигнал секреции для прямой секреции кодируемого полипептида при экспрессии. Специалистам в данной области техники известно много таких средств.Они включают нативный сигнал u-PA, и другие, такие как сигнал секреции mKLC (SEQIDNO: 999 (METDTLLLWVLLLWVPGSTG)) или сигнал секреции IL2 человека (SEQIDNO: 1000 (MYRMQLLSCIALSLALVTNS), и другие, приведенные в качестве примеров в данном документе. Последовательности сигналов, как

правило, встречаются на N-конце полипептида для прямой секреции; они удаляются клеткой-хозяином.

3. Партнеры по слтянию

В дополнение к замене аминокислоты, инсерции или делеции дополнительные модификации могут быть добавлены к полипептиду uPA для создания слитого или химерного белка. Многочисленные партнеры по слиянию и их свойства известны специалистам в данной области техники. Они включают, например, партнеры по слиянию, которые могут мультимеризоваться, те, которые могут увеличивать время полужизни в сыворотке, и те, которые изменяют связывающие свойства или целевой полипептид.Например, модифицированные и нативные полипептиды uPA могут быть связаны с фрагментом антитела или доменом мультимеризации, таким как Fc-область антитела полипептида иммуноглобулинаIgG1 (SEQIDNO: 992
(DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG)) илиКоллагенIIscFv(SEQIDNO: 993
(QVQLQQPGADLVRPGVSVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIG
MIHPSDSETRLSQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARLKPG
GTWFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGSDIVLTQSPASLTVSLG
QRATISCRASKSVDSYGNSFMEWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGS
GSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIK)) для изменения фармакологических свойств полипептидов u-PA.

Для изменения фармакологических свойств полипептиды uPA, например, могут быть слиты с лигандом или полипептидом, таким как антитело или другой белок, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA; SEQIDNO: 991):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVT
EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER

NECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCAS
LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC
ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA
ADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTL
EKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV
RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI
CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK
ETCFAEEGKKLVAASQAALGL), или связывающий домен гилауроновой кислоты (HABD), такой какTSG-6 (SEQIDNO: 994)
ERAAGVYHREARSGKYKLTYAEAKAVCEFEGGHLATYKQLEAARKIGFHVC
AAGWMAKGRVGYPIVKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYCYNPHAK
E .

Как правило, протеаза u-PA остается функционально активной внутри полученного слитого белка, но слитый пептид может изменять фармакокинетические и фармакодинамические параметры полипептида u-PA. Другие слитые белки, содержащие модифицированный u-PA полипептид, могут быть созданы с фактором роста или рецептором для изменения фармакокинетических и фармакодинамических свойств.

4. Последовательности активации

Полипептид u-PA может быть получен в неактивной форме (зимоген) и модифицирован посттрансляционным путем протеолитического расщепления для создания зрелой и активированной формы. Для этого включают последовательность активации на нативный или модифицированный полипептид u-PA для подавления его ферментативной активности. После экспрессии белка распад последовательности активации продуцирует зрелый белок u-PA.

Примеры последовательностей активаций включают, но не ограничиваются ими, последовательность активации u-PA дикого типа (SEQIDNO: 997 (QCGQKTLRPRFK) или SEQIDNO: 998 (QSGQKTLRPRFK)) или последовательность расщепления фурина (SEQIDNOS: 995, 996, 1041 или 1044 (такая как QCGQKTLRRRKR, или QSGQKTLRRRKR, или QSGKTLRRKR, или QSGQKTLRRKR).Дисульфидная связь может поддерживаться между цистеином в последовательности активации и цистеином (C122 по нумерации химотрипсина) в каталитическом домене u-PA. При расщеплении сайта активации активированная молекула сохраняет ковалентную связь между N-концевым фрагментом активации или полным N-концевым доменом.

5. Линкеры

Для соединения полипептида u-PA с другими полипептидными последовательностями используют короткую, гибкую последовательность аминокислот (линкер). Примеры линкеров включают, но не ограничиваются ими, GGSSGG или GGGGS или AGS (такие как те, которые представлены в SEQIDNOS: 1001-1003 и 1024-1030), а также описанные в подробном описании. Более длинные связи с конкатенациями этих последовательностей повторяются также так, что линкер имеет последовательность (GGSSGG) n +1, где n равно 0 или целое число от 1 до 20.Другие линкеры представлены в перечне последовательностей и в подробном описании.

6. Другие модификации ofu-PA

Другие пептидные последовательности, такие как 6xHisSUMO (такие как те, которые представлены в SEQIDNOS: 990, и 1031-1033 (DGHHHHHHGSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTT PLRRLMEAFAKRQGKEMDSL(**T/R**) FLYDGI (**E/R**) IQADQ (**T/A**)PEDLDMEDNDIIEAHREQIGG)) могут быть добавлены для облегчения экспрессии, секреции или очистки полипептидов u-PA. Дополнительная химическая и посттрансляционная модификация измененного или нативного

полипептида u-PA может включать в себя, но не только, конъюгацию с полимером, такую как ПЭГилирование, и сиалирование для изменения фармакодинамических свойств полипептида u-PA.

7. Примеры модифицированных полипептидов u-PApolypeptidesc N-концевымислияниями

Seq ID No.	Название	Сигнал последовательности (номера остатков)	Партнер слияния (номера остатков)	Линкер(номера остатков)	Последовательностьактивации (номера остатков)	Каталитический домен (номера остатков)	ДругиеNконцевые домены (номера остатков)
1004	Fc-u-PA (SEQ ID NO: 987)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH	AGS (247-249)	QCGQKTLRPRFK (250-261)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTK	

Seq ID No.	Название	Сигнал последовательности (номера остатков)	Партнер слияния (номера остатков)	Линкер(номера остатков)	Последовательностьактивации (номера остатков)	Каталитический домен (номера остатков)	ДругиеNконцевые домены (номера остатков)
			QDWLN GKEYK CKVSN KALPA PIEKTIS KAK GQPREP QVYT LPPSRD ELTK NQVSLT CLVK GFYPSD IAVE WESNG QPENN YKTTPP VLDS DGSFFL YSKL TVDKS RWQQG NVFSCS			MLCAADPQW KTDSCQGDSG GPLVCSLQGR MTLTGIVSWG RGCALKDKPG VYTRVSHFLP WIRSHTKEEN GLAL (262-514)	

Seq ID No.	Название	Сигнал последовательности (номера остатков)	Партнер слияния (номера остатков)	Линкер(номера остатков)	Последовательностьактивации (номера остатков)	Каталитический домен (номера остатков)	ДругиеN концевые домены (номера остатков)
			VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (21-240)				
1005	N-конец u-PA-u-PA (SEQ ID NO: 987)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	-	-	QCGQKTLRPRFK (167-178)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHY	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLPWNSATVLQQTYHAHR

Seq ID No.	Название	Сигнал последовательности (номера остатков)	Партнер слияния (номера остатков)	Линкер(номера остатков)	Последовательностьактивации (номера остатков)	Каталитический домен (номера остатков)	ДругиеNконцевые домены (номера остатков)
						YGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL **179-431**	SDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGKKPSSPPEELKF 21-166

* u-PAпротеазный доменSEQIDNO:21 (с и без замены C122S)

На фигуре 2 представлено схематическое изображение полипептидов u-PA с N-концевыми слияниями, такими как N-концевые слитые полипептиды, представленные в SEQIDNO: 1004 и 1005.

8. Примеры модифицированных полипептидови-PAc С-концевыми слияниями

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
1006	uPA (SEQ ID NO: 21) - Fc (No PP)	MYRMQLSCI ALSLALV TNS (1-20)	IIGGEFTT IENQPWF AAIYQRY EGGSEYY RCGGSLI SPCWVIS ATHCFIP QPKKED YIVYLGR SRLNSNT QGEMKF EVENLIL HKDYSA D IAAQHND IAL LKIRSKE GRCAQPS RTIQTISL PSMYNDP QFGTSCE	GGS SGG (274-279)	Нет	DKTHTCPP CPAPELLG GPSVFLFPP KPKDTL MISRTPEV TCVVVDVS HEDP EVKFNWY VDG VEVHNAK TKPREEQY NSTYR VVSVLTVL HQ DWLNGKE YKCKVSN KALPAP IEKTISKAK G QPREPQVY TLPPSRDE	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			ITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENG LAL (21-273)			LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG (280-505)	
1007	uPA (SEQ ID	MYRMQLLSCIALSLALV	IIGGEFTTIENQPWFA	GGSSGG (274-	Нет	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALV	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
	NO: 21)-HSA (NoPP)	TNS (1-20)	AIYQ RYEGGSE YYR CGGSLISP CW VISATHC FIP QPKKED YIVY LGRSRLN SNT QGEMKF EVEN LILHKDY SAD IAAQHND IAL LKIRSKE GRC AQPSRTI QTI SLPSMYN DPQ	279)		LIAFAQYL QQCPFEDH VKLVNEVT EFAKTCVA DESAENCD KSLHTLFG DKLCTVAT LRETYGEM ADCCAKQ EPERNECF LQHKDDN PNLPRLVR PEVDVMC TAFHDNEE TFLKKYLY EIARRHPY FYAPELLF FAKRYKA AFTECCQA ADKAACL LPKLDELR DEGKASSA KQRLKCAS	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			FGTSCEITGF GKENSTDRLY PEQLKMTVVK LISHRECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGR GCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKENG LAL			LQKFGERAFK AWAVARLSQR FPKAEFAEVS KLVTDLTKVH TECCHGDLLE CADDRADLAK YICENQDSIS SKLKECCEKP LLEKSHCIAE VENDEMPADL PSLAADFVES KDVCKNYAEA KDVFLGMFLY EYARRHPDY SVVLLLRLAK TYETTLEKCC AAADPHECYA K	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			(21-273)			VFDEFKPL VEEPQNLI KQNCELFE QLGEYKFQ NALLVRY TKKVPQVS TP TLVEVSRN LGKVGSKC CKHPEAKR MPCAED YLSVVLNQ LCVLHEKT PVSD RVTKCCTE SL VNRRPCFS ALEVDETY VPKEFNAE TFTFHA DICTLSEKE RQIKKQTA LVELVKHK	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						PKATKEQL KAVMDDF AAFVEKCC KADDKET CFAEEGKK LVAASQA ALGL (280-864)	
1008	uPA (SEQ ID NO: 21)-C2scFv (NoPP)	MYRMQ LLSCI ALSLAL VTNS (1-20)	IIGGEFTT IE NQPWFA AIYQ RYEGGSE YYR CGGSLISP CW VISATHC FIPQPKK EDYIVYL GRSRLNS NTQGEM KFEVENL	GGS SGG (274-279)	None	QVQLQQP GADLVRPG VSVKLS CKASGYTF TS YWMNWV KQRPGQGL EWIGMI HPSDSETR LS QKFKDKA TLTVDKSS STAYMQLS SPTSEDS	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			ILHKDYS ADIAAQH NDIALLK IRSKEGR CAQPSRT IQTI SLPSMYN DPQ FGTSCEIT GFGKENS TDRLYPE QLKMTV VKLISHR ECQQPHY YGSEVTT KMLCAA DPQWKT DSCQGDS GGPLVCS LQGRMT LTGIVSW GRGCAL KDKPGV			AVYYCAR LKPGGTWF AYWGQ GTLVTVSA GG GGSGGGGS GGGGSGGS DIVLTQSP ASLTVS LGQRATIS CRASKSVD SYGN SFMEWYQ QKP GQPPKLLI YRASNLES GIPARFSGS GSRTD FTLTINPVE ADDVATY YCQQ SNEDPYTF GG	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			YTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL (21-273)			GTKLEIK (280-527)	
1009	uPA (SEQ ID NO: 21)-HABD (NoPP)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSAD IAAQHNDIALLKIRSKEGRC	GGSSGG (274-279)	None	E RAAGVYHREA RSGKYKLTYA EAKAVCEFEG GHLATYKQLE AARKIGFHVC AAGWMAKGRV GYPIVKPGPN CGFGKTGIID YGIRLNRS	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			AQPSRTIQTI SLPSMYNDPQ FGTSCEITGF GKENSTDRLY PEQLKMTVVK LISHRECQQP HYYGSEVTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGR GCALKDKPGV			ER WDAYCYNPHA KE (280-382)	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			YTRVSHFLPW IRSHTKEENG LAL (21-273)				
1010	uPA (SEQ ID NO: 21)-Fc (Furin)	METDTLLLWV LLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRY EGGSEYYRCGGSLISPCWVIS ATHCFIPQPKKED YIVYLGRSRLNSNT QGEMKFEVENLIL HKDYSADIAAQHN DIALLKIRSKEGRCA QPSRTIQTISLPSM	GGSSGG (285-290)	QSGQKTLRRK R (21-31)	DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			YNDPQFG TSCEITGF GKENSTD RLYPEQL KMTVVK LISHREC QQPHYY GSEVTTK MLCAAD PQWKTD SCQGDSG GPLVCSL QGRMTL TGIVSWG RGCALK DKPG VYTRVSH FLP WIRSHTK EEN GLAL (32-284)			QDWLNGK EYK CKVSNKAL PA PIEKTISKA K GQPREPQV YT LPPSRDEL TK NQVSLTCL VK GFYPSDIA VE WESNGQPE NN YKTTPPVL DS DGSFFLYS KL TVDKSRW QQG NVFSCSVM	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						HE ALHNHYT QKS LSLSPG (291-516)	
1011	uPAN-Term-uPA (SEQ ID NO: 987) - Fc	METDT LLLWV LLLWV PGSTG (1-20)	IIGGEFTT IENQ PWFAAIY QRYEGGS EYYRCG GSLISPC WVISATH CFIPQPK KEDYIVY LGRSRLN SNTQGE MKFEVE NLILHKD YSADIAA QHNDIAL LK IRSKEGR CAQ	GGS SGG (432-437)	QCGQ KTLR PRFK (167-178)	DKTHTCPP CP APELLGGP SV FLFPPKPK DT LMISRTPE VT CVVVDVS HED PEVKFNW YVD GVEVHNA KTK PREEQYNS TY RVVSVLTV LH	SNELHQV PSNCDCL NGGTCVS NKYFSNIH W CNCPKKF GGQHCEI DKSKTCY EGNGHFY RG KASTDTM GRPCLPW NSATVLQ QTYHAHR SD ALQLGLG KHNYCRN PDNRRRP

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			PSRTIQTI CLPSMYN DPQFGTS CEITGFG KENSTDR LYPEQLK MTVVKLI SHRECQQ PHYYGSE VTTKML CAADPQ WKTDSC QGDSGGP LVCSLQG RMTLTGI VSWGRG CALKDKP GVYTRVS HFLPWIR SHTKEEN GLA L (179-431)			QDWLNGK EYK CKVSNKAL PA PIEKTISKA K GQPREPQV YT LPPSRDEL TK NQVSLTCL VK GFYPSDIA VE WESNGQPE NN YKTTPPVL DS DGSFFLYS KL TVDKSRW QQG NVFSCSVM	WCYVQV GLKPLVQ ECMVHD CADGKKP SSP PEELKF (21-166)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						HE ALHNHYT QKS LSLSPG (438-663)	
1012	WT uPA with C12 2S-Fc (No PP)	MYRMQ LLSCIA LSLALV TNS (1-20)	IIGGEFTT IENQPWF AAIYRRH RGGSVTY VCGGSL MSPCWVI SATHCFI DYPKKE DYIVYLG RSRLNSN TQGEMK FEVENLI LHKDYS ADTLAH HNDIAL LKIRSKE GRCAQPS RTIQTISL	GGS SGG (274-279)	None	DKTHTCPP CPAPELLG GPSV FLFPPKPK DT LMISRTPE VTCVVVD VSHED PEVKFNW YVD GVEVHNA KTKPREEQ YNSTY RVVSVLTV LH QDWLNGK EYKCKVSN KALPAPIE	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			PSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENG LAL (21-273)			KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (280-505)	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
1013	WT uPA with C122S - HSA (No PP)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHRGGSVTYVCGGSLMSPCWVISATHCFIDYPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTI	GGSSGG (274-279)	None	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFF	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			SLPSMYNDPQFGTSCEITGF GKENSTDYLY PEQLKMTVVKLISH RECQQPHYYGSE VTTK MLCAADPQWK TDSCQGDSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGRGCA LKDKPGV YTRVSHFLPW			AKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQ RLKCASLQKFGERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLEC ADDRADL AKYICENQDSISSKLKE CCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADF VESKDVCKNYAEAKD	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			IRSHTKEENG LAL (21-273)			VFLGMFL YEYARRHP DYSVVLLL RLAKTYET TLEKCCAA ADPHECYA KVFDEFKP LVEEPQNL IKQNCELF EQLGEY KFQNALLV RY TKKVPQVS TPTLVEVS RNLGKVGS KCCKHPEA KRMPCAE DYLSVVLN QLCVLHEK TPVSDRVT KCCTESLV NRRPCFSA LEVDETYV	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						PKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (280-864)	
1036	uPAN-term-uPA (SEQ ID NO: 987)-Fc	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVY	GGSSGG (432-437)	QCGQKTLRRRKR (167-178)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD	SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYFSNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKTCYEGNGHFYRGKASTDTMGR

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
	(Furin)		LGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVS			GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS	PCLPWNSATVLQQTYHAHRSDALQLGLGKHNYCRNPDNRRRPWCYVQVGLKPLVQECMVHDCADGKKPSSPPEELKF (21-166)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			WGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLA L (179-431)			LSLSPG (438-663)	
1014	uPAN-term-uPA (SEQ ID NO: 987)-HSA (Furin)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQP KKEDYIVYLGRSRL NSNTQG EMKFEVENLI LHKDYS	GGSSGG (432-437)	QCGQKTLRRRKR (167-178)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKA LVLIAFAQYL QQCPFEDHVKLVNEVTEFAK TCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG EMADCC AKQEPERN ECFLQHKD	SNELHQVPSNCDCL NGGTCVS NKYFSNIH WCNCPKK FGGQ HCEIDKSK TCYEGNG HFYRGKA STDTMGR PCLPWNS ATVL QQTYHAH RSDALQL GLGKHNY CRNPDNR

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			ADIA AQHNDIA LLK IRSKEGR CAQ PSRTIQTI CLPSMYN DPQFG TSCEITGF GK ENSTDRL YPE QLKMTV VKLI SHRECQQ PHY YGSEVTT KMLCAA DPQWKT D SCQGDSG GPL VCSLQGR			DNPN LPRLVRPE VD VMCTAFH DNEETFLK KYLYEIAR RHPYFYA PELLFFAK RYKAAFTE CCQA ADKAACL LPK LDELRDEG KASSAKQR LKCASLQK FGERAF KAWAVAR LSQRFPKA EFAEV SKLVTDLT KV HTECCHGD LLECADDR	RRPWCYV QVGLK PLVQECM VHDCADG KKPSSPPE ELKF (21-166)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			MTL TGIVSWG RGC ALKDKP GVYT RVSHFLP WIRSHTK EENGLA L (179-431)			ADLAKYIC ENQDSI SSKLKECC EKPLLEKS HCIA EVENDEMP AD LPSLAADF VESKDVCK NYAEAKD VFLGMFL YEYARRHP DYSVVLLL RLAK TYETTLEK CC AAADPHEC YAKVFDEF KPLVEEPQ NLIKQN CELFEQLG EYKFQNAL LVRY	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						TKKVPQVSTP TLVEVSRN LGKVGSKC CKHPEAKR MPCAED YLSVVLNQ LCVLHEKT PVSD RVTKCCTE SL VNRRPCFS ALEVDETY VPKEFNAE TFTFHA DICTLSEKE RQIKKQTA LVE LVKHKPK ATK EQLKAVM DDFAAFVE KCCKADD	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						KETCFAEEGKKLVAASQA ALGL (438-1022)	
1015	uPAN-term-uPA (SEQ ID NO: 987)-HSA	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQP KKEDYIVYLGRSRL NSNTQG EMKFEVENLI	GGSSGG (432-437)	QCGQKTLRPRFK (167-178)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLR ETYGEMADCCAKQEPERNEC FLQHKDD	SNELHQVPSN CDCLNGGTCV SNKYFSNIHW CNCPKKFGGQ HCEIDKSKTC YEGNGHFYRG KASTDTMGRP CLPWNSA

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			LHKDYSADIA AQHNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTICLPSMYN DPQFG TSCEITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTTKMLCAA DPQWKTD SCQGDSGGPL			NPN LPRLVRPE VDVMCTA FHDNE ETFLKKYL YE IARRHPYF YAPELLFF AKRY KAAFTECC QA ADKAACL LPKLDELR DEGKA SSAKQRLK CA SLQKFGER AFKAWAV ARLSQ RFPKAEFA EV SKLVTDLT KVHTECCH	TVL QQTYHAH RSD ALQLGLG KHN YCRNPDN RRR PWCYVQV GLK PLVQECM VHD CADGKKP SSP PEELKF (21-166)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC ALKDKPGVYT RVSHFLPWIR SHTKEENGLA L 179-431			GDLL ECADDRADLA KYICENQDSI SSKLKECCEK PLLEKSHCIA EVENDEMPAD LPSLAADFVE SKDVCKNYAE AKDVFLGMFL YEYARRHPDY SVVLLLRLAK TYETTLEKCC AAADPHECYA KVFDEFKPLV EEPQNLIKQN CELF	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						EQLGEYKF QNALLVR YTKKVPQ VSTPTLVE VSRNLGKV GSKCCKHP EAKRMPC AED YLSVVLNQ LCVLHEKT PVSD RVTKCCTE SL VNRRPCFS ALEVDETY VPKEFNAE TFTFHA DICTLSEKE RQIKKQTA LVELVKHK PKATKEQL KAVMDDF AAFVEKCC	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (438-1022)	
1016	uPA (SEQ ID NO: 21)-HSA (Furin)	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIV	GGSSGG (286-291)	QSGQKTLRRKR (21-32)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLR ETYGEMA	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			YLGRSRL NSN TQGEMK FEVE NLILHKD YSADIAA QHNDIA LLKIRSK EGRCAQP SRTIQT ISLPSMY NDP QFGTSCE ITG FGKENST DRL YPEQLK MTVV KLISHRE CQQ PHYYGSE VTT KMLCAA			DCCAKQEP ERNEC FLQHKDD NPN LPRLVRPE VDVMCTA FHDNE ETFLKKYL YE IARRHPYF YAPELLFF AKRYKAA FTECCQAA DKAACLLP KLDELRDE GKASSAKQ RLKCASLQ KFGERAF KAWAVAR LSQ RFPKAEFA EVSKLVTD LTKVHTEC	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			DPQW KTDSCQG DSGGPLV CSLQGR MTLTGIV SWG RGCALK DKPG VYTRVSH FLP WIRSHTK EEN GLAL **33-285**			CHGDLLEC ADDRADL AKYICENQ DSISSKLKE CCEKPLLE KSHCIA EVENDEMP AD LPSLAADF VESKDVCK NYAEAKD VFLGMFL YEYARRHP DYSVVLLL RLAKTYET TLEKCCAA ADPHECYA KVFDEFKP LVEEPQNL IKQNCELF EQLGEY KFQNALLV RY	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						TKKVPQVS TPTLVEVS RNLG KVGSKCC KHP EAKRMPC AEDYLSVV LNQLC VLHEKTPV SD RVTKCCTE SLVNRRPC FSALEVDE TYVPKEFN AETFTFHA DICTLSEKE RQIKKQTA LVELVKHK PKATKEQL KAVMDDF AAFVEKCC KADDKET CFAEE	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						GKKLVAASQAALGL (292-876)	
1017	SUMO-uPA (SEQ ID NO: 21)-HSA	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIV	GGSSGG (382-387)	-	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMA	DGHHHHHHGSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLTFLYDGIEIQ

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			YLGRSRLNSN TQGEMKFEVE NLILHKDYSA DIAAQHNDIA LLKIRSKEGR CAQPSRTIQT ISLPSMYNDP QFGTSCEITG FGKENSTDRL YPEQLKMTVV KLISHRECQQ PHYYGSEVTT KMLCAA			DCCAKQEPERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEI ARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTECCQAAD KAACLLPKLDELRDEG KASSAKQRLK CASLQKFGERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTD LTKV	ADQTPEDLDMEDNDII AHREQIGG (21-128)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			DPQW KTDSCQG DSG GPLVCSL QGR MTLTGIV SWG RGCALK DKPG VYTRVSH FLP WIRSHTK EEN GLAL (129-381)			HTECCHGD LL ECADDRA DLAKYICE NQDSI SSKLKECC EK PLLEKSHCI AEVENDE MPAD LPSLAADF VE SKDVCKN YAEAKDV FLGMFL YEYARRHP DY SVVLLLRL AKTYETTL EKCCAAA DPHECYAK VFDEFKPL VEEPQNLI	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						KQNCELFE QLGEYKFQ NALLVRY TKKVPQVS TP TLVEVSRN LGKVGSKC CKHPEAKR MPCAED YLSVVLNQ LCVLHEKT PVSD RVTKCCTE SL VNRRPCFS ALEVDETY VPKEFNAE TFTFHA DICTLSEKE RQIKKQTA LVELVKHK PKATKEQL KAVMDDF	

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
						AAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (388-972)	
1018	SUMO-uPA (SEQ ID NO: 21)-Fc	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (1-20)	IIGGEFTTIENQPWFAAIYQRYEGGSEYYRCGGSLISPCWVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMK	GGSSGG (382-387)	-	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL	DGHHHHHHGSLQDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLTFLYDGIEIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			FEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTISLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSCQGDSG			PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(388-613)	(21-128)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			GPLVCSLQGR MTLTGIVSWG RGCALKDKPG VYTRVSHFLP WIRSHTKEEN GLAL (129-381)				
1037	6xHis-sumo-uPA (SEQ ID NO: 987)	-	II GGEFTTIENQ PWFAAIYQRY EGGSEYYRCG GSLISPCWVI SATHCFIPQPK KEDYIVY		-		MGHHHHHHHS LQDSEVNQEA KPEVKPEVKP ETHINLKVSD GSSEIFFKIK KTTPLRRLME AFAKRQGKEM DSLRFLYDGI

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			LGRSRLN SNTQGE MKFEVE NLILHKD YSADIAA QHNDIAL LKIRSKE GRCAQPS RTIQTICL PSMYNDP QFGTSCE ITGFGK ENSTDRL YPE QLKMTV VKLI SHRECQQ PHY YGSEVTT KML CAADPQ WKTDSC QGDSGGP				RIQADQA PEDLDME DNDIIEAH REQIGG (1-108)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			L VCSLQGR MTL TGIVSWG RGC ALKDKP GVYT RVSHFLP WIR SHTKEEN GLA L (109-361)				
1038	6xHis sumo-uPA (SEQ ID NO: 21)	-	II GGEFTTI ENQ PWFAAIY QRY EGGSEYY RCG GSLISPC WVI SATHCFIP QP		-		MGHHHH HHGSLQD SEVNQEA KPEVKPE VKPETHIN LKVSDGS SEIFFKIK KTTPLRRL MEAFAKR QGKEMDS LRFLYDGI

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			KKEDYIVYLG RSRLNSNTQGEMK FEVENLILHKDYS ADIA AQHNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTISL PSMYNDPQFGTSCE ITGFGK ENSTDRLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY YGSEVTT				RIQADQAPEDLDME DNDIIEAH REQIGG (1-108)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			KML CAADPQ WKTDSC QGDSGGP L VCSLQGR MTL TGIVSWG RGC ALKDKP GVYT RVSHFLP WIR SHTKEEN GLAL (109-361)				
1039	6xHis sum-uPA (SEQ ID NO:	-	II GGEFTTI ENQ PWFAAIY QRYEGGS EYYRCG GSLISPC		-	GGSCK (362-366)	MGHHHH HHGSLQD SEVNQEA KPEVKPE VKPETHIN LKVSDGS SEIFFKIK

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
	21)-GGSCK		WVISATHCFIPQPKKEDYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEVENLILHKDYSADIAAQHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTISLPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDRLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLCAADPQWKTDSC				KTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLRFLYDGIRIQADQAPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG (1-108)

SEQ ID No.	Название	Сигнальная последовательность (номера остатков.)	Каталитический домен	Линкер (номера остатков)	Последовательность активации	Партнер слияния	Другие Nконцевые домены
			QGDSGGPLVCSLQGRMTLTGIVSWGRGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLAL (109-361)				

На рис. 3 представлено схематическое изображение полипептидов u-PA с С-концевыми слияниями, такими как С-концевые слитые полипептиды, представленные в SEQIDNOS: 1006-1018 и 1036.

I. Анализы для оценки количества u-PA и активности комплемента u-PA

Слитые полипептиды были получены после трансфекции вектора pcDNA3_4, кодирующего измененный и нативный слитый полипептид u-PA в системе экспрессии млекопитающих в клетках Expi293 ™.Полипептиды u-PA, которые правильно экспрессированы в клетках Expi293 ™, очищали на HiTrapProteinaHP или Carreselect ™ Human AlbuminAffinityMatrix и

обрабатывали для биоаналитических анализов, таких как u-PAELISA, чтобы исследовать титры uPA или протеолитическое расщепление C3 FRET для исследования каталитической активности u-PA. Результаты приведены в таблице ниже:

SEQ ID NO:	A280	Полное количество белка из культуры 1L	uPA ELISA титр (мг/л)	uPA ELISA титр (мг/л)	Протеолитическая активность наC3 относительноA280	Протеолитическая активность на C3 относительно uPAELISAтитра
1004			0.4	0.4		
1005			149.7	75.39		
1006			2.6	2.2		
1007			0.3	0.3		
1008			0.1	0.06		
1009			0.3	0.26		
1010	4.23 мг/мл	36.4 мг	17.3	15.89	110.36	773.05
1011	1.69 мг/мл	23.0 мг	19.3	21.66	0.06	0.1
1012			16.2	7.5		
1013			4.7	5.46		
1036	3.32 мг/мл	42.5 мг				
1014						
1015u	3.43 мг/мл	70.3 мг				

SEQ ID NO:	A280	Полное количество белка из культуры 1L	uPA ELISA титр (мг/л)	uPA ELISA титр (мг/л)	Протеолитическая активность наС3 относительноА280	Протеолитическая активность на С3 относительно uPAELISAтитра
1015a	1.16 мг/мл	44.7 мг				
1015i						
1016						
1017	3.32 мг/мл	89.3 мг				
1018	1.10 мг/мл	11 мг				

1. Уровни u-PA ELISA

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) используют для измерения присутствия полипептидов u-PA (см. например, пример 15). Обычно измерение u-PA представляет собой косвенную меру связывания u-PA с захватывающим антителом (PA1-36166 при 1,0 мкг/мл, Invitrogen). Затем детектируют захваченный полипептид u-PA с детектирующим антителом (PA1-36015 при 0,25 мкг/мл), который распознают конъюгированным с HRP козьим антителом (Rockland, 605-403-B69).Фермент HRP инициирует колориметрическую реакцию при добавлении субстрата TMB. С использованием метода ELISAu-PA были идентифицированы четыре полипептида u-PA при экспрессии при высоких уровнях титра uPA (SEQIDNOS: 1005,1010,1011, 1012, 1015), два полипептида u-PA при титрах среды (SEQIDNOS: 1006 и 1013), и полипептиды u-PA, представленные в SEQIDNO: 1004, 1007-1009, не экспрессировали.

2. Ферментная активность (человеческий пептид C3 FRET).

Протеолитическую активность полипептидов uPA на C3 человека измеряли invitro с использованием пептида C3 FRET человека RHQARASHIEDANS/DABCYL, продуцируемого Genscript (lot # 94045990005/PE6379) (см. например, пример 15). N-концевая сторона пептида маркирована флуорофоромDABCYL, а C-концевая сторона обозначена флуорофоромEDANS. Расщепление пептида разделяет пару EDANS/DABCYLFRET и генерируют флуоресцентный сигнал, который измеряют в многоскважинном планшетном считывателе.

Скорость генерации интенсивности флуоресценции интерполируют по стандартной кривой EDANS с получением скорости выработки продукта EDANS. Скорость генерации продукта умножают на коэффициент разбавления для получения объемной удельной активности в единицах нмоль продукта в минуту реакции на мл пробы (нмоль/мин/мл).Объемная удельная активность указывает на общее количество активного фермента в образце.

Вторую удельную активность рассчитывают путем деления объемной удельной активности на концентрацию фермента пробы с получением удельной активности фермента в единицах нмоль продукта в минуту реакции на мг фермента (нмоль/мин/мг). Удельная активность фермента указывает на собственную активность полипептидов uPA в образце независимо от концентрации.С использованием анализа активности FRET человека показано, что полипептид uPA, представленный в SEQIDNO: 1010, является активным.

* * *

Так как модификации будут очевидны специалистам в данной области техники, предполагается, что данное изобретение ограничено только объемом прилагаемой формулы изобретения.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Модифицированный полипептид плазминогенаурокиназного типа (u-PA), содержащий одну или несколько модификаций аминокислот, выбранных из замен, соответствующих R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI и H99Q, и их консервативные аминокислотные модификации, при этом модифицированный полипептид u-PA обладает повышенной активностью/специфичностью для белка комплемента по сравнению с немодифицированной активной формой полипептида u-PA, где:

модификации аминокислот выбраны из замен, инсерций и делеций в первичной последовательности модифицированного полипептида u-PA;
модифицированный полипептид u-PA расщепляет белок комплемента, чтобы тем самым ингибировать или уменьшать активацию комплемента по сравнению с немодифицированным полипептидом u-PA, который не содержит аминокислотных модификаций;

остатки пронумерованы согласно нумерации химотрипсина;

немодифицированный полипептид u-PA содержит последовательность, представленную в любой из SEQIDNO: 1-6, которая представляет полноразмерную дикого типа (WT) u-PA, WTпротеазный домен u-PA, WT зрелуюu-PA, полноразмерную u-PA с C122S, по нумерации химотрипсина, домен протеазы u-PA с C122S, зрелый u-PA с C122S, или его каталитически активный фрагмент, включающий аминокислотную замену (ы); а консервативные модификации выбирают из R35Y, W, F или N; H37R, Q, E, W или F; V41K; D60aS; T97aD, L или V; L97bG или S и H99N.

2. Модифицированный полипептид u-PA по п.1, содержащий одну или более модификаций аминокислот, выбранных из замен, соответствующих R35Q, H37Y, V41R, V41L, Y40Q, D60aP, L97bA, T97aI и H99Q.

3. Модифицированный полипептид u-PA по п. 1 или 2, в котором модифицированный полипептид u-PA обладает сниженной активностью или

специфичностью для расщепления последовательности субстрата в плазминогене.

4. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-3, в котором белок комплемента является C3.

5. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-4, который обладает повышенной активностью для расщепления C3, которыая по меньшей мере в 3 раза больше, чем для немодифицированного полипептида u-PA, содержащего домен протеазы SEQIDNO: 5, или соответствующую форму u-PA, представленную в любой из SEQIDNO: 1-4 и 6.

6. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-5, в котором немодифицированный полипептид u-PA состоит из последовательности аминокислот, представленных в любой из SEQIDNO: 1-6.

7. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-6, где немодифицированный полипептид u-PA состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQIDNO: 2 или SEQIDNO: 5.

8. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-5 и 7, где модифицированный полипептид u-PA имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с полипептидами любой из SEQIDNO 1-6 (WT полноразмерный u-PA, WT протезный домен u-PA, WT зрелый u-PA, полноразмерный u-PA с C122S, домен протеазы u-PA с C122S, зрелый u-PA с C122S) или его каталитически активный фрагмент.

9. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-5 и 7, где модифицированный полипептид u-PA имеет 1 или до 2,3,4, 5,6,7, 8,9,10, 11,12,13, 14 или 15 аминокислотных замен, инсерций или делеций по сравнению с немодифицированным полипептидом u-PA любой из SEQIDNO: 1-6 или его каталитически активной частью.

10. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-9, содержащий замену V41R.

11. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-9, содержащий замену V41L.

12. Модифицированный полипептид u-PA по п.10 или 11, дополнительно содержащий замену V38E.

13. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий замену H37Y.

14. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий замены H37Y/V38E.

15. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий замены R35Y/H37K или R35Q/H37K.

16. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий замены R35Y/H37K/V38E или R35Q/H37K/V38E.

17. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий замену L97bA.

18. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий R35Q.

19. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий H99Q.

20. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий D60aP.

21. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-12, содержащий T97aI.

22. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-21, дополнительно включающий замену аминокислоты, соответствующую T39Y, T39W, T39F или консервативные замены, выбранные из T39M или T39L.

23. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-22, дополнительно включающий замену аминокислоты T39Y.

24. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-23, дополнительно содержащий аминокислотные замены R35Q/H37Y или V38E/V41R/Y149R или R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R.

25. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-24, где модифицированный полипептид u-PA имеет ED50 для расщепления инактивации C3 менее или 100 нМ, или 50 нМ или 30 нМ или 25 нМ в анализе invitro.

26. Модифицированный полипептид u-PA по п.25, в котором:

полипептид содержит домен протеазы, представленный в таблице 14; и имеет ED_{50} 100 нМ или менее, имеет ED_{50} менее 50 нМ или менее, или имеет ED50 менее 30 нМ или имеет ED50 менее 25 нМ.

27. Модифицированный полипептид u-PA по п.25 или 26, в котором анализ включает инкубацию субстрата белка комплемента человека C3 с различными концентрациями каждой модифицированной протеазы в течение 1 часа при 37° C для определения ED50.

28. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-27, который расщепляет C3 с ED_{50} 50 нМ или менее.

29. Модифицированный полипептид u-PA по п.28, содержащий модификацию V41R.

30. Модифицированный полипептид u-PA по п.28, содержащий модификации V38E/V41R.

31. Модифицированный полипептид u-PA по п. 29, дополнительно содержащий замену в одном или более положениях R35, H37 и V38.

32. Модифицированный полипептид u-PA по п.31, в котором замена при V38 является E

33. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-32, содержащий R35Y/H37S/V38E/V41R.

34. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-33, содержащий модификации, выбранные из:

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82R/T97aI/L97bA/H99Q/K110aR/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179R;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bW/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K92S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61R/K62R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K179S;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36T/H37S/V38S/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192Y;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61S/K62S/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35A/H37E/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157R;

F30Y/R35W/H37Y/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/T39W/V41R/D60aW/Y60bP/L97bG/H99L/C122S;

R35W/R36K/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H;

R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aQ/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192H;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36N/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157S;

R35Y/H37D/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/K82S/T97aI/L97bA/H99Q/K110aS/C122S/Y149R/M157K;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A;

R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/H37P/R37aG/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41Q/D60aH/Y60bS/T97aW/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38P/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157R;

F30H/R35W/R36T/H37S/V38P/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/R72H/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q169K;

R35W/R36Q/H37S/V38S/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192H;

R35W/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35V/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36S/H37S/V38Q/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192N;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R37aS/V38E/Y40V/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217V;

V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217E;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I17V/F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bS/T97aM/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/M157K;

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

N26D/F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/R110dS/P114S/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37P/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35L/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37P/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S/E167K;

R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Y/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37E/V38E/T39F/Y40F/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/T242A;

F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30Y/R35Y/R36H/H37P/R37aQ/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bH/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/V41R/L97bR/H99E/C122S/Y151L/R217E;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

F30Y/R35M/R36H/H37G/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bP/T97aF/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38T/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157K/Q192T;

R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/D60aR/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

I17V/F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K;

F30Y/R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157T/Q192H;

R35H/G37bD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S;

R35H/H37P/R37aG/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217E;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

F30H/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40M/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35V/R36H/H37D/V38E/T39W/Y40M/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36K/H37S/V38A/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/N145S/S146V/T147M/D148G/Y149Q/L150F/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R/M157K;

F30Y/R35I/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35V/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37Y/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aN/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

R35H/V38E/T39Y/V41R/T56S/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158S;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A;

V38D/V41R/Y60bR/T97aW/L97bR/H99E/C122S/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41L/Y60bP/T97aM/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C12
5 2S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37N/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C1
22S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36K/H37S/V38D/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C1
22S/Y149R/Y151L/M157R/Q192T;

10 V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99L/C122S/Y151Q/R217E;

V38E/Y40L/V41R/H99L/C122S/Y151L/R217S;

V38E/Y40Q/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151P/R217T;

V38E/T39Y/V41R/D60aW/Y60bP/L97bR/H99I/C122S;

15 R35W/H37D/R37aP/V38E/T39W/V41R/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/H37F/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bD/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y
149L/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37E/S37dP/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H
99Q/C122S/Y149K/M157K;

20 R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/
Y149R;

R36H/V38D/V41R/A96D/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/T178S/R217
D;

V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217A;

25 F30H/R35Q/R36H/H37Y/V38E/T39Y/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y14
9R/M157K;

F30Y/R35W/R36K/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61E/I65T/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aS/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aG/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I24N/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40L/V41R/Y60bQ/N87D/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35Q/H37W/V38D/Y40H/V41R/Y60bN/L97bA/H99Q/C122S/Y149H/M157K/T158A;

F30Y/R35W/R36A/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37W/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187R/K223R/K224R;

R35W/R36Q/H37S/V38E/T39Y/Y40L/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151L/M157S/Q192T;

R35H/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/P60cS/L97bA/H99Q/C122S/I138V/E167K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

I17V/F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35H/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/V38D/Y40F/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157R;

V38E/Y40A/V41L/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

I24T/F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

I17V/F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T;

F30H/R35L/H37D/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R217E;

F30Y/R35W/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bF/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35L/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149M/M157K;

I17V/F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35V/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40H/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35W/R36H/H37N/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/Q192H;

R35V/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35M/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/V38D/V41R/L97bG/H99Q/C122S/Y151L;

R37aS/V38E/Y40P/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151Q/R217T;

R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30H/V38D/V41R/A96G/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K

Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/S146F/M157K/Q192H/K243Q

Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61L/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/V38D/V41R/T97aS/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35V/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bP/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149E/M157K;

R35A/H37T/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192S;

R35S/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L;

R35S/V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158S;

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37G/R37aD/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Q/H37D/R37aK/V38E/T39F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35Y/R36H/H37S/V38D/T39Y/V41R/Y60bN/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R37aS/V38D/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35K/R36H/H37E/R37aK/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bG/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36Q/H37E/V38A/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/K61D/I65V/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

R35N/H37T/R37aY/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R37aH/V38E/T39Y/V41R/T56A/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/T158A;

F30H/R35Q/H37T/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30H/R36L/V38E/V41R/K82R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

V38D/V41R/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aE/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35Q/H37Y/R37aD/V38E/T39L/V41R/D60aE/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35L/R36H/H37E/V38E/T39N/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R36S/V38E/Y40L/V41N/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217T;

T39W/V41R/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37E/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35S/R37aA/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149V;

F30Y/R35W/R36H/H37Q/V38E/T39H/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37Y/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bV/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K;

F30H/R35H/H37I/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y149W/Y151L/M157K/R217S;

V38D/T39Y/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

R35F/H37D/R37aN/V38E/T39Y/V41R/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

T39Y/V41R/Y60bQ/L97bG/H99Q/C122S;

T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217E;

R36S/V38D/T39L/Y40L/V41R/L97bI/H99E/C122S/R217T;

R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/Y60bV/T97aL/L97bA/H99Q/C122S/Y149L;

Y40Q/V41L/Y60bT/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/V38E/Y40H/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K243M;

F30Y/R36H/R37aH/V38E/Y40H/V41R/K61E/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/R35Q/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

V38D/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35V/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

Y40Q/V41L/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K;

T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35H/R36H/H37D/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K/T158A;

V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/L97bA/H99L/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/I65T/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

V38D/V41R/L97bR/H99Q/C122S/Y151L/R217V;

R35Q/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R36S/V38E/Y40Q/V41R/L97bG/H99L/C122S/Y151P/R217E;

V38E/Y40Q/V41L/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E;

F30Y/R35Y/R36H/H37K/V38E/T39F/Y40F/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K/K187S/K223S/K224Y;

Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S;

F30H/R35H/V38D/V41R/K61E/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/R206H;

F30Y/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

R35A/R37aE/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/V41L/L97bG/H99Q/C122S/Y151L/R217Q;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K/R217D;

F30Y/R35F/R36H/H37G/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39Y/V41R/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R35I/R36H/H37E/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bS/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/M157K;

R35S/R37aD/V38E/Y40Q/V41L/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

Y40H/V41Q/L97bG/H99Q/C122S/R217T;

R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38D/T39F/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39F/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39Y/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99L/C122S/F141L/M157K/T158A;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aA/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35Q/R36H/H37G/R37aE/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

T39Y/V41R/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S;

F30H/R36H/V38D/V41R/T56A/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K;

F30Y/R35E/R36H/H37D/R37aN/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38E/Y40Q/V41L/D60aP/Y60bL/L97bA/H99Q/C122S/Y149W;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/M157K;

F30H/R35Q/H37W/V38D/V41R/D60aE/Y60bS/L97bA/H99Q/C122S/Y149L/Y151L/M157K;

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/Y151P/M157K/Q192H;

F30Y/R35M/R36H/H37D/R37aD/V38E/T39Y/Y40F/V41R/D60aP/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bT/T97aD/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aV/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/V41R/Y60bS/T97aI/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192F/R217E/K224R;

T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S;

R36H/V38D/Y40F/V41R/D97E/A98G/T97adel/H99L/L97bdel/C122S/Y151L/Q192E/R217D;

R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/V38D/Y40L/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157K/Q192H;

F30H/V38D/Y40F/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157F;

H37M/R37aD/V38E/T39A/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/Y151L/M157K;

T22I/F30Y/R35S/V38D/Y40H/V41R/L97bA/H99Q/C122S/I138V/M157K;

R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R35L/V38D/Y40H/V41R/N76S/L97bA/H99Q/C122S/M157K/K187E;

F30H/V38D/V41R/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157S;

R35W/H37D/V38D/T39Y/V41R/Y60bH/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

F30Y/R36H/H37G/V38E/T39W/Y40H/V41R/Y60bA/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K;

R35Q/H37G/R37aE/V38W/T39Y/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

H37G/R37aD/G37bD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

V38D/T39Y/Y40M/V41R/T97aE/L97bA/H99Q/C122S;

R35Q/H37N/V38D/T39Y/V41R/Y60bP/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R35W/R36H/H37D/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bS/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149K/M157K;

R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

V38E/T39L/V41R/D60aN/Y60bP/L97bG/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/H37A/V38E/T39Y/Y40H/V41R/Y60bQ/T97aV/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

F30Y/R35W/R36H/H37E/R37aP/V38E/T39Y/Y40F/V41R/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149Q/M157K;

H37T/R37aL/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192R;

H37G/R37aD/V38F/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

F30Y/R35W/R36H/H37S/V38E/Y40H/Y60bN/T97aE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R/M157K;

V38D/T39W/Y40L/V41R/T97aL/L97bA/H99Q/C122S;

H37G/R37aD/G37bD/T39H/V41R/Y60bK/T97aS/L97bR/H99E/C122S/Y151L/E175D/Q192T/R217E/K224R;

T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122S;

V38D/T39L/Y40L/V41R/T97aW/L97bA/H99Q/C122S;

F30Y/R36H/V38E/Y40H/V41R/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149N/L150V/M157K;

R35S/V38D/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/M157Y;

R37aS/V38D/T39Y/Y40F/V41R/H99L/C122S/R217T;

Y40Q/V41L/Y60bE/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

Y40H/V41T/L97bG/H99Q/C122S/R217T; и любой из этих полипептидов, где C122SявляетсяC122C, согласно нумерации химотрипсина.

35. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-34, дополнительно содержащий одну или более аминокислотных модификаций R35Q, Y60bQ и Y149R.

36. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-35, дополнительно содержащий аминокислотную модификацию R37aE или R37aS.

37. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий замены R35Q/H37Y/T39Y/V41R или R35Q/H37Y/T39Y/V41R/C122S.

38. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий аминокислотные модификации R35Q/H37Y/T39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122SилиR35Q/H37Y/T39Y/V41R/L97bA/H99Q.

39. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий аминокислотные модификации T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q или T39Y/V41R/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S.

40. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий замены T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q/C122S или T39Y/V41R/D60aP/L97bA/H99Q.

41. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий аминокислотные модификации, соответствующие Y40Q/V41L/L97bA/C122S или Y40Q/V41R/L97bA/C122S или Y40Q/V41L/L97bA или Y40Q/V41R/L97bA.

42. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий аминокислотные модификации, соответствующие R37aS/V41R/L97bG/H99Q или R37aS/V41R/L97bG/H99Q/C122S.

43. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий аминокислотные модификации, соответствующие

T39Y/V41L/L97bA/H99Q/C122SилиT39Y/V41R/L97bA/H99Q/C122SилиT39Y/V41L/L97bA/H99QилиT39Y/V41R/L97bA/H99Q.

44. Модифицированный полипептид u-PA по п. 41, дополнительно содержащий замену, соответствующую H99Q.

45. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий соответствующие им модификации аминокислот

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R; или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aT/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R.

46. Модифицированные полипептиды u-PAпо п. 45, где немодифицированный полипептидсодержит протеазный доменSEQIDNO:2 илиSEQIDNO:5.

47. Модифицированный полипептид u-PAпо п.45, где немодифицированный полипептид содержит зрелый u-PAпоSEQIDNO:3 илиSEQIDNO:6.

48. Модифицированный полипептид u-PA по п.45, где немодифицированный полипептид содержитпропептид поSEQIDNO:1 илиSEQIDNO:4.

49. Модифицированный полипептид u-PAпо любому из п. 1-36, содержащий аминокислотные модификации:
H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; или
R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L; или

R35Q/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/H99Q/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/C122S/Y149R;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S;
или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aA/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/
Y149R;
или
R35L/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y
149R;
или
R35M/H37G/R37aD/V38E/T39W/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/
Y149R;
или

R35Q/H37G/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

или

R35A/H37G/R37aE/V38E/T39F/V41R/D60aE/Y60bP/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

или

R35Q/H37S/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

или

R35Q/H37T/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

или

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39H/V41R/D60aP/Y60bA/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R;

или

R35W/H37D/R37aS/V38E/T39Y/V41R/D60aE/Y60bS/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; или

R35Q/H37G/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bT/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R; или

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bL/D97T/T97aE/L97bG/A98S/H99L/C122S; или

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192A; или

R35Y/H37V/R37aW/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bE/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T; или

R35Y/H37S/R37aP/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L; или

R35W/H37P/R37aN/V38E/T39Y/V41K/D60aP/Y60bD/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y151L/Q192T; иликаждаянесодержитзаменывс122.

50. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-36, содержащий аминокислотные модификации, соответствующие

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R или
R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R,
где немодифицированный полипептид u-PA содержит домен протеазы, представленный в SEQIDNO: 2 или SEQIDNO: 5.

51. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-50, где модифицированный полипептид u-PA содержит последовательность аминокислотных остатков, указанных в любой из SEQIDNO: 8-44

52. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-51, где модифицированный полипептид u-PA содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 21 или 987.

53. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-51, где модифицированный полипептид u-PA содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 18.

54. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-53, где немодифицированный полипептид u-PA состоит из последовательности аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 5.

55. Модифицированный полипептид u-PA по п.49, в котором немодифицированный полипептид u-PA состоит из последовательности аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 2 или SEQIDNO: 5.

56. Модифицированный полипептид u-PA по п. 50, в котором немодифицированный полипептид u-PA состоит из последовательности аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 5.

57. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-56, который расщепляет остатки QHARASHLG (остатки 737-745) человеческого C3 (SEQIDNO: 47).

58. Модифицированный полипептид u-PA по п. 57, в котором P1-P1'представляет собой RA.

59. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-58, который имеет стабильность более 50% после инкубации в PBS, или в жидкости организма в течение 7 дней.

60. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-59, который имеет стабильность более 80% после инкубации в PBS или в жидкости организма в течение 7 дней.

61. Модифицированный полипептид u-PA по п. 59 или 60, отличающийся тем, что инкубацию осуществляют в жидкости организма.

62. Модифицированный полипептид u-PA по п.61, в котором жидкость организма представляет собой водный гумат.

63. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-62, где модифицированный полипептид u-PA в активной форме имеет по меньшей мере 100-кратное снижение активности плазмина по сравнению с соответствующей формой немодифицированного полипептида u-PA.

64. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-63, который конъюгирован с другим фрагментом или полимером либо непосредственно, либо через линкер.

65. Модифицированный полипептид u-PA по п.64, который является слитым белком.

66. Модифицированный полипептид u-PA по п.64 или 65, который является ПЭГилированным.

67. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-66, который содержит полимер, который увеличивает время полужизни в сыворотке и/или снижает иммуногенность или и то, и другое.

68. Модифицированный полипептид u-PA по п.67, в котором полимер содержит полипептид.

69. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 64-68, который связан непосредственно или опосредованно с сывороточным альбумином.

70. Модифицированный полипептид u-PA по п.69, в котором сывороточный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA).

71. Модифицированный полипептид u-PA по п.69 или 70, в котором HSA содержит последовательность, представленную в SEQIDNO: 991, или форму, которая имеет по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ней.

72. Модифицированный полипептид u-PA по п.64, в котором полимер представляет собой Fc-домен.

73. Модифицированный полипептид u-PA по п. 72, в котором Fc-домен содержит последовательность, представленную в SEQIDNO: 50 или SEQIDNO: 992, или форму, которая имеет по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ней.

74. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 64-73, где полимер связан непосредственно с модифицированным полипептидом u-PA.

75. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 64-74, где полипептид или полимер связан через пептидный линкер с модифицированнымu-PAполипептидом.

76. Модифицированный полипептид u-PA по п.75, в котором линкер содержит Gly и/или Ser.

77. Модифицированный полипептид u-PA по п. 75 или 76, где линкер содержит до 20, 30, 40 или 50 аминокислотных остатков.

78. Модифицированный полипептид u-PA по п.75, в котором линкер содержит (GS)n или (G)n(S)n или (GGS)n или (SGG)n или (GGSSGG)n или (AGS)n, где n равно от 1 до 5,6,7, 8,9,10, 11,12,13, 14,15,16, 17,18,19, или 20, или линкер содержит до 25 остатков, содержащих S, G, E и K

79. Модифицированный u-PA по п. 78, содержащий последовательность аминокислотных остатков, указанных в любой из SEQIDNO: 1001-1003, 1024-1029 и их мультимеров, и последовательности, имеющие по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

80. Слитый белок, содержащий модифицированный полипептид u-PA или каталитически активную часть модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79, который слит с непротеазным полипептидом или его частью.

81. Слитый белок по п.80, в котором непротезный полипептид представляет собой домен мультимеризации или домен белковой трансдукции (PTD).

82. Слитый белок по п.80, в котором непротезный полипептид представляет собой домен мультимеризации, который представляет собой домен Fc.

83. Слитый белок по п.80, который содержит сайт активации фурина.

84. Слитый белок по п. 83, в котором сайт активации фурина содержит QSGQKTLRRRKR (SEQIDNO: 996) или QCGQKTLRRRKR (SEQIDNO: 995) или QSGQKTLRRKR (SEQIDNO: 1044) или сайт активации фурина, имеющий по меньшей мере 98% идентичность последовательности с ним.

85. Слитый белок, содержащий модифицированный полипептид u-PA или его каталитически активную часть по любому из пп. 1-79, где слитый белок содержит сигнальную последовательность и модифицированный полипептид u-PA или его каталитически активную часть.

86. Слитый белок по п.85, в котором сигнальная последовательность произведена от Il -2, u-PA или IgGk.

87. Слитый белок по любому из пп. 80-86, содержащий партнер слияния.

88. Слитый белок по п.87, в котором партнер слияния представляет собой домен мультимеризации.

89. Слитый белок по п.87, в котором партнер слияния представляет собой альбумин, или домен Fc, или одноцепочечное антитело или другой антигенсвязывающий фрагмент антитела, или домен, связывающий гиалуроновую кислоту (HABD).

90. Слитый белок по п.89, в котором партнер слияния представляет собой HABD, который представляет собой фактора некроза опухоли-стимулированный ген -6 (TSG -6).

91. Слитый белок по п.89, в котором партнер слияния представляет собой HSA.

92. Слитый белок по п.89, в котором партнер слияния представляет собой $IgGF_c$

93. Слитый белок по п. 91, в котором партнер слияния представляет собой фрагмент scFv коллагенового антитела II типа или антитело против VEGFR или его фрагмент.

94. Слитый белок по любому из пп. 80-93, содержащий последовательность активации.

95. Слитый белок по п.94, в котором последовательность активации содержит цистеин, а модифицированный полипептид u-PA содержит свободный цистеин, причем при активации полученный активированный полипептид содержит две цепи.

96. Слитый белок по п.94, в котором последовательность активации представляет собой последовательность активации u-PA или последовательность активации фурина.

97. Слитый белок по п.96, в котором последовательность активации имеет последовательность, представленную в любой из SEQIDNO: 995-998, 1041 и 1044, или последовательность, имеющую по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности с ней.

98. Слитый белок по любому из пп. 80-97, включающий последовательность активации, модифицированный полипептид u-PA и HSA.

99. Слитый белок по п.80, содержащий последовательность аминокислот, представленную в любой из SEQIDNO: 1006, 1007, 1009 и 1010.

100. Слитый белок по п.80, содержащий последовательность аминокислот, представленных в любом из SEQIDNo: 1004-1019 и 1034-1040.

101. Слитый белок по п.80, содержащий последовательность аминокислот, представленную в SEQIDNO: 1015 или 1019.

102. Слитый белок по любому из пп. 80-101, который не имеет сигнальной последовательности или из которого сигнальная последовательность была удалена при экспрессии.

103. Соединение по любому из пп. 80-102, которое представляет собой двухцепочечную активированную форму, содержащую цепь А и цепь В.

104. Слитый белок по п. 103, в котором цепь В начинается с остатков IIGG модифицированного полипептида u-PA полипептида и заканчивается на С-конце слитого белка.

105. Слитый белок по п. 103, содержащий модифицированный u-PA полипептид и HSA.

106. Слитый белок по п. 103 или 104, содержащий последовательность аминокислот, представленных в любом из SEQIDNos 1005,1011,1014, 1015, 1016, 1019 и 1036, но не содержит сигнальную последовательность.

107. Слитый белок по п. 106, содержащий А цепь из остатков 21-178 и цепь В остатков 179-до С-конца белка с дисульфидной связью между остатками 168-299.

108. Слитый белок по любому из пп. 80-107, который представляет собой двухцепочечный активированный слитый белок, содержащий цепь А и цепь В,

где цепь А состоит из остатков 21-178 SEQIDNo.1015, и цепь В состоит из остатков 179-1022; и цепи А и В связаны через дисульфидный мостик между С168 и С299 SEQIDNO: 1015.

109. Слитый белок по п. 88, который представляет собой димер посредством взаимодействия комплементарных мультимеризационных доменов.

110. Слитый белок по п. 109, в котором домен мультимеризации представляет собой F_c домен

111. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующую модифицированный полипептид u-PA или слитый белок по любому из пп. 1-110.

112. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 111.

113. Вектор по п. 112, который является прокариотическим вектором.

114. Вектор по п. 112, который является эукариотическим вектором.

115. Вектор по п. 112, который является вирусным вектором.

116. Вектор по п. 112, который представляет собой дрожжевой вектор.

117. Вектор по любому из пп. 112-116, который представляет собой вектор простого герпеса, или вектор вируса осповакцины, или аденовирусный вектор, или аденоассоциированный вирусный вектор, или ретровирусный вектор, или вектор насекомых.

118. Вектор по любому из пунктов 112-117, который является вектором экспрессии.

119. Вектор по любому из пунктов 112-117, который является вектором генной терапии.

120. Применение нуклеиновой кислоты по п. 111 или вектора по любому из пп. 112-119 для генной терапии для лечения заболевания или состояния,

опосредованного или включающего активацию комплемента, где ингибирование активации комплемента вызывает лечение или облегчение заболевания или состояния.

121. Вектор по любому из пп. 112-119 для применения для лечения комплемент-опосредованного заболевания путем ингибирования активации комплемента.

122. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающий активацию комплемента, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п. 111 или вектора по любому из пп. 112-119.

123. Способ по п.122, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из числа воспалительных заболеваний и состояний, комплемент 3 Гломерулопатии (C3G), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), сепсис, ревматоидный артрит (RA), сердечно-сосудистое заболевание, мембранопролиферативные заболевания и состояния, глазные заболевания или нарушения,мембранного пролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплекса (IC)-опосредованного острого воспалительного поражения ткани, болезни Альцгеймера (AD), отторжения трансплантированного органа и ишемически-реперфузионного повреждения.

124. Способ по п. 122, в котором заболевание или состояние представляет собой окулярное или офтальмологическое заболевание или отторжение или воспаление за счет трансплантированного органа.

125. Способ по п. 122, в котором заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

126. Способ по п.122, в котором заболевание или состояние представляет собой макулярную дегенерацию.

127. Способ по п. 125, в котором макулярнаядегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

128. Способ по п.122, в котором заболевание или состояние является отсроченной функцией почечного трансплантата (DGF).

129. Способ по п.122, в котором заболевание или состояние представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

130. Способ по п. 122, в котором заболевание или состояние представляет собой комплементную 3 гломерулопатию (С3Г).

131. Применение по п. 120, в котором опосредованное комплементом заболевание или состояние выбрано из числа воспалительных заболеваний и состояний, комплемент 3 гломерулопатии (C3G), атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазной болезни, мембранопролиферативного заболевания, гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплексного (IC)-опосредованного острого воспалительного повреждения тканей, болезни Альцгеймера (AD) и ишемически-реперфузионного повреждения.

132. Применение по п. 120, в котором заболевание или состояние представляет собой офтальмологическое или глазное заболевание или отторжение или воспаление за счет трансплантированного органа.

133. Применение по п. 120, в котором заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

134. Применение по п. 120, в котором заболевание или состояние представляет собой макулярную дегенерацию.

135. Применение по п. 133, в котором макулярная дегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

136. Применение по п. 120, в котором заболевание или состояние является отсроченной функцией почечного трансплантата (DGF).

137. Применение по п. 120, в котором заболевание или условия являются атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS).

138. Применение по п. 120, в котором заболевание или условия являются комплементной 3 гломерулопатией (C3G).

139. Выделенная клетка или культура клеток, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 111 или вектор по любому из пп. 112-119.

140. Нечеловеческая клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 111 или вектор по любому из пп. 112-119.

141. Выделенная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 111 или вектор по любому из пп. 112-119, где выделенная клетка не представляет собой зиготу человека.

142. Способ ингибирования активации комплемента, включающий контактирование модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110, в активной форме, с белком C3 комплемента, при этом белок C3 комплемента расщепляется так, что активация комплемента снижается или ингибируется.

143. Способ по п. 142, в котором контактирование модифицированного полипептида u-PA с белком C3 комплемента осуществляют invitro.

144. Способ по п. 142, в котором контактирование модифицированного полипептида u-PA с белком C3 комплемента осуществляют invivo.

145. Способ по любому одному из пунктов 138-144, в котором ингибирование активации комплемента приводит к снижению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из числавоспалительное расстройство, нейродегенеративное расстройство и сердечно-сосудистое заболевание.

146. Способ по п. 145, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из числа воспалительных заболеваний и состояний, сепсиса, комплементной 3 гломерулопатии (C3G), атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативных заболеваний, гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплексно (IC)-опосредованного острого воспалительного повреждения тканей, болезни Альцгеймера (AD) и ишемически-реперфузионного повреждения.

147. Способ по п. 146, в котором ишемически-реперфузионное повреждение вызвано событием или обработкой, выбранным из инфаркта миокарда (MI), инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарных артерий, искусственного кровообращения (CPB) и гемодиализа.

148. Способ по любому одному из пунктов 142-147, в котором опосредованное комплементом заболевание или нарушение просходит из-за лечения субъекта.

149. Способ по любому одному из пунктов 142-148, отличающийся тем, что обработку модифицированным полипептидом u-PA осуществляют до лечения субъекта.

150. Способ лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, включающий введение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110, в активной форме, где ингибирование активации комплемента вызывает лечение или облегчение заболевания или состояния.

151. Способ по п. 150, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из числа воспалительных заболеваний и состояний, сепсиса, комплементной 3 гломерулопатии (C3G), атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), ревматоидного артрита (RA), глазного заболевания, мембранопролиферативного заболевания, гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении гравис (MG), астмы,

воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплексно (IC)-опосредованного острого воспалительного повреждения тканей, болезни Альцгеймера (AD) и ишемически-реперфузионного повреждения.

152. Способ по п. 150, в котором заболевание или состояние представляет собой глазное заболевание или отторжение или воспаление вследствие пересаженного органа.

153. Способ по п. 150, в котором заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

154. Способ по п. 150, в котором заболевание или состояние представляет собой макулярную дегенерацию.

155. Способ по п. 150, в котором макулярная дегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

156. Способ по п. 150, в котором заболевание или состояние является отсроченной функцией почечного трансплантата (DGF).

157. Способ по п. 150, в котором заболевание или состояние представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

158. Способ по п. 150, в котором заболевание или состояние представляет собой комплементную 3 гломерулопатия (С3Г).

159. Способ или применение по любому из пунктов 120-138 и 142-158, где модифицированный полипептид u-PA или кодирующая молекула или вектор нуклеиновой кислоты вводятся внутривенно.

160. Способ или применение любой из пунктов 120-138 и 142-158, где модифицированный полипептид u-PA или кодирующая молекула или вектор нуклеиновой кислоты вводятся подкожно.

161. Способ или применение любой из пунктов 120-138 и 142-158, где модифицированный полипептид u-PA или кодирующая молекула или вектор нуклеиновой кислоты вводятся в глаз.

162. Способ или применение по п. 161, в котором введение в глаз осуществляют путем интравитреального или субретинального или внутриретинального введения.

163. Способ или применение по п. 161 или 162, в котором модифицированный полипептид u-PA связан с доменом трансдукции для облегчения трансдукции в стекловидное тело.

164. Способ или применение любого из пунктов 120-138 и 142-163, где модифицированный полипептид u-PAПЭГилирован.

165. Способ или применение по любому из пп. 120-138 и 142-163, где модифицированный полипептид u-PA модифицирован посредством альбуминации, гликозилирования, фарнилирования, карбоксилирования, гидроксилирования, фосфорилирования, ХЕЗилирования и/или ПАСилирования

166. Способ или применение по любому одному из пунктов 120-138 и 142-165, где единичная доза составляет от 0,1 до 10 мг в зависимости от пути введения.

167. Способ или применение по любому одному из пунктов 120-138 и 142-166, где обработку повторяют несколько раз.

168. Способ или применение по любому из пунктов 120-138 и 142-167, где лечение повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, би-ежемесячно или ежемесячно.

169. Способ по любому одному из пунктов 120-138 и 142-168, где лечение повторяют каждые два месяца, каждые три месяца или каждые четыре месяца.

170. Комбинация, содержащая:

(a) модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-79 или слитый белок по любому из пп. 80-110; и

(b) второе средство или средства для лечения комплемент-опосредованного заболевания или расстройства.

171. Комбинация по п. 170, в которой второй агент или агенты является противовоспалительным агентом (ами) или антикоагулянтом (- ами).

172. Комбинация по п. 170 или 171, в которой второе средство представляет собой противовоспалительное средство (ы), выбранное из любого одного или более нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), антиметаболита, кортикостероида, анальгетика, цитотоксического агента, ингибитора провоспалительного цитокина, противовоспалительного цитокина, агента нацеливания В-клеток, соединения, нацеленного на Т-антигены, блокатор молекул адгезии, антагонист хемокинового рецептора, ингибитор киназы, PPAR- гамма лиганд, ингибитор комплемента, гепарин, варфарин, акценокумарил, фениндион, ЭДТА, цитрат, оксалат, аргатробан, лепирудин, бивалентин и ксимелагатран.

173. Способ, применение или комбинация любых из пунктов 120-138 и 142-169, где модифицированный полипептид u-PA содержит модификацию V41R или V41L.

174. Способ, применение или комбинация любых из пунктов 120-138 и 142-169, где модифицированный полипептид u-PA содержит модификацию V41R.

175. Способ, применение или комбинация любых из пунктов 120-138 и 142-169, где модифицированный полипептид u-PA содержит модификации V38E/V41R.

176. Способ, применение или комбинация любых из пунктов 120-138 и 142-169, где модифицированный полипептид u-PA содержит модификации Y40Q/V41R/L97bAилиY40Q/V41L/L97bAилиR37aS/V41R/L97bG/H99Q.

177. Способ, применение или комбинация любых из пунктов 120-138 и 142-169, где модифицированный полипептид u-PA содержит модификации: R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R.

178. Способ, применение или комбинация любых из пунктов 173-177, где немодифицированный полипептид u-PA содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 2 или SEQIDNO: 5

179. Модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-79 или слитый белок по любому из пп. 80-110, способ, применение или комбинация любых из пунктов 120-138 и 142-178, где модифицированный полипептид u-PA или слитый белок содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 21 или 987, или в любой из SEQIDNO: 40-44, или 40-44 без модификации при C122, по нумерации химотрипсина.

180. Способ лечения DGF, включающий внутривенное введение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110.

181. Способ лечения атипичных гемолитических уремических синдромов (aHUS), включающий введение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110.

182. Способ лечения гломерулопатии комплемента 3 (C3G), включающий введение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110.

183. Способ по любому из пунктов 180-182, в котором единичная доза составляет от 0,1 до 3 мг, или от 0,1 до 2 мг, или от 1 до 3 мг, или от 1 до 10 мг.

184. Способ по любому одному из пунктов 180-182, в котором модифицированный полипептид u-PA или слитый белок содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 21 или 987, или в любой из SEQID 40-44 или 40-44 без модификации при C122, по нумерации химотрипсина.

185. Способ по любому одному из пунктов 180-184, в котором обработку повторяют несколько раз.

186. Способ по любому из пп. 180-185, отличающийся тем, что обработку повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, би-ежемесячно или ежемесячно.

187. Способ по любому одному из пунктов 180-186, где лечение повторяют каждые два месяца, каждые три месяца, или каждые четыре месяца.

188. Способ по любому одному из пунктов 102-106, в котором модифицированный полипептид u-PA содержит замены R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149R.

189. Способ по любому одному из пунктов 180-188, в котором модифицированный полипептид u-PA или слитый белок содержит домен протеазы, представленный в SEQIDNO: 21 или 987, или его каталитически активную часть.

190. Способ лечения офтальмологического нарушения или глазного заболевания, включающий введение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-72 или слитого белка по любому из пп. 80-110 в глаз.

191. Способ по п. 190, в котором расстройство является макулярной дегенерацией или диабетической ретинопатией.

192. Способ по п. 191, в котором нарушение представляет собой AMD.

193. Способ по любому одному из пунктов 190-192, в котором единичная доза составляет от 0,1 мг до 2 мг/глаз или 3 мг/глаз.

194. Способ по любому одному из пунктов 190-192, в котором единичная доза составляет от 1 мг до 2 мг/глаз.

195. Способ по любому одному из пунктов 190-192, в котором единичная доза составляет от 0,1 до 1 мг.

196. Способ по любому одному из пунктов 180-195, где модифицированный полипептид u-PA содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в любой из SEQIDNO: 21 или 987, или любой из SEQIDNO: 40-44, или 40-44 без модификации при C122, по нумерации химотрипсина.

197. Способ по любому из пунктов 180-196, в котором обработку повторяют несколько раз.

198. Способ по любому из пп. 180-197, отличающийся тем, что обработку повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, би-ежемесячно или ежемесячно, через каждые два месяца, через каждые три месяца, или каждые четыре месяца.

199. Способ по любому из пп. 180-198, в котором модифицированный полипептид u-PA содержит замены

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149Rили

R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149R.

200. Способ по любому из пунктов 180-199, в котором модифицированный полипептид u-PA содержит замены Y40Q/V41L/L97bA/C122S или Y40Q/V41R/L97bA/C122S или Y40Q/V41L/L97bA или Y40Q/V41R/L97bA.

201. Способ по любому из пп. 180-200, в котором модифицированный полипептид u-PA содержит домен протеазы, представленный в SEQIDNO: 21 или 987, или его каталитически активную часть.

202. Применение модифицированного полипептида u-PA для лечения AMD или DGF, где модифицированный полипептид u-PA содержит замены R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/C122S/Y149Rили R35Q/H37Y/R37aE/V38E/T39Y/V41R/D60aP/Y60bQ/T97aI/L97bA/H99Q/Y149RилиY40Q/V41L/L97bA/C122SилиY40Q/V41R/L97bA/C122SилиY40Q/V41L/L97bAилиY40Q/V41R/L97bA.

203. Применение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110, в активной форме, для ингибирования активации комплемента.

204. Применение по п. 203, в котором:

модифицированный полипептид u-PA контактирует с белком C3 комплемента, при этом белок C3 комплемента расщепляется так, что активация комплемента снижается или ингибируется; иконтактирование модифицированного полипептида u-PA с белком C3 комплемента осуществляют invitro или у животного, отличного от человека.

205. Применение по п. 203, в котором контактирование модифицированного полипептида u-PA с белком C3 комплемента осуществляют invivo.

206. Применение по любому одному из пунктов 203-205, где ингибирование активации комплемента приводит к снижению воспалительных симптомов, связанных с опосредованным комплементом заболеванием или расстройством, выбранным из числа воспалительное расстройство, нейродегенеративное расстройство и сердечно-сосудистое заболевание.

207. Применение по п. 206, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из числа воспалительных заболеваний и

состояний, сепсиса, комплемента 3 гломерулопатии (C3G), атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативных заболеваний гломерулонефрит (MPGN), рассеянный склероз (MS), миастения гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплексного (IC)-опосредованного острого воспалительного повреждения тканей, болезни Альцгеймера (AD) и ишемически-реперфузионного повреждения.

208. Применение по п. 207, в котором ишемически-реперфузионное повреждение вызвано событием или обработкой, выбранным из инфаркта миокарда (MI), инсульта, ангиопластики, шунтирования коронарных артерий, искусственного кровообращения (CPB) и гемодиализа.

209. Применение по любому одному из пунктов 203-208, где опосредованное комплементом заболевание или нарушение просходит из-за лечения субъекта.

210. Применение по любому одному из пунктов 203-209, в котором обработку модифицированным полипептидом u-PA осуществляют до лечения субъекта.

211. Применение модифицированного полипептида u-PA по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110, в активной форме, для лечения заболевания или состояния, опосредованного или включающего активацию комплемента, где ингибирование активации комплемента вызывает лечение или облегчение заболевания или состояния.

212. Применение по п. 211, в котором опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из числа воспалительных заболеваний и состояний, комплемент 3 гломерулопатии (C3G), атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазной болезни, мембранопролиферативного заболевания гломерулонефрит (MPGN), рассеянный склероз (MS), миастения гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплексного (IC)-опосредованного острого воспалительного повреждения тканей, болезни Альцгеймера (AD) и ишемически-реперфузионного повреждения.

213. Применение нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-42, или вектора, содержащего нуклеиновую кислоту для генной терапии.

214. Применение по любому одному из пунктов 211-213, где заболевание или состояние является глазным заболеванием или является отторжением или воспалением за счет трансплантированного органа.

215. Применение по п. 211 или 213, в котором заболевание или состояние представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

216. Применение по п. 211 или 213, в котором заболевание или состояние представляет собой макулярную дегенерацию.

217. Применение по п. 216, в котором макулярная дегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

218. Применение по п. 211 или 213, в котором заболевание или состояние является отсроченной функцией почечного трансплантата (DGF).

219. Применение по п. 211 или 213, где заболевание или состояние представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

220. Применение по п. 211 или 213, в котором заболевание или состояние представляет собой комплемент 3 гломерулопатию (C3G).

221. Применение по любому из пунктов 213-218 для интравитреального или внутриретинального введения для лечения офтальмологического нарушения.

222. Применение по п.221, в котором единичная доза составляет от 0,1 до 1 мг.

223. Применение по п.221, в котором единичная доза составляет от 0,1 мг до 2 мг/глаз или 3 мг/глаз.

224. Применение по п. 221, в котором единичная доза составляет от 1 мг до 2 мг/глаз.

225. Применение по любому из пунктов 203-224, где модифицированный полипептид u-PA содержит последовательность аминокислотных остатков, представленных в SEQIDNO: 21 или 987, или в любой из SEQIDNO: 40-44, или 40-44 без модификации при C122, по нумерации химотрипсина.

226. Применение по любому одному из пунктов 203-225, в котором обработка повторяется множество раз.

227. Применение по любому одному из пунктов 203-226, где лечение повторяют каждые 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, еженедельно, би-ежемесячно или ежемесячно, каждые два месяца, каждые три месяца, или каждые четыре месяца.

228. Способ получения модифицированного полипептида u-PA, включающий:

введение нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего полипептид по любому из пп. 1-79 или слитого белка по любому из пп. 80-110 в клетку;

культивирование клетки в условиях, при которых экспрессируется полипептид; с возможным выделением экспрессированного полипептида.

229. Способ по п.228, в котором клетка представляет собой эукариотическую клетку.

230. Способ по п. 229, в котором клетка представляет собой клетку млекопитающего или дрожжевую клетку.

231. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный полипептид u-PA по любому из пп. 1-79 или слитый белок по любому из пп. 80-110 в фармацевтически приемлемом носителе.

232. Фармацевтическая композиция по 231, в которой модифицированный полипептид u-PA или слитый белок находится в двухцепочечной активированной форме.

233. Фармацевтическая композиция по п. 230 или 231, где модифицированный полипептид u-PA или слитый белок содержит домен протеазы SEQIDNO: 21 или SEQIDNO: 987.

234. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 231-233, где модифицированный полипептид u-PA или слитый белок имеет последовательность, представленную в SEQIDNO: 1015 или 1019.

235. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 231-234 для применения для лечения комплемент-опосредованного заболевания или нарушения или состояния.

236. Фармацевтическая композиция по 235, в которой

опосредованное комплементом заболевание или расстройство выбрано из воспалительного нарушения, нейродегенеративного расстройства и сердечно-сосудистого расстройства.

237. Фармацевтическая композиция по 235, в которой

заболевания или расстройства, опосредованные комплементом, выбраны среди воспалительных заболеваний и состояний, комплемент 3 гломерулопатии (C3G), атипичного гемолитико-уремический синдрома (aHUS), сепсиса, ревматоидного артрита (RA), глазных расстройств, мембранопролиферативного гломерулонефрита (MPGN), рассеянного склероза (MS), миастении гравис (MG), астмы, воспалительного заболевания кишечника, иммунного комплексного (IC)-опосредованного острого воспалительного повреждения тканей, болезни Альцгеймера (AD) и ишемически-реперфузионного повреждения.

238. Фармацевтическая композиция по 235, в которой заболевание или нарушение является глазным заболеванием или является отторжением или воспалением за счет трансплантированного органа.

239. Фармацевтическая композиция по 238, в которой заболевание или состояние является глазным заболеванием, которое представляет собой диабетическую ретинопатию или макулярную дегенерацию.

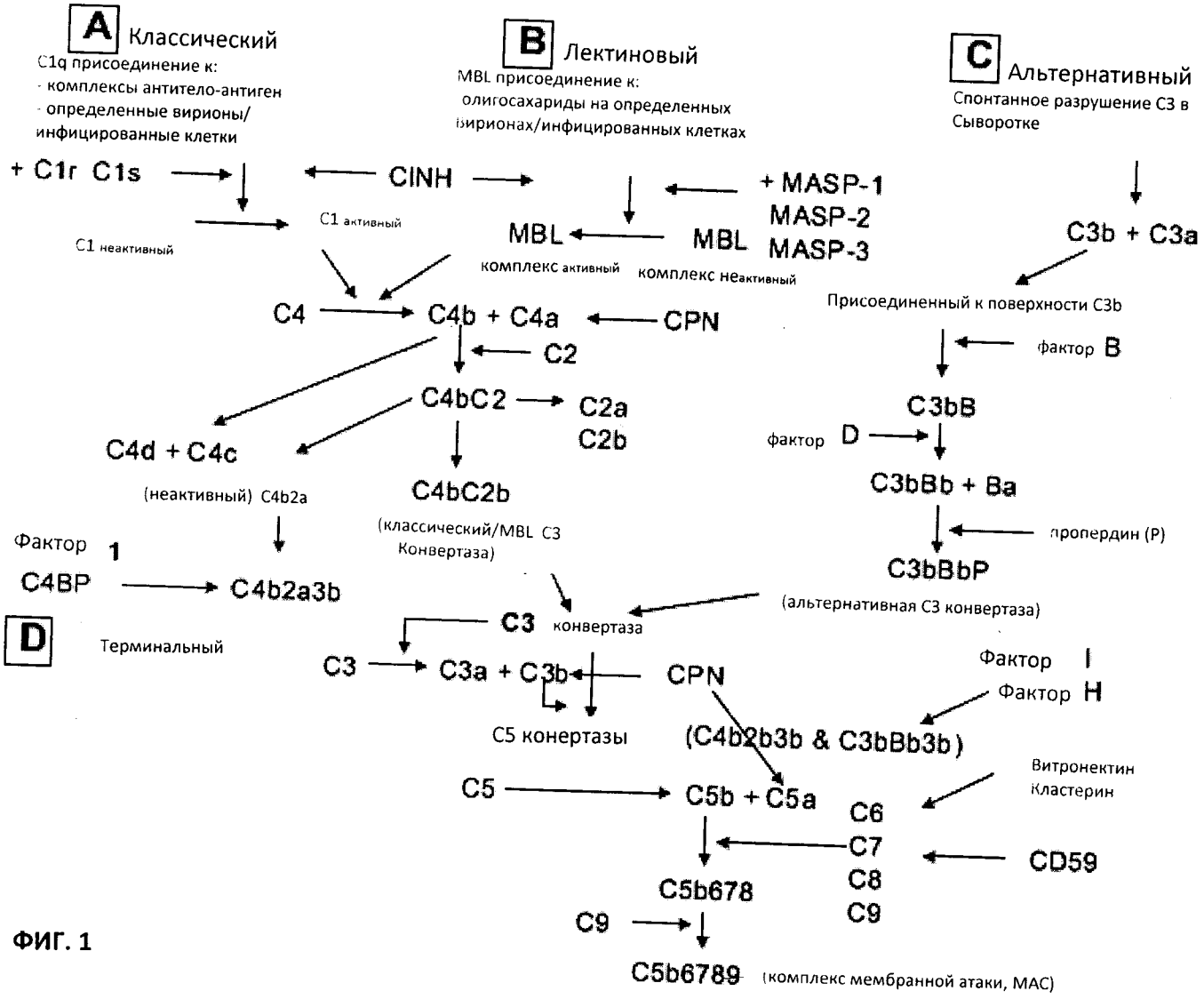
240. Способ по п. 239, в котором заболевание или нарушение представляет собой макулярную дегенерацию.

241. Способ по п.240, в котором макулярнаядегенерация представляет собой возрастную макулярную дегенерацию (AMD).

242. Способ по 235, в котором заболевание или состояние является отсроченной функцией почечного трансплантата (DGF).

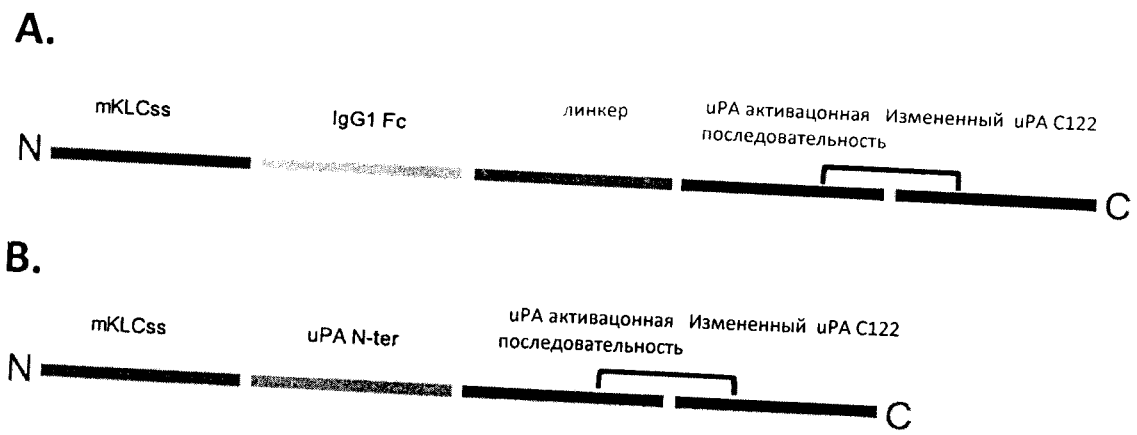
243. Способ по 235, в котором заболевание или состояние представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

244. Способ по 235, в котором заболевание или состояние представляет собой комплемент 3 гломерулопатию (C3G).

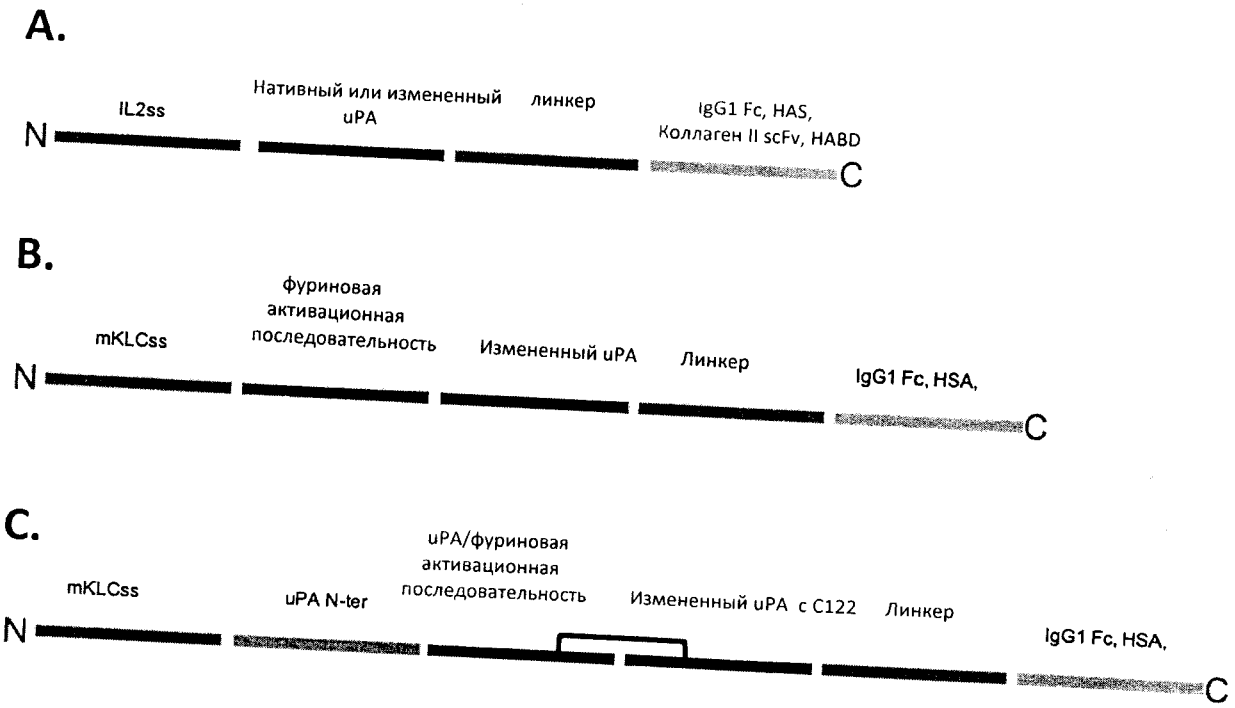

A Классический
C1q присоединение к:
- комплексы антитело-антиген
- определенные вирионы/
инфицированные клетки
B Лектиновый
MBL присоединение к:
олигосахариды на определенных
вирионах/инфицированных клетках
C Альтернативный
Спонтанное разрушение C3 в
Сыворотке
+ C1r C1s
CINH
+ MASP-1
MASP-2
MASP-3
C1 активный
C1 неактивный
MBL
MBL
комплекс активный
комплекс неактивный
C3b + C3a
C4
C4b + C4a
CPN
Присоединенный к поверхности C3b
C2
фактор B
C4bC2
C2a
C2b
C3bB
фактор D
C4d + C4c
(неактивный) C4b2a
C4bC2b
(классический/MBL C3
Конвертаза)
C3bBb + Ba
пропердин (P)
Фактор 1
C4BP
C4b2a3b
C3bBbP
(альтернативная C3 конвертаза)
D Терминальный
C3 конвертаза
C3
C3a + C3b
CPN
Фактор I
Фактор H
C5 конвертазы
(C4b2b3b & C3bBb3b)
C5
C5b + C5a
C6
C7
C8
C9
Витронектин
Кластерин
CD59
C5b678
C9
C5b6789
(комплекс мембранной атаки, MAC)

ФИГ. 1

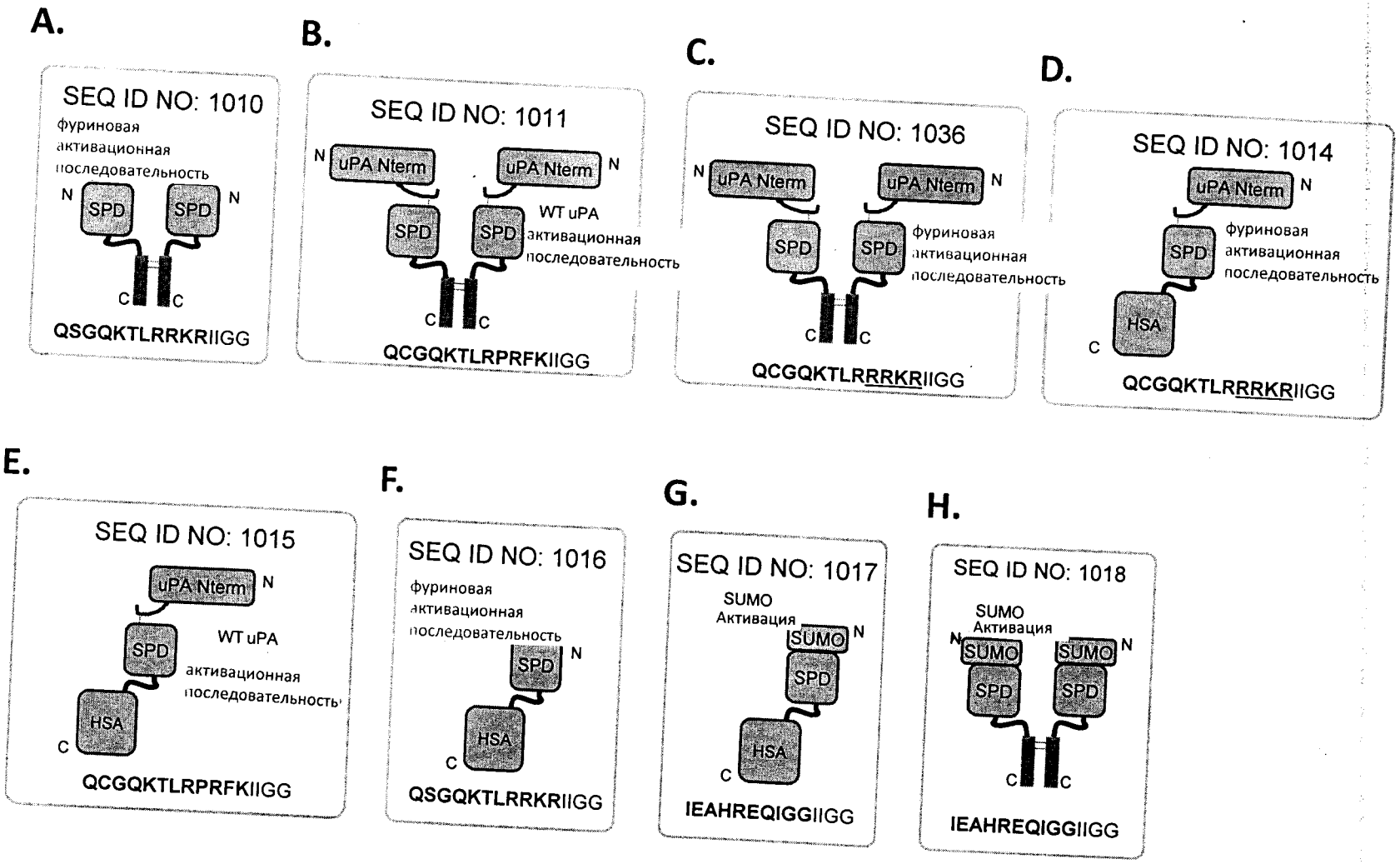
ФИГ. 2


A.
mKLCss
IgG1 Fc
линкер
uPA активационная последовательность
Измененный uPA C122
N
C
B.
mKLCss
uPA N-ter
uPA активационная последовательность
Измененный uPA C122
N
C

ФИГ.3


A.
IL2ss
Нативный или измененный uPA
линкер
IgG1 Fc, HAS, Коллаген II scFv, HABD
N
C
B.
mKLCss
фуриновая активационная последовательность
Измененный uPA
Линкер
IgG1 Fc, HSA,
N
C
C.
mKLCss
uPA N-ter
uPA/фуриновая активационная последовательность
Измененный uPA с C122
Линкер
IgG1 Fc, HSA,
N
C

ФИГ. 4


A.
SEQ ID NO: 1010
фуриновая
активационная
последовательность
N
SPD
SPD
N
C
C
QSGQKTLRRKRIIGG
B.
SEQ ID NO: 1011
N
uPA Nterm
uPA Nterm
N
SPD
SPD
WT uPA
активационная
последовательность
C
C
QCGQKTLRPRFKIIGG
C.
SEQ ID NO: 1036
N
uPA Nterm
uPA Nterm
N
SPD
SPD
фуриновая
активационная
последовательность
C
C
QCGQKTLRRRKRIIGG
D.
SEQ ID NO: 1014
uPA Nterm
N
SPD
фуриновая
активационная
последовательность
HSA
C
QCGQKTLRRRKRIIGG
E.
SEQ ID NO: 1015
uPA Nterm
N
SPD
WT uPA
активационная
последовательность
HSA
C
QCGQKTLRPRFKIIGG
F.
SEQ ID NO: 1016
фуриновая
активационная
последовательность
SPD
N
HSA
C
QSGQKTLRRKRIIGG
G.
SEQ ID NO: 1017
SUMO
Активация
SUMO
N
SPD
HSA
C
IEAHREQIGGIIGG
H.
SEQ ID NO: 1018
SUMO
Активация
N
SUMO
SUMO
N
SPD
SPD
C
C
IEAHREQIGGIIGG