(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290593 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.21

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(51) Int. Cl. ***C07K 1/113*** (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ, ПРОДУКЦИЯ И ОЧИСТКА ИНТЕРЛЕЙКИНА

(31) **62/888,144; 62/888,237; 62/887,963; 62/887,933; 62/898,934; 62/898,709; 62/898,899; 62/898,729; PCT/US2019/050708; 62/939,495; 62/970,627; 62/971,126; 62/986,579; 62/986,557; 63/013,309; 63/020,996; 63/033,077; 63/055,886**

(32) **2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16; 2019.08.16; 2019.09.11; 2019.09.11; 2019.09.11; 2019.09.11; 2019.09.11; 2019.11.22; 2020.02.05; 2020.02.06; 2020.03.06; 2020.03.06; 2020.04.21; 2020.05.06; 2020.06.01; 2020.07.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/046545**

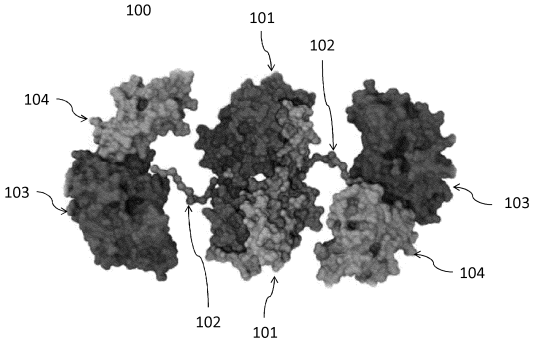
(87) **WO 2021/034727 2021.02.25**

(71) Заявитель:
ЭППЛАЙД МОЛЕКЬЮЛАР ТРАНСПОРТ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Маклин Дерек, Мрсни Рэндалл Дж., Инь Кевин, Махмуд Тахир, Канвар Битту, Порат Амир, Олсон Чарльз, Постлетуэйт Салли, Ким Хиодзин, Фын Вэйцзюнь, Мангат Кушдип, Далзил Шон, Тандале Раджендра, Гаровой Марвин, Коуленг Джон, Бхатт Элизабет, Уитни Джеймс Эндрю (US)

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

(57) В данном документе описаны белки слияния cholix-IL-10 и способы их использования, которые могут характеризоваться отчетливым ответом у индивидуума при введении. Этот отчетливый ответ может включать изменение уровней одного или нескольких маркеров у индивидуума и/или совместную локализацию IL-10 в собственной пластинке индивидуума. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны пероральные лекарственные формы белков слияния cholix-IL-10. В данном документе описаны способы очистки конструкции доставки IL-10, включая способы рефолдинга и обогащения, которые могут приводить к сохранению высокого процентного значения конструкций доставки IL-10 в биологически активной форме димера. В данном документе описаны пероральные лекарственные формы, выполненные с возможностью локализованного высвобождения терапевтического белка в тонком кишечнике или ободочной кишке. В некоторых случаях терапевтический белок находится в форме димера, такого как конструкция доставки IL-10, способная проникать через эпителий кишечника.



202290593 A1

202290593 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573532EA/23

КОМПОЗИЦИИ, ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ, ПРОДУКЦИЯ И ОЧИСТКА ИНТЕРЛЕЙКИНА

Ссылка на родственные заявки

[1] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/888144, поданной 16 августа 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/888237, поданной 16 августа 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/986579, поданной 6 марта 2020 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/887963, поданной 16 августа 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/887933, поданной 16 августа 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/898934, поданной 11 сентября 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/971126, поданной 6 февраля 2020 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/898709, поданной 11 сентября 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/898729, поданной 11 сентября 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/939495, поданной 22 ноября 2019 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/970627, поданной 5 февраля 2020 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/020996, поданной 6 мая 2020 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/033077, поданной 1 июня 2020 года, предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/898899, поданной 11 сентября 2019 года; предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/013309, поданной 21 апреля 2020 года; предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/986557 поданной 6 марта 2020 года; и предварительной заявкой на выдачу патента США № 63/055886, поданной 23 июля 2020 года; причем эти заявки включены в данный документ в виде ссылки.

Список последовательностей

[2] В настоящей заявке содержится список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данный документ в виде ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 12 августа 2020 года, называется 40566-721_601_SL.txt и имеет размер 729 437 байт.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[3] Хотя пероральное введение может быть удобным и желательным путем введения белковых фармацевтических препаратов, проблемы, связанные с этим путем введения, включают кислую среду желудка, которая может вызывать денатурацию структуры белка, включая димеры и гидролиз химических связей, переменный pH в разных областях желудочно-кишечного тракта и наличие протеолитических ферментов, которые секретируются в желудочно-кишечный тракт и расщепляют белки на меньшие фрагменты. Кроме того, даже если белковые фармацевтические препараты способны выдержать эти испытания и неповрежденными попасть в нижний отдел желудочно-

кишечного тракта, таким фармацевтическим препаратам может быть трудно проникнуть через эпителий кишечника из-за их большого размера.

[4] Кроме того, некоторые терапевтические белки являются активными (или более активными) в форме димера. Таким образом, их терапевтическая полезность может быть поставлена под угрозу, если их получают или составляют способом, который не приводит к надлежащей димеризации. Обычные протоколы очистки и обработки могут препятствовать образованию нужного димера, что приводит (например) к чрезмерно высокой доле мономеров или агрегатов.

Сущность изобретения

[5] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны конструкции доставки, состоящие из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки является частью гомодимера. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки находится в композиции, составленной для перорального приема, причем композиция для перорального приема содержит множество конструкций доставки, идентичных конструкции доставки, и при этом по меньшей мере 80% конструкций доставки находятся в форме димера.

[6] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества конструкции доставки, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), целиакию, псориатический артрит или псориаз. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание представляет собой целиакию.

[7] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы рефолдинга конструкции доставки IL-10, причем способ включает: (i) введение в контакт телец включения, содержащих конструкцию доставки IL-10, с солюбилизирующим раствором, содержащим хаотропное средство, с образованием растворимой конструкции доставки IL-10; (ii) введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга, содержащим восстановленный глутатион и окисленный глутатион, с образованием подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10; при этом способ не включает введения в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 со

средством для сульфитолиза или восстанавливающим средством перед введением в контакт на этапе (ii). В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит носитель. В некоторых вариантах осуществления носитель получают из полипептида, секретируемого бактерией. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой Vibrio cholerae. В некоторых вариантах осуществления полипептид, секретируемый Vibrio cholerae, представляет собой полипептид cholix. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

[8] В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга имеет соотношение восстановленного глутатиона и окисленного глутатиона от 0,8:1 до 1,2:1. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит от 0,75 мМ до 1,5 мМ восстановленного глутатиона. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит от 0,25 мМ до 0,75 мМ окисленный глутатион. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга имеет pH от 7,5 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит аргинин, Tris и EDTA. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит аргинин, сахарозу, Tris, EDTA или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления аргинин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 900 мМ до 1,1 М. В некоторых вариантах осуществления сахароза присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 200 мМ до 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления Tris присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 75 мМ до 125 мМ. В некоторых вариантах осуществления EDTA присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 1,75 мМ до 2,25 мМ.

[9] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лизис клетки, содержащей тельца включения. В некоторых вариантах осуществления клеткой является бактерия. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой Escherichia coli. В некоторых вариантах осуществления лизис включает гомогенизацию при высоком давлении. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение телец включения. В некоторых вариантах осуществления хаотропное средство содержит гидрохлорид гуанидина или мочевину. В некоторых вариантах осуществления солюбилизирующий раствор дополнительно содержит Tris. В некоторых вариантах осуществления введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит по меньшей мере в течение 16 часов. В некоторых вариантах осуществления введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит от 12 часов до 18 часов.

[10] В некоторых вариантах осуществления введение в контакт конструкции

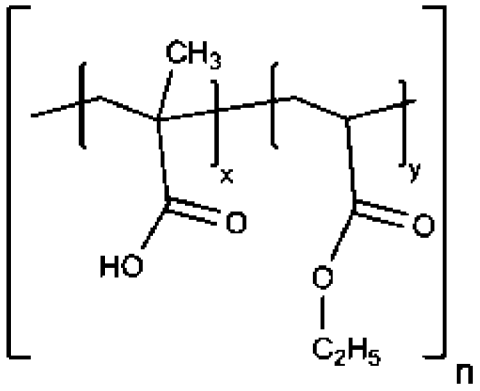
доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит при температуре от 2°C до 8°C. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает первую стерильную фильтрацию подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления первая стерильная фильтрация происходит после введения в контакт с раствором для рефолдинга. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение фильтрации с тангенциальным потоком подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления фильтрация с тангенциальным потоком включает в себя диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления диафильтрация предусматривает первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем и четвертый диаобъем. В некоторых вариантах осуществления первый диаобъем и второй диаобъем содержат холодный буфер. В некоторых вариантах осуществления третий диаобъем и четвертый диаобъем содержат буфер при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления холодный буфер и буфер при комнатной температуре содержат Tris и NaCl.

[11] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы обогащения димерами конструкции доставки IL-10 из пула, содержащего конструкции доставки IL-10 в форме димера, в форме мономера и агрегатной форме, причем способ включает: (i) проведение анионообменной (AEX) хроматографии пула путем связывания димеров конструкции доставки IL-10 с анионообменной колонкой и последующее элюирование димеров конструкции доставки IL-10 из анионообменной колонки, тем самым создавая первое множество фракций, одной из которых является первая фракция, обогащенная конструкциями доставки IL-10 в форме димера; и (ii) проведение хроматографии с керамическим гидроксиапатитом (CHT) фракции, обогащенной конструкциями доставки IL-10 в форме димера, тем самым создавая второе множество фракций, одной из которых является вторая фракция, дополнительно обогащенная конструкциями доставки IL-10 в форме димера. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит носитель. В некоторых вариантах осуществления носитель получают из полипептида, секретируемого бактерией. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой Vibrio cholerae. В некоторых вариантах осуществления полипептид, секретируемый Vibrio cholerae, представляет собой полипептид cholix. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение процентного значения конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции первого множества фракций. В некоторых вариантах осуществления определение проводят с помощью эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионная хроматография представляет собой эксклюзионную высокоэффективную жидкостную

хроматографию (SE-HPLC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение процентного значения конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции второго множества фракций. В некоторых вариантах осуществления определение проводят с помощью эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионная хроматография представляет собой эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75% конструкций доставки IL-10 в первой фракции представляют собой конструкции доставки IL-10 в форме димера. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% конструкций доставки IL-10 во второй фракции представляют собой конструкции доставки IL-10 в форме димера. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение фильтрации с тангенциальным потоком второй фракции. В некоторых вариантах осуществления фильтрация с тангенциальным потоком включает ультрафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение стерильной фильтрации второй фракции. В некоторых вариантах осуществления способ не включает катионообменную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления пул содержит подвергнутые рефолдингу конструкции доставки IL-10.

[12] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны пероральные лекарственные формы, содержащие: (a) конструкции доставки IL-10; (b) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств; и (c) первое покрытие, содержащее два или более сополимера, каждый из которых имеет разный номинальный pH растворения; при этом пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, чтобы по существу не высвобождать конструкции доставки IL-10 после 1-часового воздействия раствора, имеющего pH 1,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме. В некоторых вариантах осуществления раствор, имеющий pH 1,0, представляет собой растворяющую среду, содержащую соляную кислоту. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 40% конструкции доставки IL-10 после 2 часов воздействия раствора, имеющего pH 7,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 25% конструкций доставки IL-10, высвобождаемых после 2 часов воздействия раствора, имеющего pH 7,0, находятся в форме димера. В некоторых вариантах осуществления раствор, имеющий pH 7,0, представляет собой цитратно-фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит носитель. В некоторых вариантах осуществления носитель получают из полипептида, секретируемого бактерией. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой Vibrio cholerae. В некоторых вариантах осуществления полипептид, секретируемый Vibrio cholerae, представляет собой полипептид cholix.

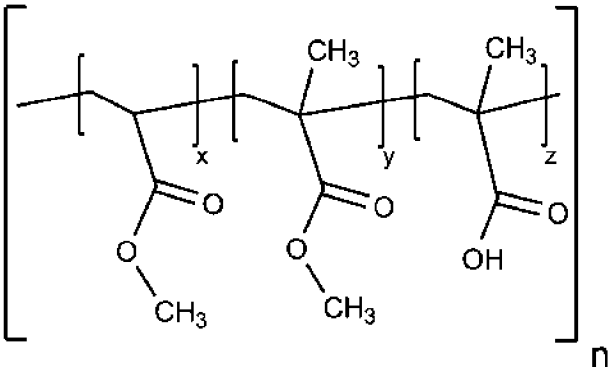
[13] В некоторых вариантах осуществления конструкции доставки IL-10 имеют по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкции доставки IL-10 имеют замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма находится в капсуле или в таблетке. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер имеет по меньшей мере 50% номинальное растворение при pH > 5,5, а второй сополимер имеет по меньшей мере 50% номинальное растворение при pH > 7,0. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления первый полимер имеет средневесовую молекулярную массу от 200000 г/моль до 450000 г/моль или от 250000 г/моль до 400000 г/моль или от 280000 г/моль до 370000 г/моль или от 300000 г/моль до 340000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице.

[14] В некоторых вариантах осуществления соотношение свободных карбоксильных групп и групп сложных эфиров в первом сополимере составляет от 0,8:1 до 1,2:1. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер отличается от первого сополимера. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от 15:85 до 55:45. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй полимер имеет средневесовую молекулярную массу от 160000 г/моль до 400000 г/моль или от 200000 г/моль до 360000 г/моль или от 240000 г/моль до 320000 г/моль или от 260000 г/моль до 300000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



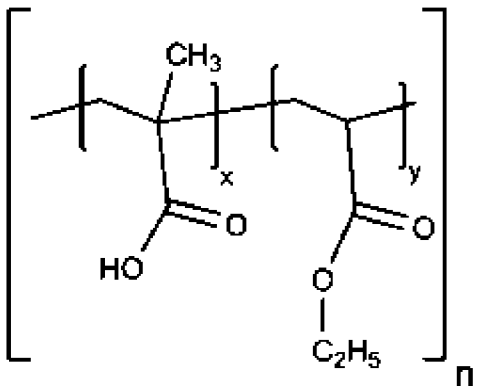
Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице.

[15] В некоторых вариантах осуществления соотношение свободных карбоксильных групп и групп сложных эфиров во втором сополимере составляет от 0,8:1 до 1,2:1. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие дополнительно содержит препятствующее слипанию средство, пластификатор, поверхностно-активное вещество или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит препятствующее слипанию средство, при этом препятствующее слипанию средство содержит моностеарат глицерина. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит пластификатор, при этом пластификатор представляет собой триэтилцитрат. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит поверхностно-активное вещество, при этом поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления от 5% до 15% (м/м) первого покрытия представляет собой смесь моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие имеет толщину, по существу эквивалентную толщине покрытия 60 мг на капсуле 1 размера. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие находится вокруг внутренней части в количестве от 0,1 мг/мм^2 до 0,2 мг/мм^2. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие имеет массу от 30 мг до 60 мг. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма дополнительно содержит второе покрытие снаружи по отношению к первому покрытию. В некоторых вариантах осуществления второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма дополнительно содержит третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи по отношению к конструкциям доставки IL-10 и одному или нескольким фармацевтически приемлемым вспомогательным средствам. В некоторых вариантах осуществления третье покрытие содержит HPMC.

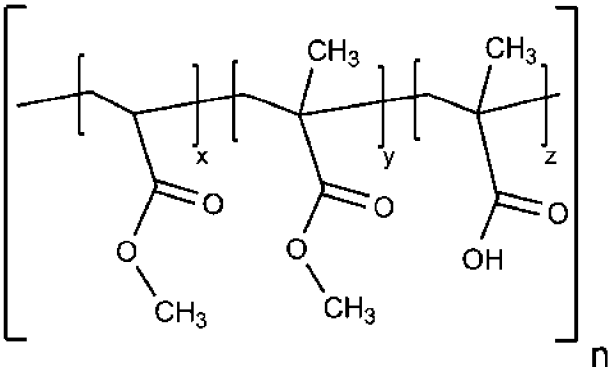
[16] В некоторых вариантах осуществления конструкции доставки IL-10 имеются в пероральной лекарственной форме в количестве от 1 мг до 20 мг. В некоторых вариантах осуществления конструкции доставки IL-10 имеются в пероральной лекарственной форме в количестве 1 мг, 5 мг или 20 мг. В некоторых вариантах осуществления одно или

несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество, осмолит, соль и объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой фосфат калия, объемообразующее средство представляет собой глицин, осмолит представляет собой сахарозу, а поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение осмолита и конструкции доставки IL-10 от 0,45:1 до 0,55:1, предпочтительно приблизительно 0,5:1. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение поверхностно-активного вещества и конструкции доставки IL-10 от 0,12:1 до 0,18:1, предпочтительно приблизительно 0,15:1. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение соли и конструкции доставки IL-10 от 0,05:1 до 0,09:1, предпочтительно приблизительно 0,07:1. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение объемообразующего средства и конструкции доставки IL-10 от 0,8:1 до 1,2:1, предпочтительно приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма является твердой. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма находится в форме единичной дозы. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет срок годности по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяца. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль калия, глицин, сахарозу или трегалозу и полоксамер, при этом полоксамер имеет средневесовую молекулярную массу от 15000 до 25000 дальтон и содержание полиокситилена от 70% до 90% по массе; и при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит: (c) первое покрытие, содержащее первый сополимер, при этом первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице; и дополнительно содержит второй сополимер, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице; при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера составляет 30:70; и при этом первое покрытие дополнительно содержит от 5% до 15% (м/м) смеси моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80; (d) второе покрытие, содержащее HPMC, расположенную снаружи по отношению к первому покрытию; и (e) третье покрытие, содержащее HPMC, расположенную внутри по отношению к первому покрытию и снаружи терапевтического груза и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

[17] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны твердые композиции, содержащие: конструкции доставки IL-10; и одно или несколько вспомогательных средств; при этом каждая из конструкций доставки IL-10 содержит IL-10, соединенный с носителем, который способствует трансцитозу конструкции доставки IL-10 через поляризованную эпителиальную клетку кишечника; и при этом более 80% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера. В некоторых вариантах осуществления твердую композицию лиофилизируют или сушат распылением. В некоторых вариантах осуществления твердая композиция представляет собой таблетку или капсулу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер. В некоторых вариантах осуществления полоксамер представляет собой полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество не содержит полисорбат. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит. В некоторых вариантах осуществления осмолит представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой фосфат калия. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления IL-10 имеет

по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления IL-10 соединен с носителем через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

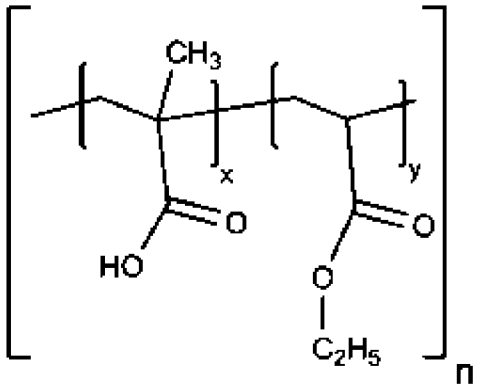
[18] В некоторых вариантах осуществления более 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера. В некоторых вариантах осуществления от 85% до 92% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера. В некоторых вариантах осуществления твердая композиция содержит первое покрытие. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит первый сополимер и второй сополимер, при этом первое покрытие находится снаружи конструкций доставки IL-10 и одного или нескольких вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от приблизительно 15:85 до приблизительно 55:45. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50. В некоторых вариантах осуществления твердая композиция дополнительно содержит второе покрытие снаружи по отношению к первому покрытию. В некоторых вариантах осуществления второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления твердая композиция дополнительно содержит третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи по отношению к конструкциям доставки IL-10 и одному или нескольким вспомогательным средствам. В некоторых вариантах осуществления третье покрытие содержит HPMC.

[19] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны твердые пероральные лекарственные формы, содержащие: (a) конструкцию доставки IL-10, содержащую IL-10, соединенный с носителем, который способствует трансцитозу конструкции доставки IL-10 через поляризованную эпителиальную клетку кишечника; и (b) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в

себя неионное смазывающее вещество; и (c) первое покрытие, окружающее конструкцию доставки IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления неионное смазывающее вещество представляет собой бегенат глицерина. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма не содержит стеарата магния. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет форму таблетки. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, что по существу ни одна из конструкций доставки IL-10 не высвобождается из пероральной лекарственной формы после 1-часового воздействия раствора при pH 1,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 40% конструкции доставки IL-10 после 2 часов воздействия раствора при pH 7,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма дополнительно содержит первое покрытие, содержащее два или более сополимера, каждый из которых имеет разный номинальный pH растворения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45% конструкции доставки IL-10 находится в форме димера. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство, разрыхлитель или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство представляет собой силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC). В некоторых вариантах осуществления разрыхлитель представляет собой кросповидон (сшитый поливинилпирролидон). В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя. В некоторых вариантах осуществления пероральную лекарственную форму получают путем прессования конструкции доставки IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления прессование происходит с усилием прессования от приблизительно 2000 фунтов силы (lbf) до приблизительно 3500 lbf. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит первый сополимер и второй сополимер, при этом первое покрытие находится снаружи конструкций доставки IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат.

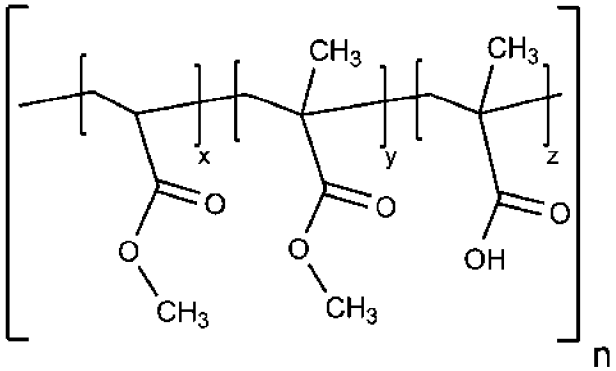
[20] В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от приблизительно 15:85 до

приблизительно 55:45. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50. В некоторых вариантах осуществления твердая пероральная лекарственная форма дополнительно содержит второе покрытие снаружи по отношению к первому покрытию. В некоторых вариантах осуществления второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления твердая пероральная лекарственная форма дополнительно содержит третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи по отношению к конструкциям доставки IL-10 и одному или нескольким фармацевтически приемлемым вспомогательным средствам. В некоторых вариантах осуществления третье покрытие содержит HPMC. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств дополнительно содержат соль калия, глицин, сахарозу или трегалозу и полоксамер, при этом полоксамер имеет средневесовую молекулярную массу от 15000 до 25000 дальтон и содержание полиокситилена от 70% до 90% по массе; и при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит: (c) первое покрытие, содержащее первый сополимер, при этом первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице; и дополнительно содержит второй сополимер, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице; при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера составляет 30:70; и при этом первое покрытие

дополнительно содержит от 5% до 15% (м/м) смеси моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80; (d) второе покрытие, содержащее HPMC, расположенную снаружи по отношению к первому покрытию; и (e) третье покрытие, содержащее HPMC, расположенную внутри по отношению к первому покрытию и снаружи терапевтического груза и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

[21] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны пероральные лекарственные формы, содержащие: (a) IL-10 и (b) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к иммуномодулирующему ответу, выбранному из группы, состоящей из: (i) снижения концентрации фекального кальпротектина (FCP) относительно исходного уровня FCP, (ii) снижения концентрации С-реактивного белка (CRP) относительно исходного уровня CRP, (iii) снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes и (iv) комбинации (i)-(iii). В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение FCP относительно исходного уровня FCP. В некоторых вариантах осуществления концентрацию FCP определяют из образца кала или биопсии ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления снижение концентрации FCP представляет собой снижение по меньшей мере на 20%, 30%, 40% или 50% относительно исходного уровня FCP.

[22] В некоторых вариантах осуществления исходный уровень FCP представляет собой начальную концентрацию FCP у индивидуума перед введением. В некоторых вариантах осуществления начальная концентрация FCP может быть показателем желудочно-кишечного заболевания индивидуума. В некоторых вариантах осуществления начальная концентрация FCP превышает 150 мкг/г. Пероральная лекарственная форма по п. 178 или п. 179, при этом желудочно-кишечное заболевание представляет собой язвенный колит (UC) или болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP снижается по меньшей мере на 50% относительно начальной концентрации FCP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень FCP представляет собой скорректированный по плацебо исходный уровень FCP. В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP снижается по меньшей мере на 20% относительно скорректированный по плацебо исходный уровень FCP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP снижается до 50 мкг/г или менее. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение концентрации CRP относительно исходного уровня CRP. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP представляет собой системную концентрацию CRP. В некоторых вариантах осуществления концентрацию CRP определяют из образца крови. В некоторых вариантах

осуществления снижение концентрации CRP представляет собой снижение по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% относительно исходного уровня CRP. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень CRP представляет собой начальную концентрацию CRP у индивидуума перед введением. В некоторых вариантах осуществления начальная концентрация CRP превышает 5 мг/л. В некоторых вариантах осуществления начальная концентрация CRP является показателем желудочно-кишечного заболевания индивидуума.

[23] В некоторых вариантах осуществления желудочно-кишечное заболевание представляет собой заболевание раздраженного кишечника (IBD). В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP снижается по меньшей мере на 40% относительно начальной концентрации CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень CRP представляет собой скорректированный по плацебо исходный уровень CRP. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP снижается по меньшей мере на 10% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP снижается по меньшей мере на 40% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет приблизительно 1 мг. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP снижается до менее 5 мг/л. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes. В некоторых вариантах осуществления исходным уровнем показателя Geboes является исходный показатель Geboes перед введением. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень показателя Geboes представляет собой скорректированный по плацебо исходный уровень показателя Geboes. В некоторых вариантах осуществления показатель Geboes снижается по меньшей мере на 2 единицы относительно скорректированного по плацебо исходного уровня показателя Geboes, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 30 мг.

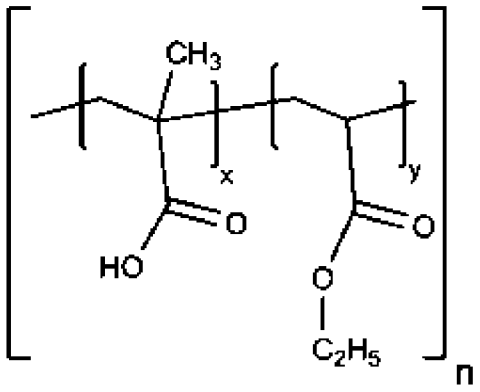
[24] В некоторых вариантах осуществления менее 5% вводимого IL-10 попадает в кровоток индивидуума. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ наблюдается после ежедневного приема дозы пероральной лекарственной формы в течение 14 дней. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет 10 мг или менее. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет от 1 мг до 10 мг, от 3 мг до 10 мг или от 1 мг до 3 мг. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет 1 мг, 3 мг или 10 мг. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма представляет собой капсулу.

[25] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма является биоразлагаемой. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько

фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активным веществом является полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит. В некоторых вариантах осуществления осмолит представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой фосфат калия. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма содержит первое покрытие, при этом первое покрытие находится снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит первый сополимер, содержащий метакриловую кислоту и этилакрилат, и второй сополимер, содержащий метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет приблизительно от 15:85 до 55:45. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50.

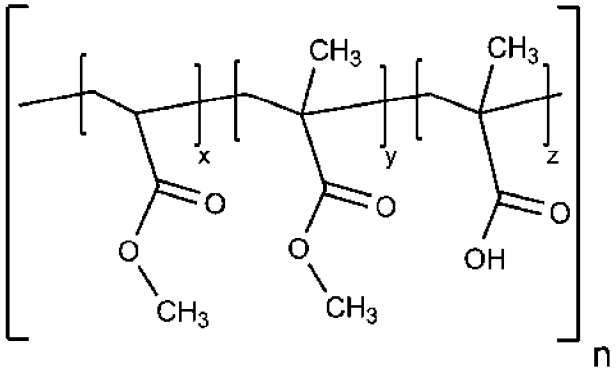
[26] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма дополнительно содержит второе покрытие, расположенное внутри по отношению к первому покрытию и снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма дополнительно содержит третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления третье покрытие содержит HPMC. В некоторых вариантах осуществления IL-10 является частью конструкции доставки IL-10, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит носитель. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль калия, глицин, сахарозу или трегалозу и полоксамер, при этом полоксамер имеет средневесовую молекулярную массу от 15000 до 25000 дальтон и содержание полиокситилена от 70% до 90% по массе; и при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит: (c) первое покрытие, содержащее первый сополимер, при этом

первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице; и дополнительно содержит второй сополимер, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице; при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера составляет 30:70; и при этом первое покрытие дополнительно содержит от 5% до 15% (м/м) смеси моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80; (d) второе покрытие, содержащее HPMC, расположенную снаружи по отношению к первому покрытию; и (e) третье покрытие, содержащее HPMC, расположенную внутри по отношению к первому покрытию и снаружи терапевтического груза и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

[27] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение приводит к иммуномодулирующему ответу, выбранному из группы, состоящей из: (i) снижения концентрации фекального кальпротектина (FCP) относительно исходного уровня FCP, (ii) снижения концентрации С-реактивного белка (CRP) относительно исходного уровня CRP, (iii) снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показатель Geboes и (iv) комбинации (i)-(iii). В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит,

воспалительное заболевание кишечника (IBD), проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, целиакию, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, псориатический артрит или псориаз.

[28] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы модуляции биомаркера у индивидуума с воспалительным заболеванием, причем способ включает введение индивидууму пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом биомаркер выбирают из группы, состоящей из: фекального кальпротектина (FCP), С-реактивного белка (CRP) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к снижению концентрации FCP относительно исходного уровня FCP. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к снижению концентрации CRP относительно исходного уровня CRP. В некоторых вариантах осуществления введение дополнительно приводит к снижению показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено лечение индивидуума с воспалительным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, целиакию, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, псориатический артрит или псориаз.

[29] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у индивидуума, трудно поддающегося лечению или резистентного по меньшей мере к одному противовоспалительному средству, причем способ включает введение индивидууму лекарственной формы, содержащей IL-10. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительным средством является аминосалицилат. В некоторых вариантах осуществления аминосалицилат выбирают из группы, состоящей из 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA; месалазин), 4-аминосалациловой кислоты (4-ASA), балсалазида, олсалазина и сульфасалазина. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой преднизолон. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой вводимый перорально кортикостероид или вводимый внутривенно (IV) кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительным средством является иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант выбирают из группы, состоящей из азатиоприна, 6-меркаптопурина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой ингибитор TNFα. В некоторых вариантах осуществления ингибитор TNFα выбирают из группы, состоящей из адалимумаба, цертолизумаба, этанерцепта, голимумаба и инфликсимаба.

[30] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор янус-киназы (JAK). В некоторых вариантах осуществления ингибитор JAK выбирают из группы, состоящей из филготиниба, упадацитиниба, пефицитиниба и тофацитиниба. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой антагонист рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P). В некоторых вариантах осуществления антагонист рецептора S1P выбирают из группы, состоящей из озанимода, амизелимода и этрасимода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой блокатор интегрина. В некоторых вариантах осуществления блокатор интегрина выбирают из группы, состоящей из этролизумаба, натализумаба, ведолизумаба, абрилумаба и метилкаротеграста. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор IL-23. В некоторых вариантах осуществления ингибитор IL-23 выбирают из группы, состоящей из устекинумаба, мирикизумаба, бразикумаба, гуселкумаба и рисанкизумаба. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор фосфодиэстеразы 4 (PDE4). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ингибитор PDE4 выбирают из группы, состоящей из апремиласта, циломиласта, рофлумиласта, тетомиласта и ролипрама. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой лаквинимод.

[31] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы рефолдинга конструкции доставки IL-10, причем способ включает: (i) введение в контакт телец включения, содержащих конструкцию доставки IL-10, с солюбилизирующим раствором, содержащим хаотропное средство, с образованием растворимой конструкции доставки IL-10; (ii) введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с восстанавливающим средством для сульфитолиза с образованием восстановленной конструкции доставки IL-10; и (iii) введение в контакт восстановленной конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга, содержащим восстановленный глутатион и окисленный глутатион, с образованием подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы рефолдинга конструкции доставки IL-10, причем способ включает: (i) введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с восстанавливающим средством для сульфитолиза, содержащим сульфит натрия, с образованием восстановленной конструкции доставки IL-10; (ii) введение в контакт восстановленной конструкции доставки IL-10 с тетратионатом калия; (iii) очистку восстановленной конструкции доставки IL-10 с помощью глубинной фильтрации с образованием очищенной конструкции доставки IL-10; (iv) проведение ультрафильтрации с последующей диафильтрацией очищенной конструкции доставки IL-10; и (v) введение в контакт очищенной конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга, содержащим: от 0,8 мМ до 1,2 мМ восстановленного глутатиона, от 0,4 мМ до 0,6 мМ окисленного

глутатиона, от 800 мМ до 1,2М аргинина, от 200 мМ до 300 мМ сахарозы, от 75 мМ до 125 мМ Tris и от 1,5 мМ до 2,5 мМ EDTA, при этом раствор для рефолдинга содержит буферное вещество для pH от 7,5 до 8,5 с образованием подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10, и при этом введение в контакт с раствором для рефолдинга происходит по меньшей мере в течение 16 часов. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающее средство для сульфитолиза содержит сульфит натрия.

[32] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны пероральные лекарственные формы, содержащие IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение индивидууму дозы пероральной лекарственной формы от приблизительно 1 мг до приблизительно 60 мг приводит к более 20% увеличению концентрации IL-1Ra в плазме у индивидуума относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у индивидуума, включающие введение индивидууму дозы пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение приводит к более 20% увеличению концентрации IL-1Ra в плазме у индивидуума относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 30 мг, а увеличение концентрации IL-1Ra в плазме относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме составляет более 30%. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 30 мг, а увеличение концентрации IL-1Ra в плазме относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме составляет от 30% до 45%, от 30% до 35% или от 40% до 43%. В некоторых вариантах осуществления введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к концентрации IL-10 в плазме у индивидуума, не превышающей 1500 пг/мл, 1000 пг/мл, 500 пг/мл, 100 пг/мл или 10 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления введение пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к совместной локализации IL-10 с клеткой, экспрессирующей CD3, в собственной пластинке индивидуума. В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD3, представляет собой лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления введение пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к совместной локализации IL-10 с макрофагом в собственной пластинке индивидуума. В некоторых вариантах осуществления введение пероральной лекарственной формы индивидууму не приводит к совместной локализации IL-10 с клеткой в собственной пластинке индивидуума, при этом клетка выбрана из группы, состоящей из дендритной клетки, В-лимфоцита, эндотелиальной клетки и их комбинации.

[33] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны пероральные лекарственные формы, содержащие IL-10 и одно или несколько

фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к увеличению концентрации IL-1Ra в плазме индивидуума по меньшей мере на 5000 пг/мл относительно исходного уровня и по меньшей мере к одному из следующего: (1) к пиковой концентрации IL-10 в плазме менее 50 пг/мл и (2) к совместной локализации IL-10 с клеткой, экспрессирующей CD3, в собственной пластинке индивидуума. В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у индивидуума, включающие введение индивидууму пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение приводит к увеличению концентрации IL-1Ra в плазме индивидуума по меньшей мере на 5000 пг/мл относительно исходного уровня и по меньшей мере к одному из следующего (1) к пиковой концентрации IL-10 в плазме менее 50 пг/мл и (2) совместной локализации IL-10 с клеткой, экспрессирующей CD3, в собственной пластинке индивидуума. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит или псориаз. В некоторых вариантах осуществления пиковой концентрации IL-1Ra в плазме индивидуума достигают через 2-4 часы или 2-3 часа после введения. В некоторых вариантах осуществления введение пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к пиковой концентрации IL-10 в плазме индивидуума менее 10 пг/мл, 2,5 пг/мл или 1,5 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-1Ra достигает максимума от 25000 пг/мл до 28000 пг/мл. В некоторых вариантах осуществления введение пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к увеличению соотношения экспрессии IL-Ra и интерлейкина 1 бета в ткани толстой кишки индивидуума. В некоторых вариантах осуществления соотношение IL-1Ra и IL-1 бета составляет по меньшей мере 2:1. В некоторых вариантах осуществления введение пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к увеличению экспрессии агониста рецептора интерлейкина 1 (IL-1Ra) в ткани толстой кишки индивидуума.

[34] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны неприродные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления неприродная нуклеиновая кислота имеет последовательность со 100% идентичностью с SEQ ID NO: 10.

[35] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны твердые пероральные лекарственные формы, содержащие (i) конструкцию доставки IL-10, содержащую IL-10, соединенный с носителем, который способствует трансцитозу конструкции доставки IL-10 через поляризованную эпителиальную клетку кишечника; (ii) одно или несколько вспомогательных средств, при этом одно или несколько

вспомогательных средств включают в себя неионное смазывающее вещество; и (iii) первое покрытие, окружающее конструкцию доставки IL-10 и одно или несколько вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления неионное смазывающее вещество представляет собой бегенат глицерина. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма не содержит ионного поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма не содержит стеарата магния. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма имеет форму таблетки.

[36] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, что по существу ни одна из конструкций доставки IL-10 не высвобождается из пероральной лекарственной формы после 1-часового воздействия раствора при pH 1,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 40% конструкции доставки IL-10 после 2 часов воздействия раствора при pH 7,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие содержит смесь полимеров, каждый из которых имеет разный номинальный pH растворения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 45% конструкции доставки IL-10 находится в форме димера.

[37] В некоторых вариантах осуществления одно или несколько вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство, разрыхлитель или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство представляет собой силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC). В некоторых вариантах осуществления разрыхлитель представляет собой кросповидон (сшитый поливинилпирролидон). В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 13.

[38] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны пероральные лекарственные формы в форме таблетки, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, инкапсулированных кишечнорастворимым покрытием, при этом через 1 ч погружения пероральной лекарственной формы в раствор при pH 7,0 в устройстве для растворения 4 типа процентное содержание IL-10 в форме димера составляет по меньшей мере 45%. В некоторых вариантах осуществления раствор при pH 7,0 представляет собой цитратно-фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие имеет толщину от 4 мг/см^2 до 20 мг/см^2, от 4 мг/см^2 до 6 мг/см^2, от 5 мг/см^2 до 10 мг/см^2

или от 5 мг/см^2 до 20 мг/см^2. В некоторых вариантах осуществления IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2.

[39] В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активным веществом является полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит. В некоторых вариантах осуществления осмолит представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой фосфат калия. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств содержит по меньшей мере одно уплотняющее вспомогательное средство. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно уплотняющее вспомогательное средство содержит объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство представляет собой силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно уплотняющее вспомогательное средство содержит разрыхлитель. В некоторых вариантах осуществления разрыхлитель представляет собой кросповидон (сшитый поливинилпирролидон). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно уплотняющее вспомогательное средство содержит смазывающее вещество. В некоторых вариантах осуществления смазывающее вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой бегенат глицерина. В некоторых вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой дибегенат глицерина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно уплотняющее вспомогательное средство содержится во внутригранулярной фазе, внегранулярной фазе или их комбинации.

[40] В некоторых вариантах осуществления пероральную лекарственную форму получают путем прессования IL-10 и по меньшей мере одного уплотняющего вспомогательного средства. В некоторых вариантах осуществления прессование происходит с усилием прессования от приблизительно 2000 фунтов силы (lbf) до приблизительно 3500 lbf.

[41] В некоторых вариантах осуществления IL-10 является частью конструкции доставки IL-10, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления IL-10 является частью конструкции доставки IL-10, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 13.

[42] В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие содержит первый сополимер и второй сополимер, при этом кишечнорастворимое покрытие находится снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в кишечнорастворимом покрытии составляет от приблизительно 50:50 до приблизительно 20:80 по массе. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в кишечнорастворимом покрытии составляет от приблизительно 25:75 до приблизительно 35:65 по массе. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие составляет от 5% до 12% массы пероральной лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие составляет не более 12% массы пероральной лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма дополнительно содержит второе кишечнорастворимое покрытие, расположенное внутри кишечнорастворимого покрытия и снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления второе кишечнорастворимое покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления второе кишечнорастворимое покрытие составляет от 3% до 5% массы пероральной лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание IL-10 в форме димера составляет по меньшей мере 45%, когда пероральная лекарственная форма имеет твердую форму.

[43] В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие содержит сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCAS), при этом кишечнорастворимое покрытие находится снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления HPMCAS содержит первый HPMCAS и второй HPMCAS. В некоторых вариантах осуществления первый HPMCAS растворяется при pH больше или равном 6,8. В некоторых вариантах осуществления первый HPMCAS содержит HPMCAS-HF. В некоторых вариантах осуществления второй HPMCAS растворяется при pH больше или равном 6,0. В некоторых вариантах осуществления второй HPMCAS содержит HPMCAS-MF. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого HPMCAS и второго

HPMCAS составляет от приблизительно 40:60 до приблизительно 60:40.

[44] В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы, включающие введение любой из лекарственных форм, описанных в данном документе, для лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом индивидуума. Аналогично, в данном документе раскрыты конструкции доставки IL-10 или лекарственные формы, описанные в данном документе, для использования при лечении заболевания или состояния у нуждающегося в этом индивидуума. Аналогично, в данном документе раскрыто применение конструкции доставки IL-10, раскрытой в данном документе, для изготовления лекарства для лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом индивидуума. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние выбрано из группы, включающей в себя язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), целиакию, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, псориатический артрит и псориаз.

[45] В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты твердые композиции, содержащие: конструкции доставки IL-10; и одно или несколько вспомогательных средств; при этом каждая из конструкций доставки IL-10 содержит IL-10, соединенный с носителем, который способствует трансцитозу конструкции доставки IL-10 через поляризованную эпителиальную клетку кишечника; и при этом более 80% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, содержащую позиции 1-386 согласно любой из SEQ ID NO: 20-146. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, содержащую позиции 1-386 SEQ ID NO: 147.

[46] В некоторых вариантах осуществления твердая композиция представляет собой таблетку или капсулу. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько вспомогательных средств включают в себя полоксамер 188, сахарозу, фосфат калия, глицин или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления IL-10 соединен с носителем через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления более 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера. В некоторых вариантах осуществления от 85% до 92% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера.

[47] В некоторых вариантах осуществления твердая композиция содержит

кишечнорастворимое покрытие. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие содержит первый сополимер и второй сополимер, при этом кишечнорастворимое покрытие находится снаружи конструкции доставки IL-10 и одного или нескольких вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в кишечнорастворимом покрытии составляет от приблизительно 50:50 до приблизительно 20:80. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в кишечнорастворимом покрытии составляет от приблизительно 25:75 до приблизительно 35:65.

[48] В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы рефолдинга конструкции доставки IL-10, причем способ включает: (i) введение в контакт телец включения, содержащих конструкцию доставки IL-10, с солюбилизирующим раствором, содержащим хаотропное средство, с образованием растворимой конструкции доставки IL-10; (ii) введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга, содержащим восстановленный глутатион и окисленный глутатион, с образованием подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10; при этом способ не включает введения в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 со средством для сульфитолиза или восстанавливающим средством перед введением в контакт на этапе (ii). В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит IL-10, соединенный с носителем. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, содержащую позиции 1-386 согласно любой из SEQ ID NO: 20-146. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, содержащую позиции 1-386 SEQ ID NO: 147.

[49] В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга имеет соотношение (м/м) восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону от 0,8:1 до 1,2:1. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит от 0,75 мМ до 1,5 мМ восстановленного глутатиона. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит от 0,25 мМ до 0,75 мМ окисленного глутатиона. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит pH от 7,5 до 8,5. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит аргинин, Tris и EDTA. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит аргинин, сахарозу, Tris, EDTA или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления аргинин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 900 мМ до 1,1 М. В

некоторых вариантах осуществления сахароза присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 200 мМ до 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления Tris присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 75 мМ до 125 мМ. В некоторых вариантах осуществления EDTA присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 1,75 мМ до 2,25 мМ.

[50] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лизис клетки, содержащей тельца включения. В некоторых вариантах осуществления клеткой является бактерия. В некоторых вариантах осуществления бактерия представляет собой Escherichia coli. В некоторых вариантах осуществления лизис включает гомогенизацию при высоком давлении. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение телец включения. В некоторых вариантах осуществления хаотропное средство содержит гидрохлорид гуанидина или мочевину. В некоторых вариантах осуществления солюбилизирующий раствор дополнительно содержит Tris.

[51] В некоторых вариантах осуществления введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит по меньшей мере в течение 16 часов. В некоторых вариантах осуществления введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит от 12 часов до 18 часов. В некоторых вариантах осуществления введение в контакт конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит при температуре от 2°C до 8°C. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает первую стерильную фильтрацию подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления первая стерильная фильтрация происходит после введения в контакт с раствором для рефолдинга. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение фильтрации с тангенциальным потоком подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления фильтрация с тангенциальным потоком включает в себя диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления диафильтрация предусматривает первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем и четвертый диаобъем. В некоторых вариантах осуществления первый диаобъем и второй диаобъем содержат холодный буфер. В некоторых вариантах осуществления третий диаобъем и четвертый диаобъем содержат буфер при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления холодный буфер и буфер при комнатной температуре содержат Tris и NaCl.

[52] В некоторых вариантах осуществления димеры конструкции доставки IL-10 можно хранить в буфере, например при 25°C в течение двух дней. Такой буфер может содержать соль, такую как 1X PBS, 150 мМ или 200 мМ NaCl, забуференную 10 мМ фосфата натрия при pH 7,0. Димеры конструкции доставки IL-10 могут быть более стабильными при хранении в буфере, содержащем соль, такую как 1X PBS, 150 мМ или 200 мМ NaCl, забуференную 10 мМ фосфата натрия, при pH 7,0 чем в буфере, содержащем только 10 мМ фосфата натрия при pH 7,0.

[53] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы

обогащения димерами конструкции доставки IL-10 из пула, содержащего конструкции доставки IL-10 в форме димера, в форме мономера и агрегатной форме, причем способ включает: (i) проведение анионообменной (AEX) хроматографии пула путем связывания димеров конструкции доставки IL-10 с анионообменной колонкой и последующее элюирование димеров конструкции доставки IL-10 из анионообменной колонки, тем самым создавая первое множество фракций, одной из которых является первая фракция, обогащенная конструкциями доставки IL-10 в форме димера; и (ii) проведение хроматографии с керамическим гидроксиапатитом (CHT) фракции, обогащенной конструкциями доставки IL-10 в форме димера, тем самым создавая второе множество фракций, одной из которых является вторая фракция, дополнительно обогащенная конструкциями доставки IL-10 в форме димера. В некоторых вариантах осуществления каждая из конструкций доставки IL-10 содержит IL-10, соединенный с носителем. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, содержащую позиции 1-386 согласно любой из SEQ ID NO: 20-146. В некоторых вариантах осуществления носитель содержит аминокислотную последовательность, содержащую позиции 1-386 SEQ ID NO: 147.

[54] В некоторых случаях способ может включать проведение катионообменной хроматографии, например, на колонке Sulfate 650F. Этап катионообменной хроматографии можно проводить после этапа анионообменной хроматографии и этапа очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT), перед этапом анионообменной хроматографии и этапом очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT) или между этапом анионообменной хроматографии и этапом очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT).

[55] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение процентного значения конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции первого множества фракций. В некоторых вариантах осуществления определение проводят с помощью эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионная хроматография представляет собой эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение процентного значения конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции второго множества фракций. В некоторых вариантах осуществления определение проводят с помощью эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионная хроматография представляет собой эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC).

[56] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 75% конструкций доставки IL-10 в первой фракции представляют собой конструкции доставки IL-10 в

форме димера. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% конструкций доставки IL-10 во второй фракции представляют собой конструкции доставки IL-10 в форме димера. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение фильтрации с тангенциальным потоком второй фракции. В некоторых вариантах осуществления фильтрация с тангенциальным потоком включает ультрафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает диафильтрацию. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение стерильной фильтрации второй фракции. В некоторых вариантах осуществления способ не включает катионообменную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления пул содержит подвергнутые рефолдингу конструкции доставки IL-10, полученные любым из способов, описанных в данном документе.

[57] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у индивидуума, трудно поддающегося лечению или резистентного по меньшей мере к одному противовоспалительному средству, причем способ включает введение индивидууму лекарственной формы, содержащей IL-10. Аналогично, в данном документе раскрыты конструкции доставки IL-10 или лекарственные формы, описанные в данном документе, для использования при лечении воспалительного заболевания у индивидуума, трудно поддающегося лечению или резистентного по меньшей мере к одному противовоспалительному средству. Аналогично, в данном документе раскрыто использование конструкции доставки IL-10, раскрытой в данном документе, для изготовления лекарства для лечения воспалительного заболевания у индивидуума, трудно поддающегося лечению или резистентного по меньшей мере к одному противовоспалительному средству. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительным средством является аминосалицилат. В некоторых вариантах осуществления аминосалицилат выбирают из группы, состоящей из 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA; месалазин), 4-аминосалициловой кислоты (4-ASA), балсалазида, олсалазина и сульфасалазина. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой преднизолон. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой вводимый перорально кортикостероид или вводимый внутривенно (IV) кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительным средством является иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант выбирают из группы, состоящей из азатиоприна, 6-меркаптопурина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой ингибитор TNFα. В некоторых вариантах осуществления ингибитор TNFα выбирают из группы, состоящей из адалимумаба, цертолизумаба, этанерцепта, голимумаба и инфликсимаба. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор янус-киназы (JAK). В некоторых вариантах осуществления ингибитор JAK выбирают из группы, состоящей из филготиниба, упадацитиниба,

пефицитиниба и тофацитиниба. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой антагонист рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P). В некоторых вариантах осуществления антагонист рецептора S1P выбирают из группы, состоящей из озанимода, амизелимода и этрасимода. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой блокатор интегрина. В некоторых вариантах осуществления блокатор интегрина выбирают из группы, состоящей из этролизумаба, натализумаба, ведолизумаба, абрилумаба и метилкаротеграста. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор IL-23. В некоторых вариантах осуществления ингибитор IL-23 выбирают из группы, состоящей из устекинумаба, мирикизумаба, бразикумаба, гуселкумаба и рисанкизумаба. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор фосфодиэстеразы 4 (PDE4). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ингибитор PDE4 выбирают из группы, состоящей из апремиласта, циломиласта, рофлумиласта, тетомиласта и ролипрама. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой лаквинимод. В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму вводят индивидууму ежедневно по меньшей мере в течение 5, 7, 10, 12 или 14 дней.

[58] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит или псориаз. В некоторых вариантах осуществления IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из: полисорбат 80, полисорбат 20 и полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит. В некоторых вариантах осуществления осмолит выбирают из группы, состоящей из сахарозы и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль. В некоторых вариантах осуществления соль выбрана из группы, состоящей из фосфата калия, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида магния и сульфата натрия. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство выбрано из группы, состоящей из: глицина и маннитола. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько

фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя разрыхлитель. В некоторых вариантах осуществления разрыхлитель выбирают из группы, состоящей из: микрокристаллической целлюлозы (MCC), силикатированной микрокристаллической целлюлозы (SMCC), крахмала, натрия крахмала гликолята, вигума, бентонита, альгиновой кислоты, альгината кальция, кроскармеллозы натрия (сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия) и кросповидона (сшитого поливинилпирролидона). В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя средство связывания. В некоторых вариантах осуществления средство связывания выбрано из группы, состоящей из: сахарозы, лактозы, крахмала, целлюлозы, желатина, поливинилпирролидона (PVP) и полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя смазывающее вещество. В некоторых вариантах осуществления смазывающее вещество выбрано из группы, состоящей из: стеарата магния, бегената глицерина, дибегената глицерина, стеарилфумерата натрия, стеариновой кислоты, талька, диоксида кремния, стеарата кальция, карбоната магния, гидрогенизированного масла, минерального масла, полиэтиленгликоля (PEG) и глицерилмоностеарата.

[59] В некоторых вариантах осуществления IL-10 является частью конструкции доставки IL-10, содержащей IL-10, соединенный с носителем. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит линкер, связывающий IL-10 с носителем. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления носитель имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления при контакте с клеткой носитель способствует эндоцитозу или трансцитозу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эпителиальную клетку кишечника. В некоторых вариантах осуществления эпителиальная клетка кишечника представляет собой поляризованную эпителиальную клетку кишечника.

[60] В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма представляет собой пероральную лекарственную форму. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма представляет собой капсулу или таблетку. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма содержит первое покрытие, содержащее первый сополимер и второй сополимер, при этом первое покрытие находится снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит

метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления соотношение (м/м) первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от 0,8:1 до 1,2:1. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой пероральное введение.

[61] В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы предотвращения рецидива воспалительного заболевания у индивидуума в стадии ремиссии воспалительного заболевания, включающие введение индивидууму лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит или псориаз.

[62] В некоторых вариантах осуществления IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из: полисорбата 80, полисорбата 20 и полоксамера 188. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит. В некоторых вариантах осуществления осмолит выбирают из группы, состоящей из сахарозы и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль. В некоторых вариантах осуществления соль выбрана из группы, состоящей из фосфата калия, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида магния и сульфата натрия. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления объемообразующее средство выбрано из группы, состоящей из: глицина и маннитола. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя разрыхлитель. В некоторых вариантах осуществления разрыхлитель выбирают из группы, состоящей из: микрокристаллической целлюлозы (MCC), силикатированной микрокристаллической целлюлозы (SMCC), крахмала, натрия крахмала гликолята, вигума, бентонита, альгиновой кислоты, альгината кальция, кроскармеллозы натрия (сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия) и кросповидона (сшитого поливинилпирролидона). В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя средство связывания. В некоторых вариантах осуществления средство связывания

выбрано из группы, состоящей из: сахарозы, лактозы, крахмала, целлюлозы, желатина, поливинилпирролидона (PVP) и полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя смазывающее вещество. В некоторых вариантах осуществления смазывающее вещество выбрано из группы, состоящей из: стеарата магния, бегената глицерина, дибегената глицерина, стеарилфумерата натрия, стеариновой кислоты, талька, диоксида кремния, стеарата кальция, карбоната магния, гидрогенизированного масла, минерального масла, полиэтиленгликоля (PEG) и глицерилмоностеарата.

[63] В некоторых вариантах осуществления IL-10 является частью конструкции доставки IL-10, содержащей IL-10, соединенный с носителем. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит линкер, связывающий IL-10 с носителем. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления носитель имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления при контакте с клеткой носитель способствует эндоцитозу или трансцитозу конструкции доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эпителиальную клетку кишечника. В некоторых вариантах осуществления эпителиальная клетка кишечника представляет собой поляризованную эпителиальную клетку кишечника.

[64] В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма представляет собой пероральную лекарственную форму. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма представляет собой капсулу или таблетку. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма содержит первое покрытие, содержащее первый сополимер и второй сополимер, при этом первое покрытие находится снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. В некоторых вариантах осуществления соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от 0,8:1 до 1,2:1. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой пероральное введение.

[65] В некоторых вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает пероральное введение субъекту терапевтического средства IL-10 и введение субъекту иммуносупрессора, отличного от IL-10. В других вариантах

осуществления в настоящем раскрытии представлен способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает пероральное введение субъекту терапевтического средства IL-10, при этом субъект одновременно получает иммуносупрессор, отличный от IL-10. В дополнительных вариантах осуществления в настоящем раскрытии представлен способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, при этом у субъекта наблюдался неадекватный ответ на иммуносупрессор, отличный от IL-10, причем способ включает пероральное введение субъекту терапевтического средства IL-10.

[66] В некоторых случаях способ дополнительно включает введение иммуносупрессора, отличного от IL-10, с терапевтическим средством IL-10. В некоторых случаях субъект получал лечение иммуносупрессором, отличным от IL-10, по меньшей мере в течение 6 недель перед определением неадекватного ответа. В некоторых случаях субъект получал лечение иммуносупрессором, отличным от IL-10, по меньшей мере в течение 12 недель перед определением неадекватного ответа. В некоторых случаях неадекватный ответ представляет собой частичный ответ.

[67] В некоторых случаях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: воспалительного заболевания кишечника, псориаза, бляшечного псориаза, гнойного гидраденита, псориатического артрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бактериального сепсиса, болезни Крона, фистулизирующей болезни Крона, язвенного колита средней и тяжелой степени, язвенного колита легкой и средней степени, язвенного колита, коллагенового колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, синдрома Бехчета, неуточненного колита, панкреатита, воспаления печени, резервуарного илеита, проктита, увеита, болезни «трансплантат против хозяина» и повреждения эпителиальных клеток. В некоторых случаях воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В некоторых случаях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: ревматоидного артрита, язвенного колита и болезни Крона.

[68] В некоторых случаях воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, и у субъекта с неадекватным ответом имеется один или несколько суставов с активным заболеванием. В некоторых случаях один или несколько суставов с активным заболеванием идентифицируют с помощью флюоресцентной оптической визуализации или магнитно-резонансной томографии. В некоторых случаях у субъекта с неадекватным ответом дополнительно имеется два или более болезненных сустава. В некоторых случаях у субъекта с неадекватным ответом дополнительно имеется два или более опухающих сустава.

[69] В некоторых случаях воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит, и у субъекта с неадекватным ответом имеется язвенный колит от умеренной до тяжелой степени. В некоторых случаях у субъекта с неадекватным ответом имеется показатель по модифицированной клинической шкале Мэйо (MMS) от

приблизительно 4 баллов до приблизительно 9 баллов. В некоторых случаях у субъекта с неадекватным ответом имеется централизованно считываемый эндоскопический дополнительный показатель MCS 2 степени или выше. В некоторых случаях у субъекта с неадекватным ответом имеется дополнительный показатель ректального кровотечения MMS 1 балл или выше. В некоторых случаях у субъекта с неадекватным ответом болезнь распространяется на 15 см и более от анального края. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, при этом терапевтическим средством IL-10 является конструкция доставки IL-10.

[70] В некоторых случаях конструкция доставки IL-10 содержит носитель, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях конструкция доставки IL-10 содержит носитель, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях конструкция доставки IL-10 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

[71] В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, представляет собой ингибитор TNF альфа. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа представляет собой моноклональное антитело. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа выбирают из группы, состоящей из инфликсимаба (Remicade), адалимумаба (Humira) и голимумаба (Simponi). В некоторых случаях ингибитор TNF альфа содержит SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 152. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа содержит SEQ ID NO: 153 и SEQ ID NO: 154. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа не является этанерцептом.

Включение в виде ссылки

[72] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

[73] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным чертежом (чертежами) будут предоставлены Ведомством по запросу и с уплатой необходимой пошлины. Различные признаки раскрытия подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего раскрытия будет получено при обращении к следующему подробному описанию, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы раскрытия, и к сопровождающим чертежам, на которых:

[74] На Фиг. 1 представлена структура гомодимера конструкции доставки IL-10-cholix (димера, содержащего две идентичные субъединицы SEQ ID NO: 5), определенная с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS).

[75] На Фиг. 2A-2B представлен иллюстративный процесс экспрессии, рефолдинга и очистки IL-10 или конструкций доставки IL-10. На Фиг. 2A представлен

иллюстративный процесс экспрессии, рефолдинга и очистки IL-10 или конструкций доставки IL-10 с этапом сульфитолиза. На Фиг. 2B представлен иллюстративный процесс экспрессии, рефолдинга и очистки IL-10 или конструкций доставки IL-10 без этапа сульфитолиза.

[76] На Фиг. 3 представлена адаптированная система SHIME®, моделирующая физиологические условия желудка, тонкой и ободочной кишки в одном и том же реакторе с течением времени.

[77] На Фиг. 4 представлен профиль pH смоделированного желудочно-кишечного тракта натощак. Стрелки показывают время и соответствующий pH образцов, взятых во время фазы инкубации в желудке (ST0; ST45) и фазы инкубации в тонкой кишке (SI0; SI0,5; SI1; SI1,5; SI2; SI3).

[78] На Фиг. 5A-5E представлено среднее высвобождение кофеина (мг) из капсул 1 размера с различными композициями покрытия и толщиной покрытия, как показано с помощью лекарственных форм в виде капсул в Таблице 12. Среднее высвобождение определяли из 3 отдельных капсул. Моменты времени с условиями, моделирующими желудок, представлены как ST0 и ST45. Моменты времени с условиями, моделирующими тонкую кишку, представлены как SI0, SI0,5, SI1, SI1,5, SI2 и SI3. Моменты времени с условиями, моделирующими ободочную кишку, представлены как C0, C0,5, C1, C1,5, C2, C3, C4 и C18. На Фиг. 5A представлено высвобождение кофеина из капсулы лекарственной формы A. Отличия образцов по сравнению с их предыдущим образцом отмечены звездочкой (*), которая отображает статистически значимое изменение ($p<0,05$). Визуальные оценки капсул указаны над столбиками (1: капсула целая; 2: капсула повреждена, но почти весь продукт все еще находится в капсуле; 3: капсула повреждена, весь продукт высвобожден; 4: капсула разрушена). На Фиг. 5B представлено высвобождение кофеина из капсулы лекарственной формы B. На Фиг. 5C представлено высвобождение кофеина из капсулы лекарственной формы C. На Фиг. 5D представлено высвобождение кофеина из капсулы лекарственной формы D. На Фиг. 5E представлено высвобождение кофеина из капсулы лекарственной формы E.

[79] На Фиг. 6A-6C представлено процентное высвобождение кофеина из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 7,0. На Фиг. 6A представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий A-B капсул. На Фиг. 6B представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий C-F капсул. На Фиг. 6C представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[80] На Фиг. 7A-7C представлено процентное высвобождение кофеина из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 6,5. На Фиг. 7A представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий A-B капсул. На Фиг. 7B представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий C-F капсул. На Фиг. 7C представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[81] На Фиг. 8A-8C представлено процентное высвобождение кофеина из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 6,0. На Фиг. 8A представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий A-B капсул. На Фиг. 8B представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий C-F капсул. На Фиг. 8C представлено процентное высвобождение кофеина из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[82] На Фиг. 9A-9C представлено процентное высвобождение целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 7,0. На Фиг. 9A представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий A-B капсул. На Фиг. 9B представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий C-F капсул. На Фиг. 9C представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[83] На Фиг. 10A-10C представлено процентное высвобождение целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 6,5. На Фиг. 10A представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий A-B капсул. На Фиг. 10B представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий C-F капсул. На Фиг. 10C представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[84] На Фиг. 11A-11C представлено процентное высвобождение целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 6,0. На Фиг. 11A представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий A-B капсул. На Фиг. 11B представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий C-F капсул. На Фиг. 11C представлено процентное высвобождение целевой конструкции из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[85] На Фиг. 12A-12C представлено процентное высвобождение целевых конструкций (SEQ ID NO: 5) в форме димера из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 7,0. На Фиг. 12A представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий A-B капсул. На Фиг. 12B представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий C-F капсул. На Фиг. 12C представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[86] На Фиг. 13A-13C представлено процентное высвобождение целевых конструкций (SEQ ID NO: 5) в форме димера из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 6,5. На Фиг. 13A представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий A-B капсул. На Фиг. 13B представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из

покрытий C-F капсул. На Фиг. 13C представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[87] На Фиг. 14A-14C представлено процентное высвобождение целевых конструкций (SEQ ID NO: 5) в форме димера из различных покрытий капсул, первый час при pH 1,0 и оставшееся время при pH 6,0. На Фиг. 14A представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий A-B капсул. На Фиг. 14B представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий C-F капсул. На Фиг. 14C представлено процентное высвобождение целевых конструкций в форме димера из покрытий G-H капсул. Покрытия A-H капсул описаны в Таблице 23.

[88] На Фиг. 15A-15C представлены уровни в сыворотке у яванских макаков IL-10, кофеина и антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) в течение 8 часов после введения макакам капсул, содержащих целевую конструкцию (SEQ ID NO: 5) и кофеин, с одним из покрытий A, B или C капсул, как показано в Таблице 25. На Фиг. 15A представлены уровни в сыворотке IL-10. На Фиг. 15B представлены уровни в сыворотке кофеина. На Фиг. 15C представлены уровни в сыворотке IL-1RA. Оси X и Y представляют собой логарифмическую шкалу. Среднее значение для каждой группы нанесено столбиками, представляющими стандартную ошибку среднего значения.

[89] На Фиг. 16A-16C представлены уровни в сыворотке у яванских макаков IL-10, кофеина и IL-1RA в течение 8 часов после введения макакам капсул, содержащих целевую конструкцию (SEQ ID NO: 5) и кофеин, с одним из покрытий A, G и ч капсул, как показано в Таблице 25. На Фиг. 16A представлены уровни в сыворотке IL-10. На Фиг. 16B представлены уровни в сыворотке кофеина. На Фиг. 16C представлены уровни в сыворотке IL-1RA. Оси X и Y представляют собой логарифмическую шкалу. Среднее значение для каждой группы нанесено столбиками, представляющими стандартную ошибку среднего значения.

[90] На Фиг. 17A-17C представлены уровни в сыворотке у яванских макаков IL-10, кофеина и IL-1RA в течение 8 часов после введения макакам капсул, содержащих целевую конструкцию (SEQ ID NO: 5) и кофеин, с одним из покрытий A, C, D, E и F капсул, как показано в Таблице 25. На Фиг. 17A представлены уровни в сыворотке IL-10. На Фиг. 17B представлены уровни в сыворотке кофеина. На Фиг. 17C представлены уровни в сыворотке IL-1RA. Оси X и Y представляют собой логарифмическую шкалу. Среднее значение для каждой группы нанесено столбиками, представляющими стандартную ошибку среднего значения.

[91] На Фиг. 18 представлена эксклюзионная хроматограмма (SEC) комбинаций разных уплотняющих вспомогательных средств и порошка лиофилизированной целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) после инкубации при 40°C в течение 3 дней. Исследованные уплотняющие вспомогательные средства содержали: крахмал, кроскармеллозу натрия, стеарат магния, бегенат глицерина, микрокристаллическую целлюлозу (MCC), лактозу,

кросповидон и силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC).

[92] На Фиг. 19 представлена эксклюзионная хроматограмма (SEC), показывающая чистоту димеров целевой конструкции (SEQ ID NO: 5), а также чистоту димеров целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) лекарственных форм F1 и F2.

[93] На Фиг. 20A-20D представлено полное извлечение целевой конструкции (SEQ ID NO: 5), извлечение димера и процентное содержание димера после растворения разных таблетированных лекарственных форм. На Фиг. 20A представлено полное извлечение целевой конструкции, извлечение димера и процентное содержание димера после растворения таблетки F1, созданной с использованием силы сжатия 2000 фунтов силы (lbf). На Фиг. 20B представлено полное извлечение целевой конструкции, извлечение димера и процентное содержание димера после растворения таблетки F1, созданной с использованием силы сжатия 2500 lbf. На Фиг. 20C представлено полное извлечение целевой конструкции, извлечение димера и процентное содержание димера после растворения таблетки F2, созданной с использованием силы сжатия 2500 lbf. На Фиг. 20D представлено полное извлечение целевой конструкции, извлечение димера и процентное содержание димера после растворения таблетки F2, созданной с использованием силы сжатия 3000 lbf. В этих экспериментах извлечение димера показало абсолютное количество идентифицированного димера относительно справочного стандарта. В этих экспериментах чистота димера показала процентное содержание димера относительно всех форм обнаруженных конструкций доставки IL-10 (которые включали в себя агрегаты и мономеры). Анализ проводили при pH 7,0.

[94] На Фиг. 21 представлено процентное содержание целевых конструкций (SEQ ID NO: 5) в форме димера в разных лиофилизированных лекарственных формах перед и после инкубации при 25°C. Горизонтальная линия показывает основную пиковую чистоту димера для эталонного образца (1x PBS-без вспомогательных средств) после 3 дней при 25°C.

[95] На Фиг. 22 представлено процентное содержание целевых конструкций (SEQ ID NO: 5) в форме димера в разных лиофилизированных лекарственных формах перед и после 5 циклов замораживания/размораживания (F/T) при -20°C.

[96] На Фиг. 23A-23B показано влияние 5 циклов замораживания/размораживания при -20°C и -80°C на агрегаты и димеры целевых конструкций (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 23A показано влияние 5 циклов замораживания/размораживания на процентное содержание агрегатов целевых конструкций (HMW). На Фиг. 23B показано влияние 5 циклов замораживания/размораживания на процентное содержание димеров целевых конструкций.

[97] На Фиг. 24A-24B представлено изменение процентного содержания целевых агрегатов или димеров при 4°C или 25°C в течение одной недели в разных составах буфера для лиофилизации из таблицы 11. исследовали две разные концентрации целевых конструкций (SEQ ID NO: 5) (20 мг/мл и 40 мг/мл) в буферах для лиофилизации для каждого из четырех разных составов. На Фиг. 24A представлено изменение процентного

содержания целевой конструкции агрегатов при 4°C. На Фиг. 24B представлено изменение процентного содержания целевого димера при 4°C. На Фиг. 24C представлено изменение процентного содержания агрегатов целевой конструкции при 25°C. Стрелки показывают буфер для лиофилизации, содержащий сахарозу при pH 7,5. На Фиг. 24D представлено изменение процентного содержания димера целевой конструкции при 25°C. Стрелки показывают буфер для лиофилизации, содержащий сахарозу при pH 7,5.

[98] На Фиг. 25A-25B представлена эффективность рефолдинга при изменении концентрации аргинина и концентрации целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) раствора для рефолдинга. На Фиг. 25A представлено контурное изображение эффективности рефолдинга (% димера в конце рефолдинга). На Фиг. 25B представлен столбчатый график эффективности рефолдинга.

[99] На Фиг. 26A-26B представлена эффективность рефолдинга целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) при изменении концентрации глицерина и pH раствора для рефолдинга. На Фиг. 26A представлено контурное изображение эффективности рефолдинга. На Фиг. 26B представлен столбчатый график эффективности рефолдинга.

[100] На Фиг. 27A-27B представлена эффективность рефолдинга целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) при изменении концентрации сахарозы и концентрации PEG 3350 раствора для рефолдинга. На Фиг. 27A представлено контурное изображение эффективности рефолдинга. На Фиг. 27B представлен столбчатый график эффективности рефолдинга.

[101] На Фиг. 28 представлена хроматограмма эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC), показывающая агрегаты, димеры и мономеры целевой конструкции (SEQ ID NO: 5) для каждого из четырех растворов для рефолдинга. «A» отображает контрольный раствор для рефолдинга, содержащий 0,7 M аргинина. «B» отображает раствор для рефолдинга с 1 M аргинина. «C» отображает раствор для рефолдинга с 1 M аргинина плюс 0,25 M сахарозы плюс 0,2% PEG3350. «D» отображает 1 M аргинина плюс 0,25 M сахарозы.

[102] На Фиг. 29 представлена эффективность рефолдинга каждого из четырех растворов для рефолдинга, показанных На Фиг. 28.

[103] На Фиг. 30 представлен окрашивание целевых конструкций с помощью Coomaccyie blue на разных промежуточных этапах в процессе очистки после SDS-PAGE. Полосы 1 и 11 содержат отмеченные 12 маркеров молекулярной массы. Полосы 8, 9, 10, 18, 19 и 20 пустые. Образцы в полосах 2-10 SDS-PAGE анализировали в восстанавливающих условиях. Образцы в полосах 12-20 SDS-PAGE анализировали в не восстанавливающих условиях. Полосы 2 и 12 содержат целевую конструкцию (SEQ ID NO: 5). Полосы 3 и 13 содержат отфильтрованный ретентат TFF-2 (Цикл #1). Полосы 4 и 14 содержит отфильтрованный рет+ентат TFF-2 (Цикл #2). Полосы 5 и 15 содержат объединенный элюат Capto™ Q. Полосы 6 и 16 содержат объединенный элюат CHT. Полосы 7 и 17 содержат конечный ретентат TFF-3.

[104] На Фиг. 31A-31B представлены варианты осуществления пероральных

лекарственных форм 3200 и 3205, описанных в данном документе. На Фиг. 31A представлена пероральная лекарственная форма 3200, содержащая внутреннюю область, содержащую терапевтический белок (3201), первое покрытие (3203), второе покрытие (3202) и третье покрытие (3204). На Фиг. 31B представлена пероральная лекарственная форма, содержащая первое покрытие (3203).

[105] На Фиг. 32A-32B представлено время высвобождения радиоактивной метки из капсул с покрытием лекарственной формы 1, 2 или 3, как описано в Таблице 35. На Фиг. 32A представлено время первоначального высвобождения радиоактивной метки после введения пероральных лекарственных форм в виде капсул с покрытием у здоровых добровольцев. На Фиг. 32B представлено время полного высвобождения радиоактивной метки после введения пероральных лекарственных форм в виде капсул с покрытием у здоровых добровольцев.

[106] На Фиг. 33A-33B представлена анатомическая локализация высвобождения радиоактивной метки из капсул с покрытием лекарственной формы 1, 2 или 3, как описано в Таблице 35. На Фиг. 33A представлена анатомическая локализация первоначального высвобождения радиоактивной метки после введения пероральных лекарственных форм в виде капсул с покрытием у здоровых добровольцев. На Фиг. 33B представлена анатомическая локализация полного высвобождения радиоактивной метки после введения пероральных лекарственных форм в виде капсул с покрытием у здоровых добровольцев. PSB=проксимальный отдел тонкой кишки; DSB=дистальный отдел тонкой кишки; AC=восходящая ободочная кишка; TC= поперечная ободочная кишка; DC=нисходящая ободочная кишка.

[107] На Фиг. 34 представлена эксклюзионная хроматограмма (SEC), идентифицирующая пики, представляющие димер, агрегат и мономер целевой конструкции (SEQ ID NO: 5).

[108] На Фиг. 35 показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на процентное изменение массы тела мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки. Ежедневно регистрировали массу тела мышей до и после воздействия. Данные выражены как среднее ± SEM; n в группе: без воздействия (5), носитель (10), конструкция доставки IL-10 (15), 5-ASA (15). Данные анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннета для сравнения разницы между каждой группой и носителем в каждый день. *$p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$,****$p<0,0001$.

[109] На Фиг. 36 показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на выживаемость мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки. Ежедневно регистрировали смертность мышей до и после воздействия. Данные выражены в процентах выживаемости.

[110] На Фиг. 37 показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на тяжесть заболевания мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки. Тяжесть оценивали с помощью маркеров воспаления ободочной кишки через 7

дней после воздействия.

[111] На Фиг. 38A показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на массу ободочной кишки мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки. Массу ободочной кишки измеряли через 7 дней после воздействия.

[112] На Фиг. 38B показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на положительную скрытую кровь у мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки.

[113] На Фиг. 38C показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на консистенцию кала у мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки.

[114] На Фиг. 38D показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на индекс активности заболевания у мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки.

[115] На Фиг. 38E показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на уровни макрофагального колониестимулирующего фактора 1 (MCSF) в сыворотке мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки.

[116] На Фиг. 38F показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на уровни белка p70 IL-12 в сыворотке мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки.

[117] На Фиг. 38G показано влияние конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на уровни IL-3 в сыворотке мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки.

[118] На Фиг. 39A-39E показано влияние перорального приема конструкции доставки IL-10 на клеточную экспрессию белков, имеющих отношение к воспалительным процессам, связанным с язвенным колитом. Поперечные срезы проксимального, среднего и дистального отделов ободочной кишки мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки анализировали с помощью иммуногистохимии. На Фиг. 39A показано влияние перорального приема конструкции доставки IL-10 на клеточную экспрессию NFκB. На Фиг. 39B показано влияние перорального приема конструкции доставки IL-10 на клеточную экспрессию TNFα. На Фиг. 39C показано влияние перорального приема конструкции доставки IL-10 на клеточную экспрессию CD4. На Фиг. 39D показано влияние перорального приема конструкции доставки IL-10 на клеточную экспрессию IL-4. На Фиг. 39E показано влияние перорального приема конструкции доставки IL-10 на клеточную экспрессию Foxp3.

[119] На Фиг. 40A-40B представлен набор системных цитокинов Luminex после пероральной доставки дозирующего раствора конструкции доставки IL-10. На Фиг. 40A представлен набор Luminex IL-6 после пероральной доставки дозирующего раствора конструкции доставки IL-10. На Фиг. 40B представлен набор Luminex IL-23 после пероральной доставки дозирующего раствора конструкции доставки IL-10.

[120] На Фиг. 41A-41J представлена концентрация 10 цитокинов в образцах плазмы

с использованием провоспалительной панели MSD 1 после указанного лечения. На Фиг. 41A представлена концентрация в плазме о IFNγ. На Фиг. 41B представлена концентрация IL-10 в плазме. На Фиг. 41C представлена концентрация в плазме IL-12p70. На Фиг. 41D представлена концентрация в плазме IL-1β. На Фиг. 41E представлена концентрация в плазме IL-2. На Фиг. 41F представлена концентрация в плазме IL-4. На Фиг. 41G представлена концентрация в плазме IL-5. На Фиг. 41H представлена концентрация в плазме IL-6. На Фиг. 41I представлена концентрация в плазме KC/GRO. На Фиг. 41J представлена концентрация в плазме TNF-α.

[121] На Фиг. 42 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на процентное изменение массы тела мышей после индуцированного оксазолоном воспалительного колита.

[122] На Фиг. 43 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на процент выживаемости мышей после индуцированного оксазолоном воспалительного колита. Ежедневно регистрировали смертность мышей до и после оксазолоного воздействия. Данные выражены в процентах выживаемости.

[123] На Фиг. 44 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на тяжесть заболевания мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки. Индекс активности заболевания (DAI) оценивали по консистенции кала и положительной скрытой крови после оксазолоного воздействия. Данные выражены как среднее ±SEM.

[124] На Фиг. 45 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 соотношение массы/длины ободочной кишки у мышей после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки. Массу и длину ободочной кишки измеряли через 7 дней после оксазолоного воздействия. Данные выражены как среднее ±SEM.

[125] На Фиг. 46 представлена гистопатология проксимального, среднего и дистального отделов ободочной кишки после индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки у мышей. Данные выражены как среднее ±SEM.

[126] На Фиг. 47A-47LL представлена системная концентрация циркулирующих цитокинов, хемокинов и факторов роста у мышей. Концентрации циркулирующих цитокинов в плазме анализировали с использованием набора шариков Luminex. Данные выражены как среднее ±SEM. На Фиг. 47A представлена системная концентрация GCSF/CSF3. На Фиг. 47B представлена системная концентрация GMCSF. На Фиг. 47C представлена системная концентрация MCSF. На Фиг. 47D представлена системная концентрация VEGF. На Фиг. 47E представлена системная концентрация LIF. На Фиг. 47F представлена системная концентрация экзотаксина. На Фиг. 47G представлена системная концентрация GROA. На Фиг. 47H представлена системная концентрация IP10. На Фиг. 47I представлена системная концентрация LIX. На Фиг. 47J представлена системная концентрация MCP1. На Фиг. 47K представлена системная концентрация MCP3. На Фиг. 47L представлена системная концентрация MIP1α. На Фиг. 47M представлена системная концентрация MIP1β. На Фиг. 47N представлена системная концентрация MIP2. На Фиг.

47O представлена системная концентрация RANTES. На Фиг. 47P представлена системная концентрация IL-1α. На Фиг. 47Q представлена системная концентрация IL-1β. На Фиг. 47R представлена системная концентрация IL-2. На Фиг. 47S представлена системная концентрация IL-3. На Фиг. 47T представлена системная концентрация IL-4. На Фиг. 47U представлена системная концентрация IL-5. На Фиг. 47V представлена системная концентрация IL-6. На Фиг. 47W представлена системная концентрация IL-9. На Фиг. 47X представлена системная концентрация IL-12p70. На Фиг. 47Y представлена системная концентрация IL-13. На Фиг. 47Z представлена системная концентрация IL-15/IL-15R. На Фиг. 47AA представлена системная концентрация IL-17A. На Фиг. 47BB представлена системная концентрация IL-18. На Фиг. 47CC представлена системная концентрация IL-23. На Фиг. 47DD представлена системная концентрация IL-27. На Фиг. 47EE представлена системная концентрация IL-28. На Фиг. 47FF представлена системная концентрация IL-31. На Фиг. 47GG представлена системная концентрация IFN-α. На Фиг. 47HH представлена системная концентрация IFN-γ. На Фиг. 47II представлена системная концентрация TNF-α. На Фиг. 47JJ представлена системная концентрация IL-10. На Фиг. 47KK представлена системная концентрация IL-22. На Фиг. 47LL представлена системная концентрация TGF-β.

[127] На Фиг. 48A-48J представлены концентрации 10 цитокинов в образцах плазмы с использованием провоспалительной панели V-PLEX. На Фиг. 48A представлена концентрация в плазме IFNγ. На Фиг. 48B представлена концентрация IL-10 в плазме. На Фиг. 48C представлена концентрация в плазме IL-12p70. На Фиг. 48D представлена концентрация в плазме IL-1β. На Фиг. 48E представлена концентрация в плазме IL-2. На Фиг. 48F представлена концентрация в плазме IL-4. На Фиг. 48G представлена концентрация в плазме IL-5. На Фиг. 48 ч представлена концентрация в плазме IL-6. На Фиг. 48I представлена концентрация в плазме KC/GRO. На Фиг. 48J представлена концентрация в плазме TNF-α. Данные выражены как среднее ±SEM.

[128] На Фиг. 49A-49D представлена системная и кишесная экспрессия IL-1Ra у мышей после индуцированного оксазолоном воспалительного колита. На Фиг. 49A представлена системная концентрация IL-1Ra в плазме. На Фиг. 49B представлена экспрессия гена IL-1Ra в ткани толстой кишки мышей, не подвергавшихся воздействию, получавших носитель и 9 мг/кг конструкции доставки IL-10. На Фиг. 49C представлена экспрессия гена IL-1β в ткани толстой кишки мышей, не подвергавшихся воздействию, получавших носитель и 9 мг/кг конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5. На Фиг. 49D представлено соотношение IL-1Ra/IL-1β. Уровни транскриптов мРНК нормализовали по GAPDH. Данные выражены как среднее ±SEM.

[129] На Фиг. 50A представлена временная шкала индукции колита декстрансульфатом натрия (DSS) и лечения путем ежедневного перорального приема конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 (как указано), растворенной в 100 мл PBS, в дни, указанные направленной вниз стрелкой.

[130] На Фиг. 50B представлена потеря массы, вызванная DSS, во время

прижизненной части исследования.

[131] На Фиг. 50C показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на массу тела после вызванного DSS колита. Масса тела представлена в виде процентного изменения по сравнению с исходным уровнем после воспаления, вызванного DSS. Данные выражены как среднее ±SEM.

[132] На Фиг. 51 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на индекс активности заболевания (DAI) после вызванного DSS колита. Индивидуальные баллы потери массы, консистенции кала и скрытой крови в кале (по шкале 0-3) суммированы для получени DAI (диапазон 0-9) в ответ на воспаление, вызванное DSS. Данные выражены как среднее ±SEM.

[133] На Фиг. 52A-B показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на длину ободочной кишки (Фиг. 52A) и вес (Фиг. 52B) после вызванного DSS колита. Данные выражены как среднее ±SEM.

[134] На Фиг. 53 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на суммарные гистологические параметры (воспаление, нарушение железы, эрозия и гиперплазия) после вызванного DSS колита. Данные выражены как среднее ±SEM. ****p<0,0001, *p<0,05.

[135] На Фиг. 54 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на ширину отека после вызванного DSS колита. Данные выражены как среднее ±SEM. ****p<0,0001, **p<0,01, *p<0,05.

[136] На Фиг. 55 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на толщину слизистой покрытия ободочной кишки после вызванного DSS колита. Данные выражены как среднее ±SEM. ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.

[137] На Фиг. 56 показано влияние конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 на гиперплазию ободочной кишки после вызванного DSS колита. Данные выражены как среднее ±SEM. ****p<0,0001, **p<0,01.

[138] На Фиг. 57A-57B представлено обнаружение изменчивого человеческого IL-10 и индукции IL-1Ra в исследовании DSS. Системную концентрацию измеряли с помощью сэндвич-иммуноанализа после воздействия DSS. Данные выражены как среднее ±SEM. На Фиг. 57A представлена системная концентрация конструкции доставки IL-10, обнаруженная с помощью идентифицирующих антител против cholix или против IL-10. На Фиг. 57B представлена системная концентрация IL-1Ra после воздействия DSS.

[139] На Фиг. 58 представлена концентрация в плазме от общего количества IL-10 у не являющихся человеком приматов (NHP) после приема дозы конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Системная концентрация от общего количества IL-10, измеренная с помощью иммуноанализа, после перорального приема капсул с конструкциями доставки IL-10. Данные выражены как среднее ±SEM.

[140] На Фиг. 59 представлена концентрация IL-1Ra в плазме у NHP после приема дозы конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Системная концентрация IL-1Ra, измеренная с помощью иммуноанализа, после перорального приема капсул с

конструкциями доставки IL-10. Данные выражены как среднее ±SEM.

[141] На Фиг. 60 представлена концентрация в плазме кофеина у NHP после приема дозы конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Системная концентрация кофеина, измеренная с помощью иммуноанализа, после перорального приема капсул с конструкциями доставки IL-10. Данные выражены как среднее ±SEM.

[142] На Фиг. 61A-61E представлены концентрации в плазме выбранных провоспалительных цитокинов у NHP после перорального приема конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 61A представлена концентрация в плазме IFNγ. На Фиг. 61B представлена концентрация в плазме IL-1β. На Фиг. 61C представлена концентрация в плазме IL-2. На Фиг. 61D представлена концентрация в плазме IL-8. На Фиг. 61E представлена концентрация в плазме IL-6.

[143] На Фиг. 62 представлено, что конструкция доставки IL-10 показала небольшую совместную локализацию или ее отсутствие с LAMP1-позитивными лизосомами в энтероцитах в течение 15-минутного исследования.

[144] На Фиг. 63 представлено иммунофлуоресцентное изображение содержащих CD11c клеток (дендритных клеток) и IL-10.

[145] На Фиг. 64 представлено иммунофлуоресцентное изображение содержащих CD19 клеток (B лимфоцитов) и IL-10.

[146] На Фиг. 65 представлено иммунофлуоресцентное изображение содержащих CD34 клеток (эндотелия) и cholix.

[147] На Фиг. 66 представлено иммунофлуоресцентное изображение содержащих CD3 клеток (T-лимфоцитов) и IL-10.

[148] На Фиг. 67 представлено клеточное нацеливание конструкции доставки IL-10 на T-клетки и макрофаги в подслизистой оболочке ЖКТ.

[149] На Фиг. 68 представлено растворение капсул с покрытием, содержащих конструкцию доставки IL-10, в устройстве для растворения 4 типа. Обозначения: квадраты: только нижнее покрытие HPMC; кружки: нижнее покрытие HPMC плюс покрытие эудрагита 50:50 в течение 80 мин; знаки плюс: нижнее покрытие HPMC плюс покрытие эудрагита 50:50 в течение 120 мин; ромбы: нижнее покрытие HPMC плюс покрытие эудрагита 50:50 в течение 120 мин плюс покрытие HPMC в течение 20 мин; и треугольники: нижнее покрытие HPMC плюс покрытие эудрагита 50:50 в течение 120 мин плюс покрытие HPMC в течение 60 мин.

[150] На Фиг. 69 представлено растворение таблеток с покрытием, содержащих конструкцию доставки IL-10 в устройстве для растворения 4 типа.

[151] На Фиг. 70 представлено извлечение димерных форм конструкции доставки IL-10 (нижняя секция каждого столбца), а также мономерных (LMW) и агрегатных (HMW) форм верхняя секция каждого столбца) конструкции доставки IL-10 на всем протяжении времени, показанном На Фиг. 68 и На Фиг. 69. Данные показывают площадь под кривой от t=0 до последнего измеряемого момента времени. Слева направо столбцы представляют: (1) таблетку без покрытия (2) таблетку с массой покрытия 8 мг при

массовом соотношении эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D 20:80; (3) таблетку с массой покрытия 13 мг при массовом соотношении эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D 20:80; (4) таблетку с массой покрытия 20 мг при массовом соотношении эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D 20:80; (5) таблетку с массой покрытия 8 мг при массовом соотношении эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D 50:50; (6) таблетку с массой покрытия 13 мг при массовом соотношении эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D 50:50; (7) таблетку с массой покрытия 8 мг при массовом соотношении эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D 50:50; (8) без кишечнорастворимого покрытия; (9) кишечнорастворимое покрытие-80m; (10) кишечнорастворимое покрытие-120m; (11) кишечнорастворимое покрытие 120m+HPMC60m; (12) кишечнорастворимое покрытие 120m+HPMC20m.

[152] На Фиг. 71A-71C представлены системные концентрации некоторых маркеров, измеренные в течение 24 часов с помощью иммуноанализа после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в количестве 1, 3 и 10 мг (n=3/группа). Данные выражены как среднее ±SEM, статистический анализ не проводили. На Фиг. 71A представлена системная концентрация IL-10. На Фиг. 71B представлена системная концентрация конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 71C представлена системная концентрация IL-1Ra.

[153] На Фиг. 72 представлена системная концентрация IL-6, измеренная в течение 24 часов с помощью иммуноанализа после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в количестве 1, 3 и 10 мг (n=3/группа). Данные выражены как среднее ±SEM, статистический анализ не проводили.

[154] На Фиг. 73 представлена концентрация IL-1Ra, измеренная в течение 24 ч с помощью иммуноанализа после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в количестве 1, 3 и 10 мг. Данные выражены как среднее ± SEM; n на дозу конструкции доставки IL-10: перед введением (2), 15 мин (3), 30 мин (3), 45 мин (3), 8 ч (1) и 24 ч (1); статистический анализ не проводили.

[155] На Фиг. 74 представлено фосфорилирование STAT3 в ткани толстой кишки, при измерении по соотношению pSTAT3 и общего STAT3. Фосфорилирование и общую экспрессию измеряли с помощью иммуноанализа в течение 45 мин после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в количестве 1, 3 и 10 мг. Данные выражены как среднее ± SEM, n на дозу конструкции доставки IL-10: перед введением (2), 15 мин (3), 30 мин (3) и 45 мин (3), статистический анализ не проводили.

[156] На Фиг. 75 представлена концентрация IL-6 в ткани, измеренная в течение 24 ч с помощью иммуноанализа после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в количестве 1, 3 и 10 мг. Данные выражены как среднее ± SEM; n на дозу конструкции доставки IL-10: перед введением (2), 15 мин (3), 30 мин (3), 45 мин (3), 8 ч (1) и 24 ч (1); статистический анализ не проводили.

[157] На Фиг. 76 представлена регуляция противовоспалительных генов ободочной кишки, которую оценивали через 8 ч после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в дозах 1, 3 и 10 мг; n в группе: перед введением (4), все дозы

конструкции доставки IL-10 (2). Данные выражены как среднее; статистический анализ не проводили. Для каждой дозы столбцы слева направо иллюстрируют кратное изменение, наблюдаемое для: CD163, SCNN1G, STC1, HGF, SGK1, MIR24-2, SCNN1B, PTGDR, MTNR1A, ACE2, NOX1, BEST2, VNN2, LTB4R2, B3GALT5, AQP8, SLC9A3 и CYP1A1.

[158] На Фиг. 77 представлена регуляция провоспалительных генов ободочной кишки, которую оценивали через 8 ч после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в дозах 1, 3 и 10 мг; n в группе: перед введением (4), все дозы конструкции доставки IL-10 (2). Данные выражены как среднее; статистический анализ не проводили. Для каждой дозы столбцы слева направо иллюстрируют: MHC-II, HPGDS, FCER1A, PLA2G2D, CCL13, FUT3, CCL28, UGT1A1, CCL20, NLRP1 и TPH.

[159] На Фиг. 78 представлена регуляция провоспалительных генов ободочной кишки, которую оценивали через 8 ч после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в дозах 1, 3 и 10 мг; n в группе: перед введением (4), все дозы конструкции доставки IL-10 (2). Данные выражены как среднее 2-3 зондов на мишень; статистический анализ не проводили. Для каждой дозы столбцы слева направо иллюстрируют: MMP19, LIPG, MMP1, CHI3L1, MMP3, LAMC2, S100A8, CXCL1, FIGF, PCSK1, CASP5, CXCL2 и CHGB.

[160] На Фиг. 79 представлена регуляция генов репарации тканей ободочной кишки, которую оценивали через 8 ч после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в дозах 1, 3 и 10 мг; n в группе: перед введением (4), все дозы конструкции доставки IL-10 (2). Данные выражены как среднее; статистический анализ не проводили. Для каждой дозы столбцы слева направо иллюстрируют: SCNN1G, STC1, TIMP1, SCNN1B, BEST2, B3GALT5, AQP8 и SLC9A3.

[161] На Фиг. 80 представлена регуляция антимикробных генов ободочной кишки, которую оценивали через 8 ч после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку в дозах 1, 3 и 10 мг; n в группе: перед введением (4), все дозы конструкции доставки IL-10 (2). Данные выражены как среднее; статистический анализ не проводили. Для каждой дозы столбцы слева направо иллюстрируют: PI15, PI3, BDKRB1, CCI28 и SERPINE2.

[162] На Фиг. 81A-81C представлено окрашивание гематоксилином и эозином срезов ободочной кишки мыши. На Фиг. 81A представлен срез необработанной ободочной кишки, На Фиг. 81B представлен срез ободочной кишки мыши, получавшей лечение оксазолоном, а На Фиг. 81C представлен срез ободочной кишки мыши, получавшей лечение оксазолоном и 8,5 мг/кг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[163] На Фиг. 82A-82G представлена экспрессия маркеров воспаления при лечении пероральной конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 82A представлена экспрессия IL-4. На Фиг. 82B представлена экспрессия IL-6. На Фиг. 82C представлена экспрессия IL-1β. На Фиг. 82D представлена экспрессия IL-17A. На Фиг. 82E представлена экспрессия IL-10. На Фиг. 82F представлена экспрессия MIP1α. На Фиг. 82G представлена экспрессия GCSF/CSF3. *$p < 0,05$; Односторонний дисперсионный анализ с

пост-тестом Тьюки.

[164] На Фиг. 83A представлено соотношение pSTAT3 и общего STAT3 после лечения эквимолярным количеством либо конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5; 1 мг/кг), либо рекомбинантным IL-10 человека (0,9 мг/кг).

[165] На Фиг. 83B представлен уровень системного IL-1Ra после лечения эквимолярным количеством либо конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5; 10 мг/кг), либо рекомбинантным IL-10 человека (3 мг/кг).

[166] На Фиг. 84 представлена системная экспрессия IL-1Ra при лечении конструкцией доставки IL-10 (дозы показаны на оси x в мг/кг).

[167] На Фиг. 85A представлена экспрессия IL-1Ra ободочной кишки у мышей, получавших лечение носителем или 9 мг/кг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), при измерении по qPCR и нормализации по уровню экспрессии у не получавшей лечения мыши.

[168] На Фиг. 85B представлена экспрессия IL-1β ободочной кишки у мышей, получавших лечение носителем или 9 мг/кг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), при измерении по qPCR и нормализации по уровню экспрессии у не получавшей лечения мыши.

[169] На Фиг. 85C представлено соотношение IL-1Ra и IL-1β На Фиг. 85A и B.

[170] На Фиг. 86 показано влияние лечения конструкцией доставки IL-10 на соотношение фосфорилированного STAT3 (pSTAT3) и общего STAT3 в ткани толстой кишки.

[171] На Фиг. 87 представлена экспрессия провоспалительных маркеров у обезьян Macaca fascicularis (от приблизительно 5 до приблизительно 8 кг), которым вводили конструкцию доставки IL-10 с помощью ректороманоскопии ободочной кишки в указанных дозах.

[172] На Фиг. 88 представлена экспрессия противовоспалительных маркеров у обезьян Macaca fascicularis (от приблизительно 5 до приблизительно 8 кг), которым вводили конструкцию доставки IL-10 с помощью ректороманоскопии ободочной кишки в указанных дозах.

[173] На Фиг. 89 представлена экспрессия биомаркеров, связанных с репарацией ткани и заживлением ран у обезьян Macaca fascicularis (от приблизительно 5 до приблизительно 8 кг), которым вводили конструкцию доставки IL-10 с помощью ректороманоскопии ободочной кишки в указанных дозах.

[174] На Фиг. 90A-90B представлены PK и PD измерения у не являющихся человеком приматов после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 90A представлена системная концентрация IL-10 после доставки конструкции доставки IL-10 перорально (PO, N=6), подкожно (SC, N=3) или внутривенно (IV, N=3) в указанных дозах у обезьян Macaca fascicularis. На Фиг. 90B представлена системная концентрация IL-1Ra после доставки конструкции доставки IL-10 перорально (PO, N=6), подкожно (SC, N=3) или внутривенно (IV, N=3) в указанных дозах у обезьян Macaca fascicularis.

[175] На Фиг. 91 представлено соотношение IL-1Ra и IL-10 (соотношение средних AUC) после доставки конструкции доставки IL-10 перорально (PO, N=6), подкожно (SC, N=3) или внутривенно (IV, N=3) в указанных дозах у обезьян Macaca fascicularis.

[176] На Фиг. 92 представлена мутность растворов, содержащих конструкцию доставки IL-10 перед и после встряхивания как с поверхностно-активным веществом, так и без него.

[177] На Фиг. 93 представлена хроматограмма SEC-HPLC перед встряхиванием.

[178] На Фиг. 94 представлена хроматограмма SEC-HPLC после встряхивания.

[179] На Фиг. 95 представлена стабильность конструкции доставки IL-10 в PBS при прессовании с различными другими компонентами. Образцы восстанавливали в PBS при дозе 0,3 мг/мл конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) во флаконах Eppendorf, установленных на шейкере с вращающимся барабаном при 37°C, в течение 5 ч. Образцы периодически отбирали для анализа с помощью SEC.

[180] На Фиг. 96 представлена совместимость конструкции доставки IL-10/вспомогательного средства в растворе.

[181] На Фиг. 97 представлена совместимость различных смазывающих вспомогательных средств с конструкцией доставки IL-10.

[182] На Фиг. 98 представлено высвобождение димеров конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) из покрытых эудрагитом таблеток (50/50 L30D55/FS30D) в устройстве для растворения 4 типа.

[183] На Фиг. 99 представлено высвобождение димеров конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) из покрытых эудрагитом таблеток (20/80 L30D55/FS30D) в устройстве для растворения 4 типа.

[184] На Фиг. 100 представлено растворение покрытых HPMC-AS таблеток (устройство 4 типа). Растворение начинали с раствором 0,1 N HCL в течение 40 мин. После чего среду переводили в фосфатный буфер с pH 7,0.

[185] На Фиг. 101 представлено высвобождение конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) из покрытых HPMC-AS капсул (устройство 4 типа).

[186] На Фиг. 102 представлено растворение покрытых HPMC-AS таблеток F3 в устройстве для растворения 4 типа.

[187] На Фиг. 103 представлено растворение покрытых HPMC-AS таблеток F3 в устройстве для растворения 2 типа.

[188] На Фиг. 104A-104C представлена концентрация в плазме различных белков (например, биомаркеров) после пероральной или внутривенной доставки конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO:5). На Фиг. 104A представлена концентрация IL-10 в плазме. На Фиг. 104B представлена концентрация IL-1Ra в плазме. На Фиг. 104C представлена концентрация IFN-γ.

[189] На Фиг. 105A-105D представлена системная концентрация или концентрация в ткани толстой кишки различных биомаркеров после доставки конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) через толстую кишку у не являющихся человеком приматов (NHP). На

Фиг. 105A представлена системная концентрация IL-10. На Фиг. 105B представлена системная концентрация IL-1Ra. На Фиг. 105C представлена концентрация IL-10 в ткани толстой кишки. На Фиг. 105D представлена концентрация конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в ткани толстой кишки.

[190] На Фиг. 106A-106D представлены уровни rhIL-10 при измерении по ELISA в нормальной и воспаленной ткани кишечника (проксимальном, среднем и дистальном отделе ободочной кишки) и сыворотке через 10 и 40 минут после внутрипросветной инъекции PBS, rhIL-10 (159 пмоль) или конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) (159 пмоль). На Фиг. 106A представлены уровни rhIL-10 в нормальной ткани кишечника через 10 минут после внутрипросветной инъекции PBS, rhIL-10 или конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 106B представлены уровни rhIL-10 в воспаленной ткани кишечника через 10 минут после внутрипросветной инъекции PBS, rhIL-10 или конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 106C представлены уровни rhIL-10 в нормальной ткани кишечника через 40 минут после внутрипросветной инъекции PBS, rhIL-10 или конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). На Фиг. 106D представлены уровни rhIL-10 в воспаленной ткани кишечника через 40 минут после внутрипросветной инъекции PBS, rhIL-10 или конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[191] На Фиг. 107 представлена локализация rhIL-10 и pSTAT3 в ткани после внутрипросветной инъекции конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в тощую кишку мышей Balb/C.

[192] На Фиг. 108 представлен временной анализ индукции pSTAT после внутрипросветной инъекции конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в тощую кишку мышей Balb/C.

[193] На Фиг. 109 представлены иммунофлуоресцентные изображения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), перемещаемой через эпителий кишечника в разных мышиных моделях.

[194] На Фиг. 110 представлена активность pSTAT3 вдоль собственной пластинки кишечника мыши.

[195] На Фиг. 111 представлена экспрессия IL-1Ra после одной дозы конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в 6 доза (1 мг, 3 мг, 10 мг, 30 мг, 60 мг, 120 мг) или плацебо.

[196] На Фиг. 112 представлено многократное возрастание дозы (MAD) в фазе 1b испытания конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[197] На Фиг. 113 представлено уменьшение FCP после 14-дневного лечения только конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в пациентов с язвенным колитом (UC) с исходным уровнем FCP >150 мкг/г.

[198] На Фиг. 114 представлено уменьшение CRP в системном кровотоке после 14-дневного лечения только конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) у пациентов с UC с исходным уровнем CRP >5 мг/л.

[199] На Фиг. 115 представлено уменьшение показателя Geboes в течение 14-

дневного лечения конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[200] На Фиг. 116 представлены гистологический изображения перед лечением (панель A) и после лечения (панель B) у пациента с UC в фазе 1b испытания, которому вводили 10 мг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), у которого показатель Geboes улучшился с показателя 15 до показателя три по 22-балльной шкале, при этом более высокие баллы указывают на более тяжелую активность заболевания.

[201] На Фиг. 117A-117C представлены микроскопические изображения, демонстрирующие трансцитоз IL-10 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника у крыс Wistar в разные моменты времени после полостного введения в тощую кишку крысы конструкции доставки с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. Зеленая флюоресценция показывает наличие IL-10 (за счет окрашивания антителом против IL-10). Синяя флюоресценция показывает окрашивание DAPI, которым метят ДнК, а красная флюоресценция показывает наличие CK-8 (цитокератина-8), с которым во время трансцитоза может совместно локализоваться носитель с происхождением из cholix (например, в надъядерной области эпителиальной клетки). Белые стрелки #1 указывают на апикальную мембрану эпителиальных клеток, белые стрелки #2 указывают на базальную мембрану эпителиальных клеток, а белая стрелка #3 показывает наличие IL-10 в собственной пластинке. На Фиг. 117A представлена степень трансцитоза IL-10 через одну минуту после полостного введения в тощую кишку крысы конструкции доставки с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. На Фиг. 117B представлена степень трансцитоза IL-10 через пять минут после полостного введения в тощую кишку крысы конструкции доставки с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5. На Фиг. 117C представлена степень трансцитоза IL-10 через десять минут после полостного введения в тощую кишку крысы конструкции доставки с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

[202] На Фиг. 118 представлены результаты системы модели кишечника конфлюэнтных поляризованных монослоев SMI-100 человека. Вестерн-блоттинг с антителами против hIL-10 определяет степень эквимолярного применения конструкции доставки IL-10 (полоса 2, апикальная, t=0 ч.) или коммерческого hIL-10 (полоса 3, апикальную, t=0 ч.), переходящего в базальную компартмент соответствующих трансвеллов (полоса 4, конструкция доставки IL-10, базальная, t=2 ч., и полоса 5, hIL-10, базальная, t=2 ч.). Полосы из одного вестерн-блота были объединены вместе для облегчения сравнения и отмечены черными линиями.

[203] На Фиг. 119 представлена димеризация рецепторов IL-10A и IL-10B, встроенных в клетки остеосаркомы U2OS, индуцированная конструкцией доставки IL-10 или hIL-10 через 6 ч.

[204] На Фиг. 120 представлена индукция фосфорилирования STAT3 относительно общего содержания STAT3 в линии J774.2 макрофагоподобных клеток мышей через 20 мин стимуляции. Данные являются репрезентативными для нескольких исследований с аналогичными результатами.

[205] На Фиг. 121 представлен анализ проточной цитометрии гейтированных живых моноцитов CD45+ CD14+ (PBMC), полученных у здоровых доноров, показывающий подавляющее действие IL-10 на индуцированную LPS секрецию; данные средней интенсивности флуоресценции (MFI) в виде среднего значения ± SEM (n=3) анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта. .p<0,5, .p<0,01, ".p<0,001, '.p<0,0001 по сравнению со значениями концентрации 0 пМ.

[206] На Фиг. 122 представлен анализ проточной цитометрии гейтированных живых моноцитов CD45+ CD14+ (PBMC), полученных у здоровых доноров, показывающий подавляющее действие IL-10 на индуцированную LPS секрецию IL-6; данные средней интенсивности флуоресценции (MFI) в виде среднего значения ± SEM (n=3) анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта. .p<0,5, .p<0,01, ".p<0,001, '.p<0,0001 по сравнению со значениями концентрации 0 пМ.

[207] На Фиг. 123 представлен анализ проточной цитометрии гейтированных живых моноцитов CD45+ CD14+ (PBMC), полученных у здоровых доноров, показывающий подавляющее действие IL-10 на индуцированную LPS поверхностную экспрессию HLA-DR; данные средней интенсивности флуоресценции (MFI) в виде среднего значения ± SEM (n=3) анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Даннетта. .p<0,5, .p<0,01, ".p<0,001, '.p<0,0001 по сравнению со значениями концентрации 0 пМ.

[208] На Фиг. 124 представлен индуцированный оксазолоном колит у мышей BALB/c, которым перорально вводили PBS. Одноканальные изображения получали и объединяли в комплекс с ядрами (синий), IL-10 (зеленый) и pSTAT3 (красный).

[209] На Фиг. 125 представлен индуцированный оксазолоном колит у мышей BALB/c, которым перорально вводили hIL-10. Одноканальные изображения получали и объединяли в комплекс с ядрами (синий), IL-10 (зеленая) и pSTAT3 (красный).

[210] На Фиг. 126 представлен индуцированный оксазолоном колит у мышей BALB/c, которым перорально вводили конструкции доставки IL-10. Одноканальные изображения получали и объединяли в комплекс с ядрами (синий), IL-10 (зеленый) и pSTAT3 (красный).

[211] На Фиг. 127 представлено процентное содержание клеток, экспрессирующих pSTAT3, при сегментации ткани тонкой кишки.

[212] На Фиг. 128 представлены результаты анализа ELISA hIL-10 с PBS, IL-10 и конструкцией доставки IL-10 после внутрипросветной инъекции в указанных тканях кишечника и сыворотке в модели переноса воспаленных Т-клеток.

[213] На Фиг. 129 представлена совместная локализация элементов полученного из cholix носителя (красный) и hIL-10 (зеленый) конструкции доставки IL-10, демонстрирующая их одновременную транспортировку и удержание в клетках собственной пластинки. Иммунофлуоресцентные микроскопические изображения тощей

кишки крысы получали после внутрипросветной инъекции 50 мкл конструкции доставки IL-10, полученной в PBS при ~40 мкм. Для Фиг. 129-133: стрелка=апикальная (люминальная) эпителиальная мембрана; пунктирная линия=разделение эпителиальных клеток и базальной мембраны; l-p=собственной пластинки; G=бокаловидная клетка. Ядра клеток, окрашенные DAPI (синий).

[214] На Фиг. 130 представлено окрашивание элемента hIL-10 (зеленый) конструкции доставки IL-10 и Rab7 (красный), продемонстрировавшее апикальные предпочтения для первого и базальные предпочтения для второго.

[215] На Фиг. 131 представлено окрашивание элемента hIL-10 (зеленый) конструкции доставки IL-10 и Rab11 (красный), продемонстрировавшее апикальные предпочтения для первого и базальные предпочтения для второго.

[216] На Фиг. 132 представлена реорганизация LMAN1 и совместная локализация с конструкцией доставки IL-10 внутри энтероцитов, но не в клетках собственной пластинки в период времени после внутрипросветной инъекции конструкции доставки IL-10 в тощую кишку крысы.

[217] На Фиг. 133 представлено отсутствие перераспределения или совместной локализации LAMP1 внутри энтероцитов, но обширная совместная локализация в клетках собственной пластинки в период времени после внутрипросветной инъекции конструкции доставки IL-10 в тощую кишку крысы.

[218] На Фиг. 134 представлена локализация Т-клеток (CDC3+) и клеток pSTAT3+ в ткани кишечника мыши. Клетка pSTAT3+ CDC3+ указана белой стрелкой.

[219] На Фиг. 135 представлена локализация макрофагов (F4/80+) и клеток pSTAT3+ в ткани кишечника мыши. Клетка pSTAT3+ F4/80+ указана желтой стрелкой.

[220] На Фиг. 136 представлено более сильное увеличение области Фиг. 135. Клетки pSTAT3+ F4/80+ отмечены желтыми стрелками.

[221] На Фиг. 137 представлены дополнительные изображения клеток pSTAT3+ F4/80+ кишечника.

[222] На Фиг. 138 представлено изображение клеток pSTAT3+ F4/80+ ободочной кишки.

[223] На Фиг. 139 представлена концентрация hIL-10 в сыворотке мыши в период времени после перорального приема 10 мг/кг конструкции доставки IL-10.

[224] На Фиг. 140 представлена концентрация hIL-10 в ткани дистального отдела тонкой кишки мыши в период времени после перорального приема 10 мг/кг конструкции доставки IL-10.

[225] На Фиг. 141 представлена концентрация hIL-10 в ткани толстой кишки мыши в период времени после перорального приема 10 мг/кг конструкции доставки IL-10.

[226] На Фиг. 142 представлена концентрация IL-1Ra в сыворотке мыши в период времени после перорального приема 10 мг/кг конструкции доставки IL-10.

[227] На Фиг. 143 представлена концентрация конструкции доставки IL-10 в биопсии ткани толстой кишки после внутрикишечного распыления указанной дозы

конструкции доставки IL-10.

[228] На Фиг. 144 представлена концентрация IL-10 в биопсии ткани толстой кишки после внутрикишечного распыления указанной дозы конструкции доставки IL-10.

[229] На Фиг. 145 представлена концентрация в сыворотке конструкции доставки IL-10 после внутрикишечного распыления указанной дозы конструкции доставки IL-10.

[230] На Фиг. 146 представлена концентрация в сыворотке IL-10 после внутрикишечного распыления указанной дозы конструкции доставки IL-10.

[231] На Фиг. 147 представлена концентрация в сыворотке IL-1Ra после внутрикишечного распыления указанной дозы конструкции доставки IL-10.

[232] На Фиг. 148 представлено соотношение pSTAT3 и общего STAT3 после внутрикишечного распыления указанной дозы конструкции доставки IL-10.

[233] На Фиг. 149 представлен вестерн-блоттинг компонента человеческого IL-10 (hIL-10) конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5 (полоса 2) и коммерческого rhIL-10, показывающий мономерную (стрелка) и димерную (двойная стрелка) формы (полоса 3). Полоса 1 содержит стандарты молекулярной массы.

[234] На Фиг. 150 представлены результаты обращенно-фазовой хроматографии с последующей масс-спектроскопией конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO 5. Наблюдались массы, соответствующие как димерной, так и мономерной формам.

Подробное описание раскрытия

[235] IL-10 представляет собой противовоспалительный цитокин, который может ограничивать повреждение тканей, вызванное инфекциями или воспалением, что делает IL-10 привлекательным белком для разработки терапевтических препаратов. Белок слияния, содержащий IL-10 и носитель, называемый в данном документе конструкцией доставки IL-10, может быть приготовлен в форме, подходящей для перорального приема, такой как таблетка или капсула. Кроме того, эти таблетки или капсулы могут быть изготовлены таким образом, чтобы по существу сохранять структурную целостность димеров конструкции доставки IL-10. Кроме того, кишечнорастворимое покрытие вокруг этих пероральных лекарственных форм может способствовать четкому профилю растворения конструкции доставки IL-10. Введение индивидууму таких пероральных лекарственных форм может характеризоваться отчетливым фармакодинамическим (PD) и фармакокинетическим (PK) ответом у индивидуума.

[236] IL-10 считается основным регулятором врожденной и адаптивной иммунной системы, поскольку считается, что он ингибирует не только инфламмасомы, но также многие воспалительные явления, связанные с заболеванием, включая активацию макрофагов и секрецию IL-1, IL-6, TNF альфа, MMP-1/2 при одновременном снижении системных признако воспаления и развитии Т-регуляторных клеток. Существует потребность в комбинированной терапии, которую можно использовать с ингибиторами TNF-альфа. Предоставление конструкции доставки IL-10 в дополнение к ингибитору TNF альфа может быть эффективным и улучшить результаты лечения пациентов.

[237] Приведенные ниже термины обсуждаются для иллюстрации значений

терминов, используемых в данном описании, в дополнение к пониманию этих терминов специалистами в данной области техники. Используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключать любой необязательный элемент. Таким образом, данное заявление предназначено служить первоначальной основой для использования такой исключительной терминологии, как «исключительно», «только» и т.п., в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием «отрицательного» ограничения.

[238] Определенные диапазоны или числа представлены в настоящем документе с числовыми значениями, которым предшествует термин «приблизительно». Термин «приблизительно» использован в данном документе для обозначения плюс или минус 1%, 2%, 3%, 4% или 5% от числа, к которому относится этот термин. Используемые в данном документе термины «субъект» и «индивидуум» используются взаимозаменяемо и могут означать любое животное, включая млекопитающих (например, человека или животного, не являющегося человеком).

[239] В рамках настоящего изобретения термины «лечить», «лечение» или «обработка» и другие грамматические эквиваленты включают облегчение, ослабление или улучшение одного или нескольких симптомов заболевания или состояния, улучшение, предотвращение или уменьшение проявлений, тяжести или частоты одного или нескольких дополнительных симптомов заболевания или состояния, ослабление или предотвращение основных причин одного или нескольких симптомов заболевания или состояния, ингибирование заболевания или состояния, например остановка развития заболевания или состояния, облегчение заболевания или состояния, вызов регресса заболевания или состояния, облегчение состояния, вызванного заболеванием или состоянием, или ингибирование симптомов заболевания или состояния профилактическим и/или терапевтическим путем.

[240] В рамках настоящего изобретения термин «процент (%) идентичности последовательности» и связанные с ним термины в контексте аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот представляют собой процент аминокислотных остатков или остатков нуклеиновых кислот в последовательности-кандидате. Которые идентичны остаткам аминокислот или остаткам нуклеиновых кислот, соответственно, в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен в качестве части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности или процентной идентичности нуклеиновой кислоты может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области,

например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как Clustal Omega, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR), причем предпочтительным алгоритмом выравнивания является BLAST. Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, хотя для простоты может быть предпочтительнее использовать параметры по умолчанию.

Интерлейкин-10 (IL-10) и IL-10 конструкции доставки

[241] В настоящем описании представлены композиции и способы доставки IL-10 субъекту. Как описано ранее, IL-10 представляет собой противовоспалительный цитокин, который может ограничивать повреждение тканей, вызванное инфекциями или воспалением, что делает IL-10 привлекательным белком для разработки терапевтических препаратов. Человеческий IL-10 существует в растворе преимущественно в виде гомодимера, где две субъединицы IL-10 нековалентно связаны, и каждая субъединица содержит две внутрицепочечные дисульфидные связи. Нарушение димерной структуры, такое как восстановление или сульфитолиз этих дисульфидных связей, может вызвать диссоциацию субъединиц с образованием мономеров IL-10 или его агрегатов, которые могут не обладать биологической активностью димеров. Биологическая активность, связанная с IL-10 в димерной форме, может включать индукцию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNFα), интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-12 (IL-12) и интерлейкин-6 (IL-6). Биологическая активность, связанная с IL-10 в форме димера, может включать подавление экспрессии цитокинов Th1, антигенов MHC класса II и костимулирующих молекул на макрофагах; повышение выживаемости B-клеток, пролиферации и выработке антител; блокирование активности NF-κB; и регулирование пути JAK-STAT.

[242] В настоящем описании представлены лекарственные формы, содержащие IL-10, в которых большая часть IL-10 находятся в форме димера. Кроме того, в настоящем описании представлены растворы для рефолдинга и способы повышения эффективности рефолдинга содержащих IL-10 конструкций, а также способы последующей очистки для дальнейшего получения высоких уровней димера, который может присутствовать в сухом (например, лиофилизированном) лекарственном веществе, а также в конечной пероральной лекарственной форме. ПРИМЕР 3 содержит иллюстративный протокол рефолдинга. ПРИМЕР 4 содержит иллюстративный протокол очистки. ПРИМЕР 5 содержит иллюстративный протокол лиофилизации и итоговое содержание димеров в композициях перед и после лиофилизации.

[243] В некоторых вариантах осуществления молекула IL-10 связана с носителем, который может доставлять IL-10 через эпителиальную клетку кишечника или поляризованную эпителиальную клетку. Это называется конструкцией доставки IL-10. Предпочтительно, IL-10, связанный с носителем, находится в форме димера. В некоторых случаях димер представляет собой гомодимер. В некоторых случаях димер представляет

собой гетеродимер. В некоторых случаях гетеродимер может содержать первый мономер IL-10 и вариантный мономер IL-10, который отличается последовательностью от первого мономера IL-10, образуя димерный IL-10. Когда IL-10 находится в форме димера, либо один мономер, либо оба мономера могут быть связаны с носителем. В одном варианте осуществления каждый IL-10 независимо связан с носителем. Димер конструкции доставки IL-10 можно проиллюстрировать На Фиг. 1. Гомодимер конструкции доставки IL-10 100 может содержать две конструкции доставки IL-10 (например, SEQ ID NO: 5), причем каждая конструкция доставки содержит IL-10 101, связанный спейсером 102 с носителем. Носитель может содержать связывающий домен 103 и транслокационный домен 104.

[244] Процентное содержание димера в композиции может означать процентное содержание от общего количества конструкций доставки IL-10 в форме димера. Например, когда композиция имеет три копии белка слияния IL-10/носитель, две из которых образуют димер, можно считать, что 67% конструкций доставки находятся в форме димера.

[245] IL-10 может представлять собой человеческий IL-10. Человеческий IL-10 может содержать, состоять по существу или состоять из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Варианты IL-10 включают те, что имеют одну или несколько аминокислотных замен, добавлений и/или делеций по сравнению с эталонной последовательностью. Варианты IL-10 могут сохранять способность усиливать регуляцию IL-1Ra в ткани толстой кишки или сыворотке после введения с помощью внутрикишечного распыления у яванских макаков. В некоторых случаях в композициях и способах, описанных в данном документе, предусмотрены варианты IL-10 или SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Варианты IL-10 или SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 могут представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% % идентичность последовательности с ним или его фрагментом. Варианты IL-10 могут содержать аминокислотные замены в одном или нескольких из N36, N36, D73, I87, N110, N115, K117, R128, F129 и N172 относительно SEQ ID NO: 1. Варианты IL-10 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, таких как N36Y, N36I, D73V, I87M, N110I, N115K, K117N, R128W, F129L и N172H относительно SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях вариант IL-10 может содержать замены N36Y, N110I, K117N и N172H. В некоторых случаях IL-10 вариант может содержать N36Y, D73V, I87M, N110I, N115K и R128W относительно SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях IL-10 вариант может содержать N36I, N110I, K117N и F129L относительно SEQ ID NO: 1.

[246] Носитель может представлять собой белок или молекулу другого типа, способную транспортировать гетерологичный груз через или в эпителий (например, поляризованный эпителий кишечника субъекта, такого как человек). Такой транспорт может включать трансцитоз. Процесс трансцитоза может включать взаимодействие (взаимодействия) носителя с одним или несколькими рецепторами и/или белками на

апикальной и/или базальной поверхностях, а также в клетках эпителия (например поляризованной клетка эпителия кишечника). Носитель может быть способен транспортировать гетерологичный груз, такой как IL-10, через эпителий без повреждения эпителия, носителя и/или биологической и/или терапевтической функции груза.

[247] В некоторых вариантах осуществления носитель в настоящем документе использует эндогенный путь доставки для транспортировки связанного с ним гетерологичного груза через поляризованную эпителиальную клетку. Такой носитель может называться в настоящем документе трансцитозным носителем. В некоторых случаях носитель в настоящем документе может использовать эндогенный путь доставки для транспортировки связанного с ним гетерологичного груза в поляризованную эпителиальную клетку. Такой носитель может называться в настоящем документе эндоцитозным носителем. Среди эндоцитозных носителей могут быть носители, которые доставляют связанный с ними груз в определенные области внутри поляризованных эпителиальных клеток, такие как апикальный компартмент, надъядерный компартмент или базальный компартмент.

[248] Любой из носителей в данном документе может транспортировать связанные с ним молекулы путем взаимодействия и/или совместной локализации с одним или несколькими эндогенными белками такого эпителия. Один или несколько эндогенных белков могут представлять собой рецепторы или ферменты, способные перемещать носитель в эпителиальную клетку или через нее. Взаимодействие и/или совместная локализация с одним или несколькими эндогенными белками эпителиальной клетки может снабдить носитель одной или несколькими функциями, включая эндоцитоз в эпителиальную клетку, предотвращение пути разрушения лизосом, перенос из апикального компартмента в базальный компартмент и/или экзоцитоз базальной мембраны эпителиальной клетки в подслизистый компартмент, такой как собственная пластинка.

[249] Носитель может быть получен из полипептида, секретируемого бактерией. Такой носитель может быть получен из полипептида, секретируемого Vibrio cholerae или Pseudomonas aeruginosa. В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой полипептид cholix. В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой полипептид cholix, секретируемый Vibrio cholerae, в то время как в других вариантах осуществления полипептид cholix представляет собой его вариант или получен из некоторых других видов. Полипептид cholix (например, полипептид cholix, секретируемый Vibrio cholerae, или его вариант) может, например, содержать последовательность любой из SEQ ID NO: 20-146 из таблицы 2. В Таблице 4 представлены иллюстративные носители путем идентификации различных последовательностей аминокислотных остатков таких носителей и С-концевые положения, до которых могут быть усечены SEQ ID NO: 20-147. В некоторых вариантах осуществления полипептид cholix не содержит или не состоит из SEQ ID NO: 126. Полипептид cholix может содержать природные и неприродные последовательности

полипептида cholix, а также те последовательности, которые имеют по меньшей мере приблизительно 75%, 80% 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с встречающимися в природе (например, SEQ ID NO: 20-78 или 130-146) или не встречающимися в природе (например, SEQ ID NO: 3 или 11) полипептидом cholix, описанным в настоящем документе. Полипептид cholix также может содержать эндоцитозные и/или трансцитозные фрагменты (например N- и/или С-концевые укорочения полипептида cholix) встречающихся в природе или не встречающихся в природе последовательностей полипептида cholix, причем такие эндоцитозные и/или трансцитозные фрагменты могут иметь по меньшей мере приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности любой из таких встречающихся в природе или не встречающихся в природе полипептидных последовательностей cholix.

[250] В Таблице 3 представлена консенсусная последовательность (SEQ ID NO: 147, формула I) полипептидов, происходящих из cholix, которые можно использовать в качестве носителей в данном документе.

[251] Например, не встречающийся в природе полипептид cholix может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11 (Таблица 1). Носителем полипептида cholix может быть укороченный и/или мутантный вариант полноразмерного полипептида cholix. Примеры трансцитозных носителей могут включать носители, имеющие укорочение на С-конце любой из SEQ ID NO: 3, 11, 20-78 или 130-146, причем укорочение на С-конце может происходить на С-конце полипептида в любом положении аминокислоты после С-концевого остатка в положении 195 (например, усечение в любом из положений 195-634 SEQ ID NO: 3 или 11). Положения аминокислот для усечения можно определить с помощью выравнивания последовательностей с консенсусной последовательностью SEQ ID NO: 147 или любой из эталонных последовательностей SEQ ID NO: 3 или 11. В Таблице 4 ниже показаны диапазоны аминокислот, которые содержатся в иллюстративных носителях и идентифицируют различные С-концевые положения, в которых SEQ ID NO 3, 11, 20-78 или 130-146 могут быть усечены. В некоторых случаях трансцитозные носители включают носители с усечением на С-конце любой из SEQ ID NO: 3, 11, 20-78 или 130-146.

[252] Носитель может представлять собой укороченную версию более длинного полипептида cholix, не встречающегося в природе. Например, носитель может иметь последовательность аминокислот, которая содержит или состоит из аминокислотных остатков 1-206, 1-245, 1-251, 1-266 и 1-386 SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11. Мутация в не встречающемся в природе варианте может содержать одну или несколько замен, делеций и/или добавлений относительно встречающегося в природе полипептида cholix. В некоторых вариантах осуществления носитель в данном документе может содержать замену V1L. Иными словами, в некоторых вариантах осуществления носитель, относящийся к cholix, содержит аминокислоту лейцин в положении «1». (Положение 1

обычно относится к первой аминокислоте вариантов, не содержащих N-концевой метионин, или ко второму положению вариантов, содержащих N-концевой метионин. Другими словами, при определении длины носителя N- концевой метионин, если он присутствует, можно не принимать во внимание.) В некоторых вариантах осуществления носители, содержащие замену V1L, связаны со снижением или устранением расщепления N-концевой аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления носители, содержащие замену V1L, связаны со снижением или устранением ацетилирования N-концевой аминокислоты. Предусмотренный в настоящем документе носитель может иметь пониженную (например, сниженную по меньшей мере на 50%) или уменьшенную активность рибозилирования АДФ (например, рибозилирование фактора элонгации 2) по сравнению с встречающимся в природе вариантом cholix. В некоторых вариантах осуществления носитель может содержать N-концевой метионин. В других вариантах осуществления N-концевой метионин отсутствует.

[253] В данном документе носитель может иметь пониженную (например, сниженную по меньшей мере на 50%) или уменьшенную активность рибозилирования АДФ (например рибозилирование фактора элонгации 2). Носителем может быть полипептид, полученный из cholix, или его вариант, который дополнительно укорочен в любом из положений с 206 по 633 по сравнению с эталонной последовательностью, например, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11. Укороченный белок cholix (например укороченную последовательность SEQ ID NO: 147 или ее варианта), обладающая способностью транспортировать гетерологичный груз посредством трансцитоза, такой как конструкция доставки IL-10, можно назвать функциональным фрагментом. Носители также включают варианты любого из вышеперечисленных, имеющие по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с любой из последовательностей носителя в настоящем документе. В одном случае носитель содержит SEQ ID NO: 3. В другом случае носитель содержит SEQ ID NO: 4. Любой из носителей в данном документе может иметь замену V1L, отдельно или в комбинации с N-концевым метионином. В одном случае носитель содержит SEQ ID NO: 11. В одном случае носитель содержит SEQ ID NO: 12. Носители также включают варианты любого из вышеперечисленных, имеющие по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности любой из последовательностей в настоящем документе.

[254] Носитель может быть связан с IL-10 ковалентно или нековалентно, прямо или непрямо. Когда IL-10 связан с носителем ковалентно, он может быть связан с носителем напрямую или через спейсер. IL-10 может быть связан с С-концом или N-концом носителя. Когда для связывания IL-10 с носителем использован спейсер, спейсер может содержать одну или несколько аминокислот. Примеры рассматриваемых здесь спейсеров включают олигопептидные последовательности, такие как S, $(GS)_x$, $(GGS)_x$, $(GGGS)_x$, (SEQ ID NO: 7) $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 8) или $(GGGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 9), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В некоторых случаях спейсер не содержит остаток S, смежный с последовательностью IL-10, например, SEQ ID NO: 6

(GGGGSGGGGSGGGG).

[255] Носитель и/или IL-10 могут дополнительно содержать одну или несколько модификаций на их N-конце и/или C-конце. Такие модификации могут включать N-концевой остаток метионина или другой известный остаток для экспрессии в гетерологичной системе.

[256] Конструкция доставки IL-10 может совместно локализоваться с клеткой в собственной пластинке, экспрессирующей CD3. Клеткой, экспрессирующей CD3, может быть лимфоцит. Лимфоцит может быть Т-клеткой. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 не локализуется совместно с клеткой собственной пластинки, экспрессирующей CD11c (например, дендритные клетки), CD19 (например, В-лимфоциты) или CD34 (например, эндотелий). Конструкция доставки IL-10 может совместно локализоваться с макрофагом в собственной пластинке. Совместная локализация конструкции доставки IL-10 с клеткой может включать взаимодействие или связывание конструкции доставки IL-10 с рецептором на поверхности клетки. Носитель или IL-10 конструкции доставки IL-10 может взаимодействовать или связываться с рецептором.

[257] В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. Конструкция доставки IL-10 может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления конструкция доставки IL-10 содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. Конструкция доставки IL-10 может иметь по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13. Экспрессия и очистка IL-10, необязательно с одним или несколькими носителями и одним или несколькими спейсерами, как предусмотрено в настоящем документе, может привести к существенному увеличению концентрации димеризованной конструкции доставки IL-10. В одном примере экспрессия и очистка SEQ ID NO: 5 может привести к получению композиции, содержащей более 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% IL-10, который находится в форме димера. В другом примере экспрессия и очистка SEQ ID NO: 13 может привести к композиции, содержащей более 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% IL-10, который находится в форме димера. Такой IL-10 может представлять собой M-hIL10 или M-cholix^{386}-IL-10, причем hIL-10 или cholix^{386}-IL-10 содержит N-концевой метионин (M). Альтернативно, от 85% до 90%, от 85% до 92% или от 85% до 95% IL-10 находится в форме димера.

[258] В некоторых вариантах осуществления от 2% до 5% IL-10 находится в агрегированной форме. В некоторых вариантах осуществления не более 2%, 3%, 4% или

5% IL-10 находится в агрегированной форме. В некоторых вариантах осуществления от 5% до 7% или от 6% до 7% IL-10 находится в форме мономера. В некоторых вариантах осуществления не более 5%, 6%, 7% или 8% IL-10 находится в форме мономера.

[259] Эксклюзионную хроматографию (SE-HPLC) можно использовать для характеристики распределения размера конструкции доставки IL-10. Процент конструкции доставки IL-10, обнаруженной в форме димера, мономера и агрегата в жидкой композиции или лиофилизированной композиции, если она восстановлена в жидкости, может быть определена с помощью SEC-HPLC (Фиг. 34).

[260] Кроме того, в настоящем документе описаны не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты, содержащие, по существу состоящие или состоящие из последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:10, или последовательности нуклеиновой кислоты с идентичностью последовательности по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 92% по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с SEQ ID NO: 10. Нуклеиновая кислота может быть оптимизирована по кодонам. Нуклеиновая кислота может кодироваться вектором. Вектор может быть плазмидным или вирусным вектором. Вирусный вектор может представлять собой лентивирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), ретровирус или вирус простого герпеса. Вектор может быть способным к репликации или неспособным к репликации. Вектор может быть интегрирующим вектором или неинтегрирующим вектором. Клетка может быть трансформирована любым из описанных здесь векторов. Клетка может быть бактериальной клеткой. Бактериальная клетка может быть клеткой Escherichia coli. Клетка может быть дрожжевой клеткой. Дрожжевая клетка может представлять собой клетку Saccharomyces cerevisiae.

Таблица 1 - Последовательности

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
SEQ ID NO: 1	IL-10	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNL PNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLED FKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHV NSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAF NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 2	IL-10, секретируемая активная форма	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFF QMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYL EEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCH RFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIF INYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 3	не существующий в природе	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN

	вариант cholix	WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNC TLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDL SCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV AERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHH PGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQ ALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNT ENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTR AERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT QVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAV AIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDE LK
SEQ ID NO: 4	не существующий в природе вариант cholix (cholix^{386})	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNC TLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDL SCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV AERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHH PGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO: 5	конструкция доставки IL-10	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE

		VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAGGGGSGGGGSGGGGSPGQGTQ SENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQL DNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENK SKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYM TMKIRN
SEQ ID NO: 6	Спейсерная	GGGGSGGGGSGGGG
SEQ ID NO: 10	последовательность ДнК, кодирующая конструкцию доставки IL-10	ATGGMETKAAAGAAGCGCTGAATATTTTTGACGAG TGTCGMETKACCCGTGMETKACCTGACTCCGGAAC CGGGCAAGCCGATTCAGTCCAAACTGTCTATCCCG AGCGACGTTGTGCTGGATGAGGGCGTGTTGTATTA CAGCATGACGATCAATGATGAGCAAAACGACATCA AAGACGAAGATAAGGGTGAGTCTATTATCACCATT GGCGAGTTTGCGACGGTGCGTGCAACGCGCCATTA CGTGAATCAAGACGCGCCGTTTGGTGTCATTCACCT GGATATCACGACCGAAAATGGCACGAAAACCTATT CGTATAATCGCAAAGAGGGCGAGTTCGCGATCAAC TGGCTGGTTCCGATCGGTGAGGAMETKACCCGGCG AGCATCAAGATCAGCGTTGATGAACTGGATCAGCA GCGCAACATTATTGAAGTCCCGAAGTTGTAMETKA CATCGACCTGGATAATCAGACCCTGGAGCAGTGGA AAACCCAGGGTAACGTMETKACTTCTCCGTGACCC GTCCGGAGCACAACATTGCCATMETKACTGGCCGA GCGTMETKACTACAAAGCCGCACAGAAAGAGGGTT CCCGCCACAAGCGTTGGGCTCATTGGCATACCGGT TTGGCGCTGTGTTGGCTGGTGCCGATGGATGCGATC TATAACTACATCACGCAGCAAAATTGCACGCTGGG TGACAATTGGTTCGGTGGCAGCTACGAGACTGTGG CGGGTACCCCTAAGGTTATTACCGTCAAACAGGGT ATTGAGCAAAAGCCTGTCGAGCAGCGTATCCACTT METKACAAGGGTAACGCCATGTCTGCTCTGGCGGC TCAMETKAAGTTTGCGGCGTTCCGCTGGAGACTCT GGCCCGTTCCCGCAAGCCGCGTGACCTGACCGATG ACCTGAGCTGCGCGTATCAAGCGCAAAACATTGTM

		ETKACTTATTCGTTGCGACGCGCATTTTGTTTTCGC
		ACCTGGAMETKACGTGTTCACGCTGAACCTGGATG
		AACAGGAACCAGAAGTGGCAGAGCGTCTGTCAGAT
		CTGCGTCGTATCAACGAAAACAACCCGGGCATGGT
		TACCCAGGTCCTTACGGTTGCACGCCAGATTTACAA
		TGATTACGTGACCCATCACCCGGGTCTGACCCCAG
		AACAAACCAGCGCAGGCGCACAAGCGGGTGGCGG
		TGGTTCCGGTGGCGGTGGMETKACGGTGGCGGTGG
		METKACCCTGGTCAAGGCACCCAATCCGAGAAMET
		KACTGCACGCATTTTCCAGGCAATCTGCCGAATATG
		CTGCGTGACCTCCGCGACGCGTTCTCTCGTGTTAAG
		ACCTTTTTTCAGATGAAAGACCAGCTGGACAATCT
		GCTGCTGAAAGAATCCCTGCTGGAAGATTTCAAAG
		GCTATCTGGGTTGCCAGGCCCTGAGCGAGATGATC
		CAATTCTACTTGGAAGAGGTCATGCCGCAGGCCGA
		AAATCAAGACCCGGACATCAAGGCACACGTGAACA
		GCTTGGGCGAAAACCTGAAAACCCTGCGTTTGCGC
		CTGCGTCGTTGTCACCGTTTCCTGCCGTGCGAGAAT
		AAGAGCAAAGCCGTCGAACAAGTCAAAAATGCATT
		CAACAAGCTGCAAGAGAAAGGTATCTACAAGGCTA
		TGAGCGAGTTTGACATTTTCATTAACTACATTGAAG
		CGTACATGACCATGAAGATCCGTAAC
SEQ ID NO: 11	не существующий в природе вариант cholix (V1L)	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNC TLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDL SCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV AERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHH PGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQ ALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNT

		ENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTR AERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT QVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAV AIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDE LK
SEQ ID NO: 12	не существующий в природе вариант cholix (cholix^{386}) (V1L)	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDE GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDN QTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNC TLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIH FSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDL SCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEV AERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHH PGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO: 13	конструкция доставки IL-10 (cholix V1L)	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLD NQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRI HFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAGGGGSGGGGSGGGGSPGQGTQ SENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQL DNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENK SKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYM TMKIRN
SEQ ID NO: 151	легкая цепь Fab Humira	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVA

		APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 152	тяжелая цепь Fab Humira	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSC
SEQ ID NO: 153	легкая цепь Fab Remicade	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINT VESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 154	тяжелая цепь Fab Remicade	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNW VRQSPEKGLEWVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISR DDSKSAVYLQMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGSTYDY WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKT

Таблица 2 -Дополнительные полипептиды cholix

SEQ ID NO: 130	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK

EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAKQSIAISWP
SVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCT
LGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАн

SEQ ID NO: ИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVAT
131 RILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVA
RQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNND
QANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREG
YVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATH
AEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYR
TNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI
HAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITT
ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEV
PKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVSY
KAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGD
NWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕА

SEQ ID NO: LAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILF
132 SHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI
YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQA
NINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVF
VGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEV
AHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNT
PLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAV
AIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI

SEQ ID NO: NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
133 NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYERLTPAEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 134

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYERLTPAEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKQIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 135

CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEKKWGGLYVATHAEVAHGYARI

KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG

SEQ ID NO: 136

VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK
EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG

SEQ ID NO: 137

VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVSTHAEVAHGYARIK
EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI

SEQ ID NO: 138

NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEKKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 139

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIHRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

SEQ ID NO: 140

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI

KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 141

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAER
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 142

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAER
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI

SEQ ID NO: 143

NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRMLFSHLDS
VFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYV
THHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 144

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYAR
LKKGTGNAELPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITHVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEVLAIDEEAVAEEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVFFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

SEQ ID NO: 145

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVTERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI

SEQ ID NO: 146	KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIHRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
SEQ ID NO: 20	CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVALNNDQANINIESRS GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 21	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQAPEVAERLSALRQINENNPGVVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
SEQ ID NO: 22 FTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITDVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SEQ ID NO: 23 SYETVAGTPKAIMVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHR
VCGVPLETLARSRKPRYLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDS
VFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYV
THHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA

SEQ ID NO: 24

RIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENA
EEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTI
PGNAYEELAIDEEAVAKEQSISPKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKDGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPAVAERLSAIRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKDGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV

SEQ ID NO: 25

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKHCVASNNDQANINVESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENA
ERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTI
PGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

SEQ ID NO: 26

EGSRHKRWAHWRTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV
PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTL
NLEEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG
TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT
QVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA
YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSNGNAMSALAAHRVCG
VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
SEQ ID NO: 27 LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK
EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
SEQ ID NO: 28 GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG
VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLLENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK

SEQ ID NO: 29

EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQKNCTLGDNWFG
GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG
VPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK

SEQ ID NO: 30

EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI

SEQ ID NO: 31

KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG
VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
SEQ ID NO: 32 LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK
EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQKNCTLGDNWFG
SEQ ID NO: 33 GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG
VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK

SEQ ID NO: 34

EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITDVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAIHWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

SEQ ID NO: 35

SEQ ID NO: 36

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATIRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCG
VPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFT
SEQ ID NO: 37
LNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK
EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITFGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITT
ENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEV
PKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ
KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWF
SEQ ID NO: 38 GGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVC
GVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVF
TLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK

SEQ ID NO: 39

EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE
GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
YETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIF
TLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTN
HVAAQSIVNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQE
GTADGGGLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNL
VERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPG
NSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRV

SEQ ID NO: 40

CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 41

VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
SEQ ID NO: 42 FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQNIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SEQ ID NO: 43 SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI

SEQ ID NO: 44	KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDIAIHAVAIPSTIPGN AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
SEQ ID NO: 45	EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИETLAAHRV CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
SEQ ID NO: 46	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK

EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИETLAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
SEQ ID NO: 47 FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCLLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SEQ ID NO: 48 SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA

SEQ ID NO: 49

RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVIPGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕТLAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESR
SGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
RHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV

SEQ ID NO: 50

AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK

SEQ ID NO: 51

NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSQKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
SEQ ID NO: 52 LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
SEQ ID NO: 53 AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG

SEQ ID NO: 54

TGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ
VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAY
EGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK

SEQ ID NO: 55

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGIPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPL
ETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL
DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPG
LTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY
LPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 56

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK

NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGIPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPL
ETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL
DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPG
LTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY
LPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE
HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG
NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKN
GSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAG
TPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLET
LARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQ
SEQ ID NO: 57 EPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE
QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPEN
RAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQTI
VNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYG
LPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHS
LPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEGLTT
DEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSFNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAQKD
GARHKRWAHWHTGLALCWLVPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
SEQ ID NO: 58 YETVAGTPKAITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRV
CGVPLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTIARQIYNDYVT
EHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGT
NHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWGGVYVATHAELAHRYARI

SEQ ID NO: 59

KEGTGENGLPTTEEKKSRGVMLRVYLPRASLERFYRTNIPLENADE
HVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGEDETAIGWDMAIHGVAIPSTIP
GNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSFNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAQKD
GARHKRWAHWHTGLALCWLVPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
YETVAGTPKAITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTIARQIYNDYVT
EHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGT
NHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWGGVYVATHAEVNHRYARI

SEQ ID NO: 60

KEGTGENGLPTTEEKKSRGVMLRVYLPRASLERFYRTNIPLENADE
HVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGEDETAIGWDMAIHGVAIPSTIP
GNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSFNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAQKD
GARHKRWAHWHTGLALCWLVPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
YETVAGTPKAITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTIARQIYNDYVT
EHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGT
NHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWGGVYVATHAELAHRYARI

SEQ ID NO: 61

KEGTGENGLPTTEKKKSRGVMLKVYLPRASLERFYRTNIPLENADE
HVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGГЕнTAIGWDMAIHGVAIPSTIPGN
SYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK

NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVIPGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
SEQ ID NO: 62 LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAE
EHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP
GNAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSFNRKEGEFAINWLVIPGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAQKD
GARHKRWAHWHTGLALCWLVPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
SEQ ID NO: 63 YETVAGTPKAITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRV
CGVPLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTIARQIYNDYVT
EHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRS
GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGT
NHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWGGVYVATHAELAHRYARI

SEQ ID NO: 64

KEGTGENGLPTTEEKKSRGVMLRVYLPRASLERFYRTNIPLENADE
HVTQVIGHPLPLRNEAFTGPESAGGEDETAIGWDMAIHGVAIPSTIP
GNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG
TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT
QVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA
YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVP

SEQ ID NO: 65

LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG
TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA
RIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENA
EEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTI
PGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEQSIAISWPSVSYNAAHK

NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINVESRSGR
SYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNH
VAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE
GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHI
TQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
SEQ ID NO: 67 LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG
TGNGGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT
QVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA
YEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
SEQ ID NO: 68 AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG

SEQ ID NO: 69

TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT
QVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA
YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKMYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG

SEQ ID NO: 70

TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT
QVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA
YEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQKRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVA
GTPEAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLE
TLARSRKPRDLQDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD
EQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGL
TPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYL
PENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAA
QTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTG

SEQ ID NO: 71

EYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI
GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEE
LAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKN

GSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAG
TPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLET
LARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQ
EPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE
QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPEN
RAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSI
VNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGG
GLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGH
PLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPI
DEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKN
GSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAG
TPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLET
LARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQ
SEQ ID NO: 72 EPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPLLTPE
QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPEN
RAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSI
VNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGG
GLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGH
PLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPI
DEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKN
GSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAG
SEQ ID NO: 73 TPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLET
LARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQ
EPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE
QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPEN
RAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSI
VNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGG

SEQ ID NO: 74	GLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGH PLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPI DEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLFIPGDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAIEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQE PAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL PLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAID EEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 75	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK NGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWYGGAYKTV AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRVCGVP LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDTDKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA RIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENA EEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTI PGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 76	VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK

NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG
TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHIT
QVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNA
YEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV
AGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
SEQ ID NO: 77 LDEQAPEVAERLSDLRRINEDNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELETTHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG
TGEYGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ
VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAY
EELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK
NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTV
SEQ ID NO: 78 AGTPKAITVKQGIEQKAVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVP
LETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLN
LDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP
GLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS
YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV
AAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG

SEQ ID NO: 79

TGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQ
VIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAIPSTIPGNAY
EELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK
TPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESII
TIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAI
NWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT
QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLA
LCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGI
EQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL
PDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDD
LRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
ILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTN
WTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGS
DTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARG
VMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTG
TDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQS
ISAKPPYKEQKDELK

SEQ ID NO: 80

SIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATR
HYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSP
ASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRP
EHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIY
NYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHF
SKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQ
NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPG
MVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDAD
KSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEA
THQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKW
GGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIP
RASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDE
TVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKER
KDELK

SEQ ID NO: 81

MTINDEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLD
ITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII
EVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSV
SYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLG

DNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕ
ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRI
LFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVAR
QIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQ
ANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGY
VFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE
VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN
TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHA
VAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIMDEGKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFTINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW
AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTP
KAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLA

SEQ ID NO: 82 RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQE
PEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ
TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR
AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV
NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL
PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL
PLRNEAFTGPESAGGEDETIIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIMDEGKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW
AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGT
PKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETL

SEQ ID NO: 83 ARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQ
EPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE
QTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN
RAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTI
VNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYG
LPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHS
LPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIMDEGKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW
AHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTP
KAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLA

SEQ ID NO: 84 RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQE
PEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ
TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR
AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV
NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL
PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL
PLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDI
TTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII
EVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA
AHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAY
KTVAGTPKAITVKQGIEQKAVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVC
GVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVF

SEQ ID NO: 85 TLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN
HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK
EGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHI
TQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK

MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGDFATVRATRHYVNQDAPFGVINLD
ITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNII
EVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKA
AHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAY

SEQ ID NO: 86 KTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVC
GVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVF
TLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH
HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG
RSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN

HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIK
EGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH
ITQVIGHSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGN
AYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
CSLTPEPGKPIQSQLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
SEQ ID NO: 87 DLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPERAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV
KQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL
SEQ ID NO: 88 TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS
ALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQG
VTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP
RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER
DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
SEQ ID NO: 89 EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK

QGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 90

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLIPEQTSAGAQ
AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQ
GVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPV
PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER
EARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 91

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRA
ERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITDVIGHSLPLRN
EAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 92

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG

ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVALNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAIMV
KQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKP

SEQ ID NO: 93

RYLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAE
RLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKD
GEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE
QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHW

SEQ ID NO: 94

HTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAIT
VKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSR
KPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAV
AERLSAIRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSA
GAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI
TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI

SEQ ID NO: 95

APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTR
AERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR
NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKD
GEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE
QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHW
HTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAIT
VKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRVCGVPLETLARSR
KPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAV
AERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSA
GAQAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI
TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI
APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTR
AERDARGVMLRVYIPRASLERFYLTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR
NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV
KQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL

SEQ ID NO: 96

TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS
DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQG
VTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP
RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER
DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV
KQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL

SEQ ID NO: 97

TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS
DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQG
VTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP
RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYTRIKEGTGEYGLPTRAERD
ARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAF
TGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV
KQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL

SEQ ID NO: 98 TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS
DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
ADILSLFYPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQG
VTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP
RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER
DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV
KQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL

SEQ ID NO: 99 TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS
DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQG
VTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP
RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAER
ETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 100 CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG

SEQ ID NO: 101

EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPMDAIYNYITQKNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV
KQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL
TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLS
DLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQG
VTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVP
RGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER
DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 102

CSLTPELGKPIQSKLSISSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE

SEQ ID NO: 103

RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE

SEQ ID NO: 104

RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE

SEQ ID NO: 105

RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAER

LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER

SEQ ID NO: 106

LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
REARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAER

SEQ ID NO: 107

LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDDQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ

SEQ ID NO: 108

WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT
GLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVK
QGIEQKPVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQNIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIMDEGKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRW
ANWLTTLPKVVLCFFEDPELCTYGEDWHGGAYKTVAGTPKAITVK
SEQ ID NO: QGIEQKTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPR
DLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAER
109 LSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITP
QGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAP
VPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAE
RDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTLLENAEEHITQVIGHSLPLRNE
AFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKES
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFT
TSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQ
SEQ ID NO: KTVEQRIHFSKKнA3BAнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD
110 DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL
RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
ILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN
WTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPV
PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER
DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA

SEQ ID NO: 111

FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKES
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFT
TSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQ
KTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD
DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL
RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
ILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN
WTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHGTNHAAAQTIVNRIAPV
PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQ
ETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA

SEQ ID NO: 112

FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT
TLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQ
KTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTD
DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL
RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
ILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN
WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN
NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR
GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTG

SEQ ID NO: 113

PESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS
CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT
TLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQ
KTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD
DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQAPEVAERLSDL
RRINEDNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADI

LSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN
WTYQELETTHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN
NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERETRG
VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE
SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 114

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT
TLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQ
KTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD
DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL
RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
ILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN
WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN
NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERETRG
VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE
SAGGEDETVIGWDMAIYAVAIPS

SEQ ID NO: 115

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFT
TSPKVTLCFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGIPKAITVKQGIEQ
KTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD
DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSAL
RQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAD
ILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN
WTYQELEATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPV
PRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQ
ETRGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA
FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 116

CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG
EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT

SEQ ID NO: 117	TLPKVVLCFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVAGTPGAITVKQGIEQ KTVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQIN ENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLF CPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTY QELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTE NEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVM LRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESA GGEDETVIGWDMAIHAVAIPS CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEG EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQKRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT TLPKVVLCFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVAGTPEAITVKQGIEQK TVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDD LSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSALR QINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL SLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNW TYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNN TENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARG VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG ESIIIIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEG EFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT
SEQ ID NO: 118	TLPKVVLCFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQ KTVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINE NNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFC PDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRVVITPQGVTNWTYQ ELDATHQALTKPACнЫЙYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGN NTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERETRG VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS

SEQ ID NO: 119

CSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKES
EFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT
TLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQK
TVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDD
LSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRR
INENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS
LFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNW
TYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGSDT
ESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGV
MLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTGT
DAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPS

SEQ ID NO: 120

CSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKG
ESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKES
EFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ
WENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLT
TLPEVVLCFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQK
TVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDD
LSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRR
INENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSASAQAADILSL
FCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNWT
YQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGSDTE
SERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVM
LRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTGTDA
EEGSDETAIGWDMAIHGVAIPS

SEQ ID NO: 121

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKQIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
EGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGG
SYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT
HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS

SEQ ID NO: 122

GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGT
NHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEKKWGGLYVATHAEVAHGYARI
KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE
NGTKTYSFNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAEKD
GARHKRWAHWHTGLALCWLVPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
YETVAGTPKAITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTIARQIYNDYVT
EHPGLTPEQTSAGAQAADILSLLCPDADGSCVASNSDQANINIESRS

SEQ ID NO: 123

GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGT
NHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWGG
VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI
NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE
NGTKTYSFNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK
LYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAEKD
GARHKRWAHWHTGLALCWLVPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS
YETVAGTPKAITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИEALAAHRV
CGVPLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATRILFSHLDSV
FTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENNPGMVTQVLTIARQIYNDYVT
EHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRS

SEQ ID NO: 124

GRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYVFVGYHGT
NHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWGG
YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG
SRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY
ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSNGNAMSALAAHRVCGVPL
ETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL
DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGL
TPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYL
PENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAA
QTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTG
EYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVI
GHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEE

LAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 125 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTE NGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQKRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAHK NGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVA GTPEAITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRVCGVPLE TLARSRKPRDLQDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD EQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGL TPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYL PENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHV

SEQ ID NO: 126 VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTE NGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPK LYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS YETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKнАЗВАнИЕALAAHRV CGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIF TLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTH HPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIES

SEQ ID NO: 127 LFSHLDSVFTLNLHEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVAR QIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQ ANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGY VFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHA VAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 128 AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL PLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAID EEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 129 AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGL PTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSL

PLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAID EEAVAKEQSISTKPPYKERKDEL

Таблица 3 -ФОРМУЛА I

SEQ ID NO: 147	X1-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16-L-T-P-E-X21-G-K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P-X33-D-V-V-L-D-E-G-V-L-Y-Y-S-M-T-I-N-D-E-Q-N-D-I-X56-D-E-X59-K-G-E-S-I-I-T-X67-G-E-F-A-T-X73-R-A-T-R-H-Y-V-X81-Q-D-A-P-F-G-V-I-X90-L-D-I-T-T-E-N-G-T-K-X101-Y-S-X104-N-R-K-X108-X109-E-F-X112-I-X114-W-L-V-X118-X119-G-E-D-S-P-A-S-I-K-I-S-X131-D-E-X134-D-Q-X137-R-N-I-I-E-V-P-K-L-Y-S-I-D-L-D-N-Q-T-L-E-Q-W-X160-X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V-T-R-P-E-X174-X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186-A-A-X189-K-X191-G-X193-R-H-K-R-W-A-X200-W-X202-T-X204-X205-X206-X207-X208-X209-L-X211-X212-X213-X214-X215-X216-X217-X218-X219-X220-X221-X222-X223-X224-C-T-X227-G-X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-X237-T-V-A-G-X242-P-X244-X245-I-X247-V-K-Q-G-X252-E-Q-K-X256-V-E-Q-R-I-H-F-S-X265-X266-N-A-X269-X270-X271-L-A-A-H-R-V-C-G-V-P-L-E-T-L-A-R-X288-R-K-P-R-X293-L-X295-D-D-L-X299-C-X301-Y-X303-A-Q-X306-I-V-S-L-F-X312-A-T-R-X316-L-F-X319-H-X321-D-S-X324-F-T-L-N-L-X330-X331-Q-X333-P-X335-V-X337-E-R-L-X341-X342-X343-R-X345-I-N-E-X349-N-P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N-D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A-X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397-D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A-N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A-V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T-Y-Q-E-L-X443-X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-E-X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-R-I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501-X502-X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T-X512-X513-X514-X515-X516-X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-G-V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y-R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552-X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H-X562-L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-X573-X574-X575-X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D-X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K; где X1 выбирают из группы, состоящей из V и L; X3 выбирают из группы, состоящей из E и

D; X4 выбирают из группы, состоящей из A и E; X6 выбирают из группы, состоящей из N и K; X16 выбирают из группы, состоящей из S и L; X21 выбирают из группы, состоящей из P и L; X24 выбирают из группы, состоящей из P и Q; X30 выбирают из группы, состоящей из S и F; X33 выбирают из группы, состоящей из S и G; X56 выбирают из группы, состоящей из K и M; X59 выбирают из группы, состоящей из D и G; X67 выбирают из группы, состоящей из I и F; X73 выбирают из группы, состоящей из V и I; X81 выбирают из группы, состоящей из N и S; X90 выбирают из группы, состоящей из ч и N; X101 выбирают из группы, состоящей из T и M; X104 выбирают из группы, состоящей из Y и F; X108 выбирают из группы, состоящей из E и D; X109 выбирают из группы, состоящей из G и S; X112 выбирают из группы, состоящей из A и T; X114 выбирают из группы, состоящей из N и H; X118 выбирают из группы, состоящей из P и I; X119 выбирают из группы, состоящей из I и P; X131 выбирают из группы, состоящей из V и I; X134 выбирают из группы, состоящей из L и I; X137 выбирают из группы, состоящей из Q и K; X160 выбирают из группы, состоящей из K и E; X161 выбирают из группы, состоящей из T и N; X166 выбирают из группы, состоящей из S и F; X168 выбирают из группы, состоящей из S и A; X174 выбирают из группы, состоящей из ч и Q; X175 выбирают из группы, состоящей из N, S, SIAKQS (SEQ ID NO: 148) и SIAKQSIAKQS (SEQ ID NO: 149); X186 выбирают из группы, состоящей из K и N; X189 выбирают из группы, состоящей из Q, E и H; X191 выбирают из группы, состоящей из E, N и D; X193 выбирают из группы, состоящей из S и A; X200 выбирают из группы, состоящей из ч и N; X202 выбирают из группы, состоящей из H, L, F и R; X204 выбирают из группы, состоящей из G и T; X205 выбирают из группы, состоящей из L и S; X206 выбирают из группы, состоящей из A и P; X207 выбирают из группы, состоящей из L, E и K; X208 выбирают из группы, состоящей из C и V; X209 выбирают из группы, состоящей из W, V и T; X211 выбирают из группы, состоящей из V и не содержащей аминокислоты; X212 выбирают из группы, состоящей из P и не содержащей аминокислоты; X213 выбирают из группы, состоящей из M, I, L и не содержащей аминокислоты; X214 выбирают из группы, состоящей из D и не содержащей аминокислоты; X215 выбирают из

группы, состоящей из A и не содержащей аминокислоты; X216 выбирают из группы, состоящей из I и не содержащей аминокислоты; X217 выбирают из группы, состоящей из Y и C; X218 выбирают из группы, состоящей из N и F; X219 выбирают из группы, состоящей из Y и F; X220 выбирают из группы, состоящей из I и E; X221 выбирают из группы, состоящей из T и D; X222 выбирают из группы, состоящей из Q и P; X223 выбирают из группы, состоящей из Q, E и A; X224 выбирают из группы, состоящей из N, L и Q; X227 выбирают из группы, состоящей из L и Y; X229 выбирают из группы, состоящей из D и E; X230 выбирают из группы, состоящей из N и D; X232 выбирают из группы, состоящей из F, ч и Y; X235 выбирают из группы, состоящей из S и A; X237 выбирают из группы, состоящей из E и K; X242 выбирают из группы, состоящей из T и I; X244 выбирают из группы, состоящей из K, E и G; X245 выбирают из группы, состоящей из V и A; X247 выбирают из группы, состоящей из T и M; X252 выбирают из группы, состоящей из I и M; X256 выбирают из группы, состоящей из P, T и A; X265 выбирают из группы, состоящей из K, Q и N; X266 выбирают из группы, состоящей из G и K; X269 выбирают из группы, состоящей из M и I; X270 выбирают из группы, состоящей из S и E; X271 выбирают из группы, состоящей из A и T; X288 выбирают из группы, состоящей из S и G; X293 выбирают из группы, состоящей из D и Y; X295 выбирают из группы, состоящей из T, P и Q; X299 выбирают из группы, состоящей из S и Q; X301 выбирают из группы, состоящей из A и V; X303 выбирают из группы, состоящей из Q и N; X306 выбирают из группы, состоящей из N и Q; X312 выбирают из группы, состоящей из V и L; X316 выбирают из группы, состоящей из I и M; X319 выбирают из группы, состоящей из S и T; X321 выбирают из группы, состоящей из L и I; X324 выбирают из группы, состоящей из V и I; X330 выбирают из группы, состоящей из D, E и H; X331 выбирают из группы, состоящей из E и G; X333 выбирают из группы, состоящей из E и A; X335 выбирают из группы, состоящей из E и A; X337 выбирают из группы, состоящей из A и T; X341 выбирают из группы, состоящей из S, D и T; X342 выбирают из группы, состоящей из D и A; X343 выбирают из группы, состоящей из L и I; X345 выбирают из группы, состоящей из R и Q; X349 выбирают из группы, состоящей из

N и D; X353 выбирают из группы, состоящей из M и V; X355 выбирают из группы, состоящей из T и I; X360 выбирают из группы, состоящей из V и I; X371 выбирают из группы, состоящей из ч и E; X374 выбирают из группы, состоящей из G и L; X376 выбирают из группы, состоящей из T и I; X383 выбирают из группы, состоящей из G и S; X393 выбирают из группы, состоящей из F и L; X394 выбирают из группы, состоящей из C и Y; X397 выбирают из группы, состоящей из A и T; X399 выбирают из группы, состоящей из K, E и G; X400 выбирают из группы, состоящей из S, P и H; X404 выбирают из группы, состоящей из S и L; X405 выбирают из группы, состоящей из N и D; X406 выбирают из группы, состоящей из N и S; X413 выбирают из группы, состоящей из I и V; X423 выбирают из группы, состоящей из P и L; X431 выбирают из группы, состоящей из P и Q; X443 выбирают из группы, состоящей из E и D; X444 выбирают из группы, состоящей из A и T; X445 выбирают из группы, состоящей из T и K; X448 выбирают из группы, состоящей из A и T; X451 выбирают из группы, состоящей из R и Q; X453 выбирают из группы, состоящей из G и D; X465 выбирают из группы, состоящей из V и A; X469 выбирают из группы, состоящей из T, S и N; X475 выбирают из группы, состоящей из A, S и T; X481 выбирают из группы, состоящей из N и S; X482 выбирают из группы, состоящей из N и D; X485 выбирают из группы, состоящей из N, S и K; X487 выбирают из группы, состоящей из E, R и K; X488 выбирают из группы, состоящей из K и E; X492 выбирают из группы, состоящей из L и V; X495 выбирают из группы, состоящей из A и S; X497 выбирают из группы, состоящей из ч и D; X499 выбирают из группы, состоящей из E и S; X500 выбирают из группы, состоящей из V и L; X501 выбирают из группы, состоящей из A и N; X502 выбирают из группы, состоящей из ч и Y; X503 выбирают из группы, состоящей из G и R; X505 выбирают из группы, состоящей из A и T; X507 выбирают из группы, состоящей из I и L; X508 выбирают из группы, состоящей из K и Q; X509 выбирают из группы, состоящей из E и K; X512 выбирают из группы, состоящей из G и A; X513 выбирают из группы, состоящей из E, D и N; X514 выбирают из группы, состоящей из Y, G и N; X515 выбирают из группы, состоящей из G и E; X516 выбирают из группы, состоящей из L и G; X517

выбирают из группы, состоящей из P и L; X519 выбирают из группы, состоящей из R, P и T; X520 выбирают из группы, состоящей из A и E; X521 выбирают из группы, состоящей из E и K; X522 выбирают из группы, состоящей из R, Q и K; X523 выбирают из группы, состоящей из D, K и E; X524 выбирают из группы, состоящей из A, T и S; X530 выбирают из группы, состоящей из R и K; X533 выбирают из группы, состоящей из I и L; X534 выбирают из группы, состоящей из P и H; X535 выбирают из группы, состоящей из R и Q; X544 выбирают из группы, состоящей из T и I; X546 выбирают из группы, состоящей из T и I; X547 выбирают из группы, состоящей из P и D; X550 выбирают из группы, состоящей из N и K; X551 выбирают из группы, состоящей из A и E; X552 выбирают из группы, состоящей из E, R и D; X553 выбирают из группы, состоящей из E, N и R; X554 выбирают из группы, состоящей из ч и L; X555 выбирают из группы, состоящей из I и V; X556 выбирают из группы, состоящей из T и E; X557 выбирают из группы, состоящей из Q, R, ч и D; X562 выбирают из группы, состоящей из S и P; X573 выбирают из группы, состоящей из P и T; X574 выбирают из группы, состоящей из E и D; X575 выбирают из группы, состоящей из S и R; X576 выбирают из группы, состоящей из A, E и V; X577 выбирают из группы, состоящей из G, E и D; X579 выбирают из группы, состоящей из E и S; X580 выбирают из группы, состоящей из D и N; X583 выбирают из группы, состоящей из V и A; X588 выбирают из группы, состоящей из M и I; X591 выбирают из группы, состоящей из ч и Y; X592 выбирают из группы, состоящей из A и G; X603 выбирают из группы, состоящей из A и S; X605 выбирают из группы, состоящей из E и A; X606 выбирают из группы, состоящей из E, A, Q, G, V и R; X608 выбирают из группы, состоящей из A, P и T; X609 выбирают из группы, состоящей из I, T и P; X610 выбирают из группы, состоящей из D и A; X614 выбирают из группы, состоящей из V и VVKEAI (SEQ ID NO: 150); X616 выбирают из группы, состоящей из K и E; X622 выбирают из группы, состоящей из T и P; иX629 выбирают из группы, состоящей из R, Q и H; и X630 выбирают из группы, состоящей из K и не содержащей аминокислоты.

Таблица 4 - Иллюстративные трансцитозные носители, идентифицирующие аминокислотные остатки согласно любой из SEQ ID NO: 20-147

AA остатки	AA остатки	AA остатки
1-195	1-269	1-343
1-196	1-270	1-344
1-197	1-271	1-345
1-198	1-272	1-346
1-199	1-273	1-347
1-200	1-274	1-348
1-201	1-275	1-349
1-202	1-276	1-350
1-203	1-277	1-351
1-204	1-278	1-352
1-205	1-279	1-353
1-206	1-280	1-354
1-207	1-281	1-355
1-208	1-282	1-356
1-209	1-283	1-357
1-210	1-284	1-358
1-211	1-285	1-359
1-212	1-286	1-360
1-213	1-287	1-361
1-214	1-288	1-362
1-215	1-289	1-363
1-216	1-290	1-364
1-217	1-291	1-365
1-218	1-292	1-366
1-219	1-293	1-367
1-220	1-294	1-368
1-221	1-295	1-369
1-222	1-296	1-370
1-223	1-297	1-371
1-224	1-298	1-372
1-225	1-299	1-373
1-226	1-300	1-374
1-227	1-301	1-375
1-228	1-302	1-376

1-229	1-303	1-377
1-230	1-304	1-378
1-231	1-305	1-379
1-232	1-306	1-380
1-233	1-307	1-381
1-234	1-308	1-382
1-235	1-309	1-383
1-236	1-310	1-384
1-237	1-311	1-385
1-238	1-312	1-386
1-239	1-313	1-387
1-240	1-314	1-388
1-241	1-315	1-389
1-242	1-316	1-390
1-243	1-317	1-391
1-244	1-318	1-392
1-245	1-319	1-393
1-246	1-320	1-394
1-247	1-321	1-395
1-248	1-322	1-396
1-249	1-323	1-397
1-250	1-324	1-398
1-251	1-325	1-399
1-252	1-326	1-400
1-253	1-327	1-401
1-254	1-328	1-402
1-255	1-329	1-403
1-256	1-330	1-404
1-257	1-331	1-405
1-258	1-332	1-406
1-259	1-333	1-407
1-260	1-334	1-408
1-261	1-335	1-409
1-262	1-336	1-410
1-263	1-337	1-411

1-264	1-338	1-412
1-265	1-339	1-413
1-266	1-340	1-414
1-267	1-341	1-415
1-268	1-342	

Способы получения

[261] В одном варианте осуществления экспрессию, выделение, очистку и рефолдинг (например, конструкции доставки IL-10) можно проводить согласно процессу, показанному На Фиг. 2A. В другом варианте осуществления экспрессию, выделение, очистку и рефолдинг (например, конструкции доставки IL-10) можно проводить согласно процессу, показанному На Фиг. 2B.

[262] На этапе 201 На Фиг. 2A или на этапе 301 На Фиг. 2B клетки конструируют и культивируют для рекомбинантной экспрессии конструкции доставки IL-10, такой как SEQ ID NO: 5, путем трансформации клеток плазмидой, кодирующей конструкцию доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления плазмида содержит нуклеиновую кислоту, соответствующую последовательности в SEQ ID NO 10 (или последовательности, имеющей с ней по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности), которая представляет собой кодон-улучшенную последовательность для экспрессии в бактериях. Плазмида может дополнительно содержать маркер устойчивости к антибиотикам. Антибиотиком, устойчивость к которому может придать плазмида, может быть канамицин, ампициллин, тетрациклин или хлорамфеникол. В некоторых случаях клетки представляют собой клетки бактерий. Бактериями могут быть Escherichia coli. Трансформированные клетки можно дополнительно размножить. Размножение трансформированных клеток может представлять собой клональное размножение. Размноженные клетки можно переместить в производственный биореактор для ферментации. Ферментация может происходить в биореакторе 1500 L. В некоторых вариантах осуществления ферментация происходит при наличии антибиотика, к которому плазмида придает устойчивость. Производственная ферментация может включать в себя фазу роста клеток с последующей фазой экспрессии. Фаза экспрессии может включать в себя использование изопропIL-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) в качестве индуктора. Конструкция доставки IL-10 может экспрессироваться внутриклеточно в виде нерастворимых телец включения. В конце получения клетки можно собрать путем центрифугирования. Это центрифугирование может дать первый осадок, содержащий клетки. Первый осадок можно ресуспендировать в первом буфере. Первый буфер может содержать от 40 мМ до 60 мМ Tris, предпочтительно 50 мМ. Первый буфер может иметь pH от 7,5 до 8,5, предпочтительно pH 8,0. Первый буфер может дополнительно содержать от 15 мМ до 25 мМ EDTA, предпочтительно 20 мМ EDTA. Массовое отношение клеток в первом осадке к первому буферу может составлять от 1:4 до 1:6, предпочтительно 1:5.

Первый осадок можно смешивать с первым буфером от 50 до 70 минут, предпочтительно 60 минут, до получения гомогенной смеси.

[263] На этапе 202 На Фиг. 2A или на этапе 302 На Фиг. 2B культивируемые клетки разрушают, например путем лизиса, для высвобождения телец включения. Лизис может включать гомогенизацию при высоком давлении. Гомогенизация при высоком давлении может происходить в микрофлюидизаторе. Гомогенизация при высоком давлении может происходить при давлении от 16000 до 20000 ф/кв.д. или приблизительно 18000 ф/кв.д. Можно провести два раунда лизиса, чтобы обеспечить лизис по существу всех клеток. Лизированные клетки можно центрифугировать со скоростью от 6000 до 10000 об/мин или приблизительно 8000 об/мин. Центрифугирование можно проводить от 30 до 50 минут или приблизительно 40 минут, и оно может давать второй осадок.

[264] Супернатант можно удалить, а второй осадок можно ресуспендировать во втором буфере. Второй буфер может содержать от 40 мМ до 60 мМ Tris, предпочтительно 50 мМ. Второй буфер может иметь pH от 7,5 до 8,5, предпочтительно pH 8,0. Второй буфер может дополнительно содержать от 15 мМ до 25 мМ EDTA, предпочтительно 20 мМ EDTA. Второй буфер может дополнительно содержать от 2% до 3% Trion X-100, предпочтительно 2,5%. Второй буфер может дополнительно содержать от 450 мМ до 550 мМ NaCl, предпочтительно 500 мМ. Массовое соотношение второго осадка и второго буфера может быть от 1:4 до 1:6, предпочтительно 1:5. Ресуспендирование второго осадка во втором буфере можно проводить путем центрифугирования со скоростью от 6000 до 10000 об/мин или приблизительно 8000 об/мин. Центрифугирование может происходить в течение 15-25 минут или приблизительно 20 минут и может давать третий осадок.

[265] Супернатант можно удалить, и третий осадок можно ресуспендировать в третьем буфере. Третий буфер может содержать от 40 мМ до 60 мМ Tris, предпочтительно 50 мМ. Третий буфер может иметь pH от 7,5 до 8,5, предпочтительно pH 8,0. Третий буфер может дополнительно содержать от 15 мМ до 25 мМ EDTA, предпочтительно 20 мМ EDTA. Массовое соотношение третьего осадка и третьего буфера может быть от 1:4 до 1:6, предпочтительно 1:5. Ресуспендирование третьего осадка в третьем буфере можно проводить путем центрифугирования со скоростью от 6000 до 10000 об/мин или приблизительно 8000 об/мин. Центрифугирование может происходить в течение 15-25 минут или приблизительно 20 минут и может давать четвертый осадок.

[266] Супернатант можно удалить, а четвертый осадок можно ресуспендировать в четвертом буфере. Четвертый буфер может содержать от 40 мМ до 60 мМ Tris, предпочтительно 50 мМ. Четвертый буфер может иметь pH от 7,5 до 8,5, предпочтительно pH 8,0. Массовое соотношение четвертого осадка и четвертого буфера может быть от 1:4 до 1:6, предпочтительно 1:5. Ресуспендирование четвертого осадка в четвертом буфере можно проводить путем центрифугирования со скоростью от 6000 до 10000 об/мин или приблизительно 8000 об/мин. Центрифугирование может происходить в течение 35-55 минут или приблизительно 45 минут и может давать пятый осадок. Пятый осадок может содержать тельца включения, содержащие комплекс доставки IL-10. Пятый осадок,

содержащий конструкции доставки IL-10, можно заморозить перед дальнейшим использованием. Конструкции можно заморозить при температуре от -15°C до -25°C, предпочтительно -20°C.

[267] На этапе 203 На Фиг. 2A или на этапе 303 На Фиг. 2B тельца включения с конструкцией доставки IL-10 солюбилизируют с использованием солюбилизирующего раствора. Солюбилизирующий раствор может содержать хаотропное средство. Солюбилизирующий раствор может содержать хаотропное средство в концентрации от 5 M до 8 M, от 6 M до 7 M, приблизительно 6,6 M или приблизительно 6 M. Хаотропное средство может содержать гидрохлорид гуанидина, мочевину или их комбинации. Хаотропное средство может содержать хлористоводородную соль гуанидина. Солюбилизирующий раствор может дополнительно содержать Tris. Солюбилизирующий раствор может содержать Tris в концентрации от 40 мМ до 60 мМ или приблизительно 50 мМ. Солюбилизирующий раствор может иметь pH от 7 до 9 или приблизительно 8. Солюбилизирующий раствор можно добавлять в осадок, содержащий 10 конструкций доставки, полученных после лизиса клетки. Соотношение осадка, содержащего конструкции доставки IL-10, и солюбилизирующего раствора может быть от 1:8 до 1:12 или приблизительно 1:10 (м/м). Солюбилизация может продолжаться в течение по меньшей мере или приблизительно 60 минут.

[268] В некоторых вариантах осуществления, как показано на этапе 204 На Фиг. 2A, конструкцию доставки IL-10 модифицируют с помощью средства для сульфитолиза или восстанавливающего средства. Такая модификация может происходить одновременно или после солюбилизации телец включения, как показано на этапе 203. В некоторых случаях перед введением в контакт телец включения с солюбилизирующим раствором в солюбилизирующий раствор добавляют средство для сульфитолиза или восстанавливающее средство. В таких случаях этапы солюбилизации и сульфитолиза/восстановления могут происходить в одно и то же время. В других вариантах осуществления тельца включения сперва солюбилизируют в солюбилизирующем растворе, а после этого добавляют средство для сульфитолиза или восстанавливающее средство. Иначе говоря, сульфитолиз или восстанавливающее средство можно добавлять после того как конструкции доставки IL-10 были по существу солюбилизированы. В некоторых вариантах осуществления средство для сульфитолиза содержит сульфит натрия. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть предусмотрено добавление в солюбилизирующий раствор сульфита натрия. В некоторых вариантах осуществления в солюбилизирующий раствор добавляют от 30 мМ до 50 мМ, от 35 мМ до 45 мМ, от 38 мМ до 42 мМ или приблизительно 40 мМ сульфита натрия. В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубацию солюбилизирующего раствора, содержащего сульфит натрия, от 25 до 35 минут или более предпочтительно в течение приблизительно 30 минут. инкубацию солюбилизирующего раствора, содержащего сульфит натрия, можно проводить при комнатной температуре. Затем в солюбилизирующий раствор можно добавить тетратионат калия. Тетратионат калия

можно добавить в солюбилизирующий раствор после добавления сульфита натрия. В некоторых вариантах осуществления в солюбилизирующий раствор добавляют от 23 мМ до 43 мМ, от 28 мМ до 38 мМ, от 31 мМ до 35 мМ или приблизительно 33 мМ тетратионата калия. Тетратионат калия можно смешивать с солюбилизирующим раствором от 55 до 65 минут или приблизительно 60 минут. Это смешивание и инкубацию можно проводить при комнатной температуре. Более высокие выходы конструкции доставки IL-10 в форме димера можно получать, когда для разрушения дисульфидных связей используют средство для сульфитолиза, по сравнению с тем, когда для разрушения дисульфидных связей используют DTT. Например, использование средства для сульфитолиза при рефолдинге может приводить к выходу конструкции доставки IL-10 в форме димера по меньшей мере в 2 раза выше полученного выхода после рефолдинга, когда для восстановления/разрушения используют DTT. Например, когда для восстановления конструкции доставки IL-10 обрабатывают с использованием DTT, менее 5% полученного выхода конструкций доставки IL-10 может быть в форме димера, тогда как конструкции доставки IL-10, обработанные с использованием средства для сульфитолиза, могут приводить к более 10% полученного выхода конструкций доставки IL-10 в форме димера.

[269] В некоторых вариантах осуществления этап 204 На Фиг. 2A является необязательным (или точно отсутствует). Иначе говоря, в некоторых вариантах осуществления солюбилизированный IL-10, конструкции доставки IL-10 или солюбилизированные тельца включения, содержащие IL-10 или конструкции доставки IL-10, обрабатывают (например, очищают, концентрируют и/или доставляют в раствор для рефолдинга) без обработки или контакта с восстанавливающим средством или средством для сульфитолиза (Фиг. 2B). Другими словами, в некоторых вариантах осуществления тельца включения (IB) солюбилизируют с хаотропным средством, а после этого разбавляют раствором для рефолдинга (например, окислительно-восстановительной смесью), не подвергая тельца включения воздействию восстанавливающего средства или средства для сульфитолиза.

[270] Способ может включать очистку солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10 с образованием очищенной конструкции доставки IL-10 (этап 205 На Фиг. 2A или этап 304 На Фиг. 2B). Очистка может предусматривать удаление остаточного нерастворимого материала после солюбилизации и сульфитолиза и может происходить перед последующими этапами дальнейшей очистки. Очистка может предусматривать глубокую фильтрацию. Очистка может предусматривать первичную очистку. Первичная очистка может предусматривать фильтрацию солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10 через фильтр с номинальным размером частиц от 0,5 мкм до 10 мкм. Очистка может предусматривать вторичную очистку. Вторичная очистка может происходить после первичной очистки. Вторичная очистка может предусматривать фильтрацию солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10 через фильтр, такой как фильтр с

номинальным размером частиц от 0,2 мкм до 2 мкм. Способ может дополнительно предусматривать проведение стерильной фильтрации солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10. Стерильная фильтрация может предусматривать фильтрацию через фильтр с размером пор от 0,1 мкм до 0,3 мкм. Фильтром может быть капсульный фильтр. Проведение стерильной фильтрации может происходить после очистки.

[271] Способ может включать проведение этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может предусматривать первую фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF-1) этапа 206 На Фиг. 2A. Способ может включать проведение этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10. В некоторых вариантах осуществления, когда не используют средство для сульфитолиза, способ не включает этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга (Фиг. 2B). Иначе говоря, в некоторых вариантах осуществления этап 206 точно отсутствует, когда также отсутствует этап 205 (Фиг. 2A).

[272] В некоторых случаях очистка без использования средства для сульфитолиза или восстанавливающего средства дает более высокое процентное содержание димера конструкции доставки IL-10 по сравнению с солюбилизацией с использованием сульфитолиза или восстанавливающего средства. В некоторых случаях очистка без использования сульфитолиза или восстанавливающего средства дает более высокий выход конструкции доставки IL-10 по сравнению с солюбилизацией с помощью сульфитолиза или с восстанавливающим средством. В некоторых случаях очистка без использования средства для сульфитолиза или восстанавливающего средства дает меньше агрегатов конструкции доставки IL-10 HMW по сравнению с солюбилизацией с использованием сульфитолиза или восстанавливающего средства.

[273] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления очистка без использования средства для сульфитолиза или восстанавливающего средства не требует этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга, что может сократить процесс очистки приблизительно на 1 или 2 дня. Не проведение этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может предотвратить потерю от 10% до 40%, от 10% до 15%, от 15% до 30% или от 30% до 35% очищенной конструкции доставки IL-10 относительно процесса очистки, включая сульфитолиз и этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга.

[274] Первый этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может происходить после очистки. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может происходить после стерильной фильтрации солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может

предусматривать ультрафильтрацию. Ультрафильтрация может предусматривать концентрацию конструкций доставки IL-10 от 15 мг/мл до 25 мг/мл, от 18 мг/мл до 22 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл. Ультрафильтрация может происходить при трансмембранном давлении (TMP) от 10 до 20 ф/кв.д., от 12 до 18 ф/кв.д. или приблизительно 15 ф/кв.д. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может предусматривать диафильтрацию. Диафильтрация может происходить после ультрафильтрации. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга может предусматривать ультрафильтрацию и диафильтрацию (UF/DF). Диафильтрация может предусматривать первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем, четвертый диаобъем и пятый диаобъем. Первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем, четвертый диаобъем и пятый диаобъем могут содержать буфер. Буфер может содержать хаотропное средство. Буфер может содержать от 3,5 М до 4,5 М хаотропного средства, предпочтительно 4 М. Хаотропным средством может быть гуанидин HCl. Буфер может содержать Tris. Буфер может содержать от 40 мМ до 60 мМ Tris, предпочтительно 50 мМ. Буфер может иметь pH от 7 до 8,5. Диафильтрация может происходить при трансмембранном давлении (TMP) от 10 до 20 ф/кв.д., от 12 до 18 ф/кв.д. или приблизительно 15 ф/кв.д.

[275] Способ может включать введение в контакт солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10 с раствором для рефолдинга с образованием подвергнутых рефолдингу конструкций доставки IL-10 (этап 207 На Фиг. 2A или этап 305 На Фиг. 2B). в ретентате, полученном после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга солюбилизированных и/или восстановленных конструкций доставки IL-10, могут быть солюбилизированные и/или восстановленные конструкции доставки IL-10. Раствор для рефолдинга может содержать восстановленный глутатион и окисленный глутатион. Соотношение (м/м) восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону может быть от 0,8:1 до 1,2:1, предпочтительно 1:1. Молярное соотношение восстановленного глутатиона и окисленного глутатиона может быть от 0,8:2 до 1,1:2, предпочтительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит от 0,75 мМ до 1,5 мМ восстановленного глутатиона, предпочтительно 1,0 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит от 0,25 мМ до 0,75 мМ окисленного глутатиона, предпочтительно 0,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит аргинин, сахарозу, Tris, EDTA или их комбинации. Раствор для рефолдинга может содержать от 900 мМ до 1,1 М аргинина, предпочтительно 1 М. В некоторых вариантах осуществления аргинин представляет собой аргинин-HCl. Раствор для рефолдинга может содержать от 200 мМ до 300 мМ сахарозы, предпочтительно 250 мМ. Раствор для рефолдинга может содержать от 75 мМ до 125 мМ Tris, предпочтительно 100 мМ. Tris может иметь pH приблизительно 8,5. Раствор для рефолдинга может содержать от 1,75 мМ до 2,25 мМ EDTA, предпочтительно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор для рефолдинга содержит полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах

осуществления от 0,1% до 0,3% (м/м) раствора для рефолдинга составляет полиэтиленгликоль (PEG), предпочтительно 0,2%. PEG может быть PEG 3350. Раствор для рефолдинга может содержать pH от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,5. Раствор для рефолдинга может содержать pH приблизительно 8,0. Раствор для рефолдинга может содержать pH приблизительно 8,5. Ретентат, полученный после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами очистки и рефолдинга, можно смешивать с раствором для рефолдинга от 50 до 70 минут, предпочтительно 60 минут, для достижения целевой концентрации конструкций доставки IL-10 от 0,8 мг/мл до 1,2 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл. Последующее введение в контакт с раствором для рефолдинга может происходить при давлении от 12 часов до 18 часов. Введение в контакт с раствором для рефолдинга может происходить по меньшей мере в течение 16 часов. во время введения в контакт раствор для рефолдинга может быть при температуре от 2°C до 8°C или приблизительно 4°C. Перед введением в контакт раствор для рефолдинга можно предварительно охладить до температуры от 2°C до 8°C или приблизительно 4°C. Введение в контакт может дать подвергнутые рефолдингу конструкции доставки IL-10.

[276] Способ может включать проведение первой стерильной фильтрации подвергнутых рефолдингу конструкций доставки IL-10. Первая стерильная фильтрация может предусматривать фильтрацию через фильтр с размером пор от 0,1 мкм до 0,3 мкм, предпочтительно 0,2 мкм. Фильтром может быть капсульный фильтр. Первая стерильная фильтрация подвергнутых рефолдингу конструкций доставки IL-10 может происходить перед этапом фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии.

[277] В некоторых вариантах осуществления димеры конструкции доставки IL-10 можно хранить в буфере, например при 25°C в течение двух дней. Такой буфер может содержать соль, такую как 1X PBS, 150 мМ или 200 мМ NaCl, забуференную 10 мМ фосфата натрия, при pH 7,0. Димеры конструкции доставки IL-10 могут быть более стабильными при хранении в буфере, содержащем соль, такую как 1X PBS, 150 мМ или 200 мМ NaCl, забуференную 10 мМ фосфата натрия, при pH 7,0 чем в буфере, содержащем только 10 мМ фосфата натрия при pH 7,0.

[278] Способ может включать проведение этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии может включать вторую фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF-2) этапа 208 На Фиг. 2A или первую фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF-1) этапа 306 На Фиг. 2B. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии может происходить после первой стерильной фильтрации. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии может предусматривать ультрафильтрацию. Ультрафильтрация может происходить при трансмембранном давлении (TMP) от 10 до 20 ф/кв.д., от 12 до 18 ф/кв.д. или приблизительно 15 ф/кв.д.

Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии может предусматривать диафильтрацию. Диафильтрация может происходить после ультрафильтрации. Этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии может предусматривать ультрафильтрацию и диафильтрацию (UF/DF). Диафильтрация может предусматривать первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем и четвертый диаобъем. Первый диаобъем и второй диаобъем могут содержать холодный буфер (например 2-8°C или приблизительно 4°C). Третий диаобъем и четвертый диаобъем могут содержать буфер при комнатной температуре. Холодный буфер и буфер при комнатной температуре могут содержать Tris и NaCl. Tris может иметь концентрацию от 20 мМ до 30 мМ, предпочтительно 25 мМ. NaCl может иметь концентрацию от 75 мМ до 125 мМ, предпочтительно 100 мМ. Холодный буфер и буфер при комнатной температуре могут иметь pH от 7 до 8, предпочтительно 7,5. Ретентат, полученный после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии, можно содержать в течение ночи при комнатной температуре. Ретентат, полученный после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии, можно содержать в течение ночи от 2°C до 8°C или приблизительно 4°C. Ретентат, полученный после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии, может содержать подвергнутую рефолдингу конструкцию доставки IL-10.

[279] Способ может включать проведение второй стерильной фильтрации подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10. Вторая стерильная фильтрация может предусматривать фильтрацию ретентата, полученного после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии, через фильтр с размером пор от 0,1 мкм до 0,3 мкм. Фильтром может быть капсульный фильтр. Вторая стерильная фильтрация подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10 может происходить после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии.

[280] В некоторых вариантах осуществления этапы в способе от рефолдинга до и включая этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии, проводят при температуре от 2°C до 8°C или от 3°C до 5°C. В некоторых вариантах осуществления этапы в способе от рефолдинга до и включая этап фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии, проводят при температуре приблизительно 4°C. Способ может включать проведение анионообменной (AEX) хроматографии (этап 209 На Фиг. 2A или этап 307 На Фиг. 2B) на ретентате, полученном после этапа фильтрации с тангенциальным потоком между этапами рефолдинга и анионообменной (AEX) хроматографии. Проведение AEX хроматографии может включать связывание димеров

конструкции доставки IL-10 с анионообменной колонкой и последующее элюирование димеров конструкции доставки IL-10 из анионообменной колонки. Проведение AEX хроматографии пула конструкций доставки IL-10 может, таким образом, создавать первое множество фракций конструкций доставки IL-10. AEX хроматографией может быть Capto™ Q ImpRes.

[281] Процентное содержание конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции первого множества фракций определяют с использованием, например, эксклюзионной хроматографии (SEC), такой как эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC). Процентное содержание конструкций доставки IL-10 в форме димера можно сравнивать с первым пороговым значением. Первое пороговое значение может составлять 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%. Предпочтительно, первое пороговое значение может составлять 75%. Любая фракция, содержащая процент димеров конструкции доставки IL-10, превышающий пороговое значение, может быть объединена в первый обогащенный пул.

[282] Способ может включать проведение этапа хроматографии с керамическим гидроксиапатитом (CHT) первого обогащенного пула (этап 210 На Фиг. 2A или этап 308 На Фиг. 2B). Проведение CHT хроматографии первого обогащенного пула может, таким образом, создавать второе множество фракций конструкций доставки IL-10 в форме димера. В некоторых вариантах осуществления концентрация конструкций доставки IL-10 во втором множество фракций составляет от приблизительно 15 мг/мл до приблизительно 25 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления способ не включает катионообменную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления способ не включает гель-фильтрационную хроматографию.

[283] Процентное содержание конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции второго множества фракций определяют с использованием, например, эксклюзионной хроматографии (SEC), такой как эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (SE-HPLC). Процентное содержание конструкций доставки IL-10 в форме димера можно сравнивать со вторым пороговым значением. Второе пороговое значение может составлять по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Предпочтительно, второе пороговое значение может составлять 80%. Любая фракция, содержащая процент димеров конструкции доставки IL-10, превышающий пороговое значение, может быть объединена во второй обогащенный пул. Процентное содержание конструкций доставки IL-10 во втором обогащенном пуле может превышать процентное содержание конструкций доставки IL-10 в первом обогащенном пуле. Второй обогащенный пул может содержать более 80%, более 85% или более 90% конструкций доставки IL-10 в форме димера.

[284] Способ может включать первую стерильную фильтрацию второго обогащенного пула. Первая стерильная фильтрация второго обогащенного пула может

предусматривать фильтрацию через фильтр, такой как фильтр с размером пор от 0,1 мкм до 0,3 мкм. Фильтром может быть капсульный фильтр.

[285] Способ может включать проведение этапа фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите. Этап фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите может включать третью фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF-3) этапа 211 На Фиг. 2A или вторую фильтрацию с тангенциальным потоком (TFF-2) этапа 309 На Фиг. 2B. Этап фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите может предусматривать ультрафильтрацию. Ультрафильтрация может происходить при трансмембранном давлении (TMP) от 10 до 20 ф/кв.д., от 12 до 18 ф/кв.д. или приблизительно 15 ф/кв.д. Этап фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите может предусматривать диафильтрацию. Диафильтрация может происходить после ультрафильтрации. Этап фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите могут предусматривать ультрафильтрацию и диафильтрацию (UF/DF). Диафильтрация может предусматривать первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем, четвертый диаобъем и пятый диаобъем. Первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем, четвертый диаобъем и пятый диаобъем могут содержать буфер. Буфером может быть буфер для лиофилизации. Буфер может содержать соль, объемообразующее средство и осмолит. Буфер может содержать от 8 мМ до 12 мМ соли, предпочтительно 10 мМ. Буфер может содержать от 1% до 3% объемообразующего средства, предпочтительно 2%. Буфер может содержать от 0,5% до 1,5% осмолита, предпочтительно 1%. Солью может быть фосфат калия. Объемообразующим средством может быть глицин. Осмолитом может быть сахароза. Способ может включать вторую стерильную фильтрацию. вторую стерильную фильтрацию можно проводить после диафильтрации. Способ может включать добавление в буфер поверхностно-активного вещества. Поверхностно-активное вещество можно добавить после второй стерильной фильтрации. После добавления в буфер поверхностно-активного вещества буфер может содержать от 0,2% до 0,4% поверхностно-активного вещества, предпочтительно 0,3%. Поверхностно-активным веществом может быть полоксамер. Полоксамер может представлять собой полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления смесь буфера с подвергнутыми рефолдингу конструкциями доставки IL-10 может представлять собой жидкую композицию, ранее описанную в данном документе. Этап фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите может происходить после первой стерильной фильтрации второго обогащенного пула. Способ может включать проведение второй стерильной фильтрации второго обогащенного пула. Вторая стерильная фильтрация может предусматривать фильтрацию через фильтр, такой как фильтр с размером пор от 0,1 мкм до 0,3 мкм, предпочтительно 0,2 мкм. Фильтром может быть капсульный фильтр. Вторая стерильная фильтрация может происходить после этапа

фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите. Ретентат, полученный после третьей фильтрации с тангенциальным потоком, можно заморозить при температуре от -70°C до -90°C, предпочтительно -80°C. Ретентат, полученный после этапа фильтрации с тангенциальным потоком после этапа хроматографии на керамическом гидроксиапатите, может представлять собой жидкую композицию, описанную в данном документе. Ретентат, полученный после третьей фильтрации с тангенциальным потоком, может содержать более 80%, более 85% или более 90% конструкций доставки IL-10 в форме димера.

[286] В некоторых случаях способ может включать проведение катионообменной хроматографии, например на колонке Sulfate 650F. Этап катионообменной хроматографии можно проводить после этапа анионообменной хроматографии и этапа очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT), перед этапом анионообменной хроматографии и этапом очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT) или между этапом анионообменной хроматографии и этапом очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT). Как показано в примере 39 и таблице 61, проведение этапа катионообменной хроматографии с последующим этапом анионообменной хроматографии и этапом очистки керамическим гидроксиапатитом (CHT) приводил к извлечению 20% димеров конструкции доставки IL-10 с 96% чистотой.

Пероральные лекарственные формы

[287] Растворы в данном документе, содержащие высокие уровни формы димера IL-10 (отдельно или в виде части конструкции доставки IL-10), можно дополнительно обрабатывать для перорального приема.

[288] Во-первый, такие растворы можно сушить с помощью процесса, в который не входит концентрирование конструкции доставки IL-10 в растворе, примеры такого процесса включают лиофилизацию (сушку вымораживанием, (FD)) или распылительную сушку (SD) для получения сухой или твердой формы композиции IL-10/конструкции доставки IL-10. Сушку вымораживанием можно проводить с использованием коллекторного лиофилизатора Virtis Advantage с программным обеспечением Intellitronics. Стеклянные флаконы, содержащие замороженную лекарственную форму терапевтического белка, можно частично закупорить неопреновой пробкой для лиофилизации, а затем поместить в сосуды, соединенные с коллектором лиофилизатора, и при разрежении (например, 1-100 миллиторр или менее) в течение приблизительно 12-48 часов. Лиофилизированную композицию можно использовать для получения лекарственной формы в виде капсулы или таблетки. В некоторых вариантах осуществления более 80%, более 85% или более 90% IL-10 в лиофилизированной композиции находится в форме димера.

[289] Лекарственную форму, содержащую IL-10, можно доставлять в тонкий кишечник или ободочную кишку в виде лекарственной формы, описанной в данном документе. Лекарственная форма может быть предназначена для пероральной или ректальной доставки. В некоторых вариантах осуществления такие лекарственные формы

могут облегчать прохождение конструкции через эпителиально-клеточный барьер кишечника (например посредством трансцитоза), который в противном случае может препятствовать достижению полного терапевтического потенциала IL-10. Кроме того, направленная доставка IL-10 непосредственно в ткань желудочно-кишечного тракта пероральным путем может обойти побочные эффекты, возникающие при системном введении, и может привести к более высоким концентрациям в слизистой оболочке и клинически значимому уменьшению воспаления и заболевания.

[290] Пероральные лекарственные формы с покрытием для направленного высвобождения в ЖКТ

[291] В настоящем описании представлены пероральные лекарственные формы, содержащие терапевтический груз и одно или несколько вспомогательных средств, обеспечивающих улучшенный профиль высвобождения, который обеспечивает избирательную доставку любого груза в определенную область внутри желудочно-кишечного тракта (GI) субъекта. Предпочтительно, пероральные лекарственные формы выполнены с возможностью локализованного высвобождения терапевтического груза в терминальном отделе подвздошной кишки, проксимальном отделе ободочной кишки или дистальном отделе ободочной кишки. В примере 13 описаны пероральные лекарственные формы с покрытием, выполненные с возможностью локализованного высвобождения в ЖКТ.

[292] Грузы, рассматриваемые в данном документе, могут быть любой природы, в том числе терапевтические, диагностические и визуализирующие. Груз может быть частью конструкции доставки. Конструкция доставки может содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом. Груз может быть прямо или непрямо, ковалентно или нековалентно соединен с носителем. При ковалентном присоединении груз может быть прикреплен к носителю непосредственно или посредством спейсера. Хотя в одном варианте осуществления груз представляет собой терапевтический белок, такой как IL-10 или конструкция доставки IL-10 (такая как конструкции доставки IL-10, описанная в данном документе), раскрытие в данном документе не ограничено никаким терапевтическим белком, носителем или грузом.

[293] Пероральная лекарственная форма доставки груза, такого как терапевтический белок, в нижний отдел ЖКТ может включать в себя капсулу или таблетку с покрытием, выполненную с возможностью растворения при pH тонкого кишечника или ободочной кишки, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 8,0. В некоторых вариантах осуществления покрытие выполнено без возможности растворения при очень кислом pH желудка, в котором pH может быть от приблизительно 1,5 до приблизительно 3,5.

[294] Пероральная лекарственная форма в данном документе может быть выполнена с возможностью прохождения через желудок без высвобождения груза в заметной степени. Высвобождения груза может происходить после полного или частичного растворения по меньшей мере одного покрытия на капсуле или таблетке,

содержащей груз. Высвобождения груза может происходить после повреждения капсулы или таблетки, включая микроскопическое повреждение, так что капсула или таблетка могут выглядеть целыми. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения менее приблизительно 5%, менее приблизительно 4%, менее приблизительно 3%, менее приблизительно 2%, менее приблизительно 1% или 0% груза в желудке. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения груза в конкретных областях внутри тонкой кишки или ободочной кишки, таких как терминальный отдел подвздошной кишки, проксимальный отдел ободочной кишки и дистальный отдел ободочной кишки. Терминальный отдел подвздошной кишки или дистальный конец тонкого кишечника, пересекается с ободочной кишкой, и воспаление в этом месте часто может быть связано с желудочно-кишечными расстройствами, такими как болезнь Крона. вследствие этого, локализованное высвобождение терапевтических грузов с противовоспалительными свойствами в терминальном отделе подвздошной кишки может быть желательным в качестве способа лечения таких заболеваний. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от приблизительно 20% до 100% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0 от 2 до 8 часов. Раствором может быть цитратно-фосфатный буфер с подходящим pH. Раствором может быть пищеварительный сок. Пищеварительным соком может быть желудочный сок, кишечный сок (succus entericus) или их комбинации. Пищеварительный сок может содержать пищеварительные ферменты. Пищеварительный сок может находиться в желудке, тонкой кишке, ободочной кишке или их комбинации.

[295] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 80% до 100% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, от 2 до 8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 75% до 100%, от 75% до 85% или от 85% до 95% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, в течение 2 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, в течение 2 часов. В некоторых случаях воздействие раствора можно выполнять при 37°C.

[296] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 80% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, от 2 до 8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 75% до 100%, от 75% до 85% или от 85% до 95% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1,

предпочтительно pH 7,0, в течение 2 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, в течение 2 часов. В некоторых случаях воздействие раствора можно выполнять при 37°C.

[297] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 50% до 100% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение приблизительно 2-8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 50% до 95%, от 60% до 70% или от 75% до 90% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение 2 или 3 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение 2 или 3 часов. В некоторых случаях воздействие раствора можно выполнять при 37°C.

[298] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 50% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение приблизительно 2-8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 50% до 95%, от 60% до 70% или от 75% до 90% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение 2 или 3 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение 2 или 3 часов. В некоторых случаях воздействие раствора можно выполнять при 37°C.

[299] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 20% до 100% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение приблизительно 2-8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 20% до 80% или от 20% до 30% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение 2 или 3 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% терапевтического груза при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение 2 или 3 часов. В некоторых случаях воздействие раствора можно выполнять при 37°C.

[300] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 20% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение приблизительно 2-8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 20% до 80% или от 20% до 30% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение 2 или 3 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение 2 или 3 часов. В некоторых случаях воздействие раствора можно выполнять при 37°C.

[301] Пероральная лекарственная форма может быть твердой. Пероральная лекарственная форма может содержать лиофилизированную композицию или высушенную распылением композицию. Лиофилизированная композиция или высушенная распылением композиция может содержать терапевтический белок и одно или несколько вспомогательных средств. Лиофилизированная композиция или высушенная распылением композиция может быть порошком. Лиофилизированная композиция или высушенная распылением композиция может содержать микрочастицы. Микрочастицы могут иметь диаметр от приблизительно 1 мкм до приблизительно 500 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 250 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 5 мкм до приблизительно 50 мкм или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 15 мкм. Лиофилизированная композиция или высушенная распылением композиция может содержать гранулы. Твердая пероральная лекарственная форма может быть капсулой. Капсула может заключать в себе лиофилизированную композицию. Твердая пероральная лекарственная форма может быть таблеткой. Пероральная лекарственная форма может быть в форме единичной дозы.

[302] Пероральная лекарственная форма может содержать от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 20 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 100 мг или от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг терапевтического белка. Пероральная лекарственная форма может содержать приблизительно 1 мг, 5 мг или 20 мг терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 32% до приблизительно 42% (м/м) лиофилизированной композиции составляет терапевтический белок.

[303] Одно или несколько вспомогательных средств могут содержать, состоять по существу или состоять из поверхностно-активного вещества, осмолита, объемообразующего средства, соли или их комбинации. Одно или несколько вспомогательных средств могут содержать, состоять по существу или состоять из фосфата калия, глицина, сахарозы и полоксамера 188. Одно или несколько вспомогательных

средств могут дополнительно содержать уплотняющее вспомогательное средство.

[304] В некоторых вариантах осуществления одним или несколькими вспомогательными средствами может быть осмолит. Осмолиты можно использовать в фармацевтических лекарственных формах, содержащих белки, для улучшения стабильности белков и снижения агрегации белков. Осмолитом может быть аминокислота (например пролин или глицин), метиламин (например, бетаин или триметиламин-N-оксид) или полиол или сахар (например сорбит или сахароза). Осмолитом может быть сахароза, трегалоза, глицин, маннит, гистидин, декстроза/декстран, аргинин, мальтоза, сорбит, таурин, глицин бетаин, саркозин, раффиноза, глицерин, пролин, фруктан, L-глутамат, лактоза или их комбинации. Осмолитом может быть сахароза. Пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение осмолита и терапевтического белка от приблизительно 0,3:1 до приблизительно 0,7:1, от приблизительно 0,4:1 до приблизительно 0,6:1, от приблизительно 0,45:1 до приблизительно 0,55:1, от приблизительно 0,49:1 до приблизительно 0,51:1 или более предпочтительно приблизительно 0,5:1. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 15% до приблизительно 21% (м/м) лиофилизированной композиции составляет осмолит.

[305] В некоторых вариантах осуществления одно или несколько вспомогательных средств может содержать поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества можно использовать в твердых пероральных лекарственных формах, содержащих белки, таких как капсула или таблетка, для усиления распадаемости твердой пероральной лекарственной формы и повышения растворимости белков. Поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамер 188 или их комбинации. Пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение поверхностно-активного вещества и терапевтического белка от приблизительно 0,1:1 до приблизительно 0,19:1, от приблизительно 0,12:1 до приблизительно 0,18:1, от приблизительно 0,14:1 до приблизительно 0,16:1 или более предпочтительно приблизительно 0,15:1. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 4,5% до приблизительно 6,5% (м/м) лиофилизированной композиции составляет поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может представлять собой неионный сополимер. Неионный сополимер может содержать центральную полиоксипропиленовую цепь, фланкированную двумя полиоксиэтиленовыми цепями. Неионным сополимером может быть полоксамер. Использование полоксамера в качестве вспомогательного средства в композициях, описанных в данном документе, может способствовать или сохранять димеризацию IL-10 или конструкции доставки IL-10 по сравнению с использованием других поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат.

[306] Полоксамер может содержать молекулярную массу полиоксипропилена от 1600 г/моль до 2000 г/моль. Полоксамер может содержать от 70% до 90% полиоксиэтилена. Полоксамер может представлять собой полоксамер 188. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество не является полисорбатом,

таким как полисорбат 80 (например Tween 80) или полисорбат 20 (например Tween 20). Композиция конструкции доставки IL-10, содержащая полоксамер в качестве вспомогательного средства, может иметь большее количество IL-10 в форме димера относительно композиции конструкции доставки IL-10, содержащей в качестве вспомогательного средства полисорбат. Композиция конструкции доставки IL-10, содержащая полоксамер в качестве вспомогательного средства, может иметь пониженное количество IL-10 в форме агрегата или мономера относительно композиции конструкции доставки IL-10, содержащей в качестве вспомогательного средства полисорбат.

[307] Одно или несколько вспомогательных средств могут включать в себя соль. Солью может быть фосфат калия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат натрия или их комбинации. Солью может быть фосфат калия. Пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение соли и терапевтического белка от приблизительно 0,03:1 до приблизительно 0,1:1, от приблизительно 0,05:1 до приблизительно 0,09:1, от приблизительно 0,06:1 до приблизительно 0,08:1 или более предпочтительно приблизительно 0,07:1. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 2% до приблизительно 3% (м/м) лиофилизированной композиции составляет соль.

[308] Одно или несколько вспомогательных средств могут включать в себя гидроксид натрия. Пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение гидроксида натрия и терапевтического белка от приблизительно 0,03:1 до приблизительно 0,1:1, от приблизительно 0,05:1 до приблизительно 0,09:1, от приблизительно 0,06:1 до приблизительно 0,08:1 или более предпочтительно приблизительно 0,07:1. В некоторых вариантах осуществления гидроксид натрия составляет от приблизительно 2% до приблизительно 3% (м/м) лиофилизированной композиции.

[309] В некоторых вариантах осуществления одно или несколько вспомогательных средств могут включать в себя объемообразующее средство. Объемообразующие средства можно использовать для увеличения размера пероральной лекарственной формы для облегчения изготовления. Объемообразующим средством может быть крахмал, лактоза, декстрин, глюкоза, сахароза, сорбит, раффиноза, трегалоза, глицин, маннит или их комбинации. Объемообразующим средством может быть глицин. Пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение объемообразующего средства и терапевтического белка от приблизительно 0,7:1 до приблизительно 1,3:1, от приблизительно 0,8:1 до приблизительно 1,2:1, от приблизительно 0,9:1 до приблизительно 1,1:1 или более предпочтительно приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления от приблизительно 32% до приблизительно 42% (м/м) лиофилизированной композиции составляет объемообразующее средство. В некоторых вариантах осуществления буферным средством является осмолит.

[310] Лиофилизированную композицию можно хранить при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C. Лиофилизированную композицию можно хранить при температуре от приблизительно -15°C до приблизительно -25°C.

Лиофилизированная композиция может быть стабильной при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C и окружающей относительной влажности по меньшей мере в течение 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, когда терапевтический белок находится в форме димера, лиофилизированная композиция является стабильной, если снижение количества димеров терапевтического белка составляет не более 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 25% через один год хранения при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C. В некоторых вариантах осуществления, когда терапевтический белок находится в форме димера, лиофилизированная композиция является стабильной, если снижение количества димеров терапевтического белка составляет не более 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20% или 25% через один год хранения при температуре от приблизительно -15°C до приблизительно -25°C. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированную композицию прессуют в таблетку или заполняют в капсулу с образованием пероральной лекарственной формы, описанной в данном документе.

[311] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны жидкие композиции, содержащие терапевтический белок и одно или несколько вспомогательных средств, которые могут быть лиофилизированы с образованием лиофилизированной композиции, описанной в данном документе. Терапевтическим белком может быть конструкция доставки IL-10, описанная в данном документе. Жидкая композиция может содержать буфер для лиофилизации и конструкцию доставки IL-10. Жидкая композиция может содержать от 15 мг/мл до 25 мг/мл конструкции доставки IL-10, предпочтительно приблизительно 20 мг/мл. Жидкая композиция может содержать от 1,51 мг/мл до 1,91 мг/мл фосфата калия, предпочтительно приблизительно 1,71 мг/мл. Жидкая композиция может содержать от 15 мг/мл до 25 мг/мл глицина, предпочтительно приблизительно 20 мг/мл. Жидкая композиция может содержать от 8 мг/мл до 12 мг/мл сахарозы, предпочтительно приблизительно 10 мг/мл. Жидкая композиция может содержать от 2,5 мг/мл до 3,5 мг/мл полоксамера 188, предпочтительно приблизительно 3 мг/мл. Жидкая композиция может иметь pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5. Жидкая композиция может иметь pH от приблизительно 7,4 до приблизительно 7,6.

[312] Жидкая композиция может быть стабильной при температуре от приблизительно -80°C до приблизительно -60°C и окружающей относительной влажности по меньшей мере в течение 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления снижение процентного содержания терапевтического белка в форме димера жидкой композиции через 7 дней при температуре 4°C составляет не более 2%. Жидкую композицию можно заморозить с образованием замороженной композиции терапевтического белка. Жидкую композицию можно заморозить при температуре от приблизительно -85°C до приблизительно -15°C. В некоторых вариантах осуществления замороженную композицию терапевтического белка перед лиофилизацией оттаивают.

[313] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированную композицию заключают в капсулу. Капсула может иметь размер 000, 00, 0, 1, 2, 3, 4 или 5 капсул. Капсула может состоять из двух частей. Капсула может представлять собой капсулу из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), также называемую капсулой из гипромеллозы.

[314] Альтернативно, лиофилизированную композицию можно спрессовать под действием силы сжатия с образованием таблетки. Сила сжатия может колебаться от 1500 фунтов силы (lbf) до 4000 lbf или от 2000 lbf до 3500 lbf. Сила сжатия может быть 1500 lbf, 2000 lbf, 2500 lbf, 3000 lbf, 3500 lbf или 4000 lbf. Таблетка может иметь вес от 150 мг до 1000 мг, от 150 мг до 500 мг от 200 мг до 400 мг, от 150 мг до 250 мг, от 175 мг до 225 мг или от 190 мг до 210 мг. Таблетка может иметь диаметр от 0,2” до 0,4”, от 0,25” до 0,35” или от 0,3” до 0,25”. Таблетка может содержать от 1 мг до 5 мг, от 1 мг до 10 мг, от 1 мг до 20 мг, от 20 мг до 50 мг, от 20 мг до 100 мг или от 50 мг до 100 мг конструкции доставки IL-10. Таблетка может содержать приблизительно 1 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 30 мг конструкции доставки IL-10. Таблетка может содержать от 4,5 мг до 5,5 мг, от 9,5 мг до 10,5 мг, от 19 мг до 21 мг или от 29 мг до 31 мг IL-10 или конструкции доставки IL-10. Таблетка может иметь концентрацию IL-10 или конструкции доставки IL-10 от 3 мг до 9 мг, от 4 мг до 8 мг или от 5 мг до 7 мг. Таблетка может быть круглой, продолговатой, овальной, округлой или иметь любую другую подходящую форму.

[315] Если пероральная лекарственная форма представляет собой таблетку, одно или несколько вспомогательных средств могут включать в себя уплотняющее вспомогательное средство. Одно или несколько вспомогательных средств могут включать в себя 1, 2, 3, 4 или более 4 уплотняющих вспомогательных средств. Уплотняющим вспомогательным средством может быть разрыхлитель, средство связывания, смазывающее вещество или их комбинации. Пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение ранее описанной лиофилизированной композиции и уплотняющего вспомогательного средства от приблизительно 0,8:3 до приблизительно 1,2:3, от приблизительно 0,9:3 до приблизительно 1,1:3, от приблизительно 0,95:3 до приблизительно 1,05:3 или более предпочтительно приблизительно 1:3. Конструкция доставки IL-10 может содержать от приблизительно 5% до приблизительно 15% (м/м) таблетки. В некоторых вариантах осуществления уплотняющее вспомогательное средство не является частью жидкой композиции. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированная композиция не содержит уплотняющего вспомогательного средства.

[316] Уплотняющие вспомогательные средства могут содержать разрыхлитель. Разрыхлитель может облегчать диспергирование или разрушение пероральной лекарственной формы. Разрыхлитель может содержать микрокристаллическую целлюлозу (MCC), силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC), крахмал, натрия крахмал гликолят, вигум, бентонит, альгиновую кислоту, альгинат кальция, кроскармеллозу натрия (сшитую карбоксиметилцеллюлозу натрия), кросповидон (сшитый поливинилпирролидон) или их комбинации.

[317] Уплотняющие вспомогательные средства могут содержать средство связывания. Средство связывания может удерживать вместе компоненты пероральной лекарственной формы. Средство связывания может содержать дисахарид, полисахарид, белок или полимер. Дисахарид может представлять собой сахарозу или лактозу. Лактоза может представлять собой моногидрат лактозы. Полисахарид могут представлять собой крахмал, целлюлозу или их производное. Белок может представлять собой желатин. Полимером может быть поливинилпирролидон (PVP) или полиэтиленгликоль (PEG).

[318] Уплотняющими вспомогательными средствами может быть смазывающее вещество. Смазывающее вещество может уменьшать трение между частицами и сцепление в пероральной лекарственной форме. Смазывающее вещество может содержать стеарат магния, бегенат глицерина, дибегенат глицерина, стеарилфумарат натрия, стеариновую кислоту, тальк, диоксид кремния, стеарат кальция, карбонат магния, гидрогенизированное масло, минеральное масло, полиэтиленгликоль (PEG), глицерилмоностеарат или их комбинации. Смазывающее вещество может представлять собой неионное поверхностно-активное вещество. Неионное поверхностно-активное вещество может представлять собой бегенат глицерина. Бегенат глицерина может представлять собой дибегенат глицерина. В некоторых вариантах осуществления смазывающее вещество не является ионогенным поверхностно-активным веществом, таким как стеарат магния, стеарилфумарат натрия и лаурисульфат натрия. В некоторых вариантах осуществления использование неионного поверхностно-активного вещества, такого как бегенат глицерина или дибегенат глицерина, при получении таблетки приводит к улучшенному профилю растворения таблетки по сравнению с использованием при получении таблетки ионного поверхностно-активного вещества, такого как стеарат магния, стеарилфумарат натрия или лаурисульфат натрия. Иначе говоря, использование неионного поверхностно-активного вещества, такого как бегенат глицерина или дибегенат глицерина, может приводить к лекарственной форме, в которой более высокая концентрация конструкции доставки IL-10 остается в форме димера в течение более длительного периода времени по сравнению с соответствующей лекарственной формой, в которой использовано ионное поверхностно-активное вещество, такое как стеарат магния, стеарилфумарат натрия или лаурисульфат натрия.

[319] В некоторых вариантах осуществления одно или несколько уплотняющих вспомогательных средств объединяют с ранее описанной лиофилизированной композицией перед прессованием в таблетку или заполнением капсулы. В некоторых вариантах осуществления композиция для прессования может содержать от приблизительно 6% до приблизительно 10% (м/м) лиофилизированной композиции и от приблизительно 90% до приблизительно 94% (м/м) одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления композиция для прессования может содержать от приблизительно 5% до приблизительно 15% (м/м) лиофилизированной композиции и от приблизительно 85% до приблизительно 95% (м/м) одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств. Одно или несколько

контактирующих вспомогательных средств могут включать в себя по меньшей мере два разрыхлителя.

[320] В некоторых вариантах осуществления гранулы образуются во время процесса получения пероральной лекарственной формы. Например, в некоторых случаях имеется две фазы получения таблеток с использованием процесса грануляции: внутригранулярная (IG) фаза и внегранулярная (EG) фаза. Во внутригранулярной фазе лиофилизированную композицию и первую подгруппу одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств можно смешивать и гранулировать со связующим веществом с образованием смешанной композиции, которую затем можно спрессовать (например с помощью валкового уплотнения) и размолоть в гранулы. Затем во внегранулярной фазе сухие гранулы можно смешивать со второй подгруппой одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств и спрессовать в пероральную лекарственную форму, такую как таблетка.

[321] Гранулы, полученные во внутригранулярной фазе, могут иметь массовое соотношение первой подгруппы одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств и лиофилизированного порошка, содержащего конструкцию доставки IL-10 от приблизительно 7:1 до приблизительно 11:1, от приблизительно 8:1 до приблизительно 10:1 или от приблизительно 8,5:1 до приблизительно 9,5:1. В некоторых вариантах осуществления первая подгруппа одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств может содержать по меньшей мере два разрыхлителя. В некоторых вариантах осуществления первая подгруппа одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств может иметь массовое соотношение первого разрыхлителя и второго разрыхлителя от приблизительно 21:1 до приблизительно 24:1, от приблизительно 22:1 до приблизительно 23,5:1 или от приблизительно 22,3:1 до приблизительно 23:1. Первый разрыхлитель может представлять собой силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC) или дикальцийфосфат/микрокристаллическую целлюлозу (DCP/MCC). Второй разрыхлитель может представлять собой кросповидон или кроскармеллозу натрия. В некоторых вариантах осуществления первая подгруппа одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств содержит смазывающее вещество. Массовое соотношение по меньшей мере двух разрыхлителей и смазывающего вещества в первой подгруппе одного или нескольких вспомогательных средств могут быть от приблизительно 61:1 до приблизительно 81:1, от приблизительно 66:1 до приблизительно 76:1 или от приблизительно 71:1 до приблизительно 73:1. Смазывающее вещество может содержать дибегенат глицерина. Смазывающее вещество может содержать бегенат глицерина.

[322] Внегранулярная фаза может иметь массовое соотношение гранул, полученных во внутригранулярной фазе, и второй подгруппы одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств от приблизительно 2:1 до приблизительно 6:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 5:1 или от приблизительно 3,5:1 до приблизительно 4,5:1. В некоторых вариантах осуществления вторая подгруппа одного

или нескольких уплотняющих вспомогательных средств может содержать по меньшей мере два разрыхлителя. В некоторых вариантах осуществления вторая подгруппа одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств может иметь массовое соотношение первого разрыхлителя и второго разрыхлителя от приблизительно 13,5:1 до приблизительно 24:1, от приблизительно 16:1 до приблизительно 21,5:1 или от приблизительно 17,5:1 до приблизительно 19:1. Первый разрыхлитель может быть SMCC или DCP/MCC. Второй разрыхлитель может содержать кросповидон или кроскармеллозу натрия. В некоторых вариантах осуществления вторая подгруппа одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств содержит смазывающее вещество. Массовое соотношение по меньшей мере двух разрыхлителей и смазывающего вещества во второй подгруппе одного или нескольких вспомогательных средств может быть от приблизительно 69:1 до приблизительно 89:1, от приблизительно 74:1 до приблизительно 84:1 или от приблизительно 77:1 до приблизительно 81:1. Смазывающее вещество может содержать бегенат глицерина. Бегенат глицерина может представлять собой дибегенат глицерина. В некоторых вариантах осуществления уплотняющие вспомогательные средства могут содержать, состоять по существу или состоять из SMCC, кросповидона и бегената глицерина.

[323] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств и лиофилизированной композиции от приблизительно 9:1 до приблизительно 14:1, от приблизительно 10:1 до приблизительно 13:1 или от приблизительно 11:1 до приблизительно 12:1. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение первого разрыхлителя одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств и лиофилизированной композиции от приблизительно 8,8:1 до приблизительно 12,8:1, от приблизительно 9,8:1 до приблизительно 11,8:1 или от приблизительно 10,4:1 до приблизительно 11,2:1. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение лиофилизированной композиции и второго разрыхлителя одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 2,5:1, от приблизительно 1,75:1 до приблизительно 2,25:1 или от приблизительно 1,9:1 до приблизительно 2,1:1.

[324] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма может иметь массовое соотношение лиофилизированной композиции и смазывающего вещества одного или нескольких уплотняющих вспомогательных средств от приблизительно 5:1 до приблизительно 8,1:1, от приблизительно 5,5:1 до приблизительно 8,1:1 или от приблизительно 6,2:1 до приблизительно 6,6:1.

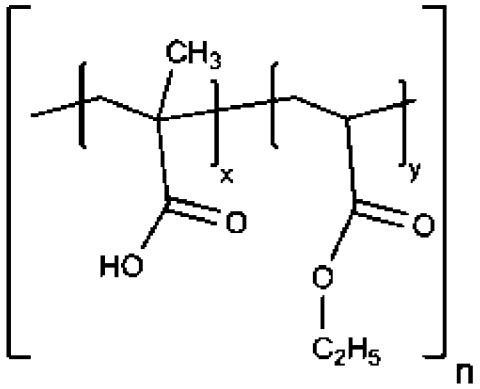
[325] Пероральная лекарственная форма может содержать первое покрытие, содержащее первый сополимер, второй сополимер или смесь первого сополимера и второго сополимера. Пероральная лекарственная форма может содержать первое покрытие из сукцината ацетата гипромеллозы (HPMCAS или HPMC-AS). Первое

покрытие может иметь толщину по существу эквивалентную от 20 мг до 200 мг, от 20 мг до 40 мг, от 50 мг до 70 мг, от 115 мг до 135 мг или от 175 мг до 185 мг первого покрытия на капсуле 1 размера. Первое покрытие может иметь толщину по существу эквивалентную от 55 мг до 65 мг первого покрытия на капсуле 1 размера. Первое покрытие может иметь толщину по существу эквивалентную от 20 мг до 200 мг, от 20 мг до 40 мг, от 50 мг до 80 мг, от 115 мг до 135 мг или от 175 мг до 185 мг первого покрытия на капсуле 0 размера. Первое покрытие может иметь толщину по существу эквивалентную от 70 мг до 80 мг первого покрытия на капсуле 0 размера. Первое покрытие может иметь массу от 20 мг до 200 мг, от 20 мг до 40 мг, от 50 мг до 80 мг, от 115 мг до 135 мг или от 175 мг до 185 мг.

[326] Площадь поверхности для капсулы 1 размера может быть приблизительно 410 $мм^2$. Площадь поверхности для капсулы 0 размера может быть приблизительно 500 $мм^2$. Толщина покрытия 0,15 $мг/мм^2$ может быть эквивалентна покрытию массой 60 мг на капсуле 1 размера или покрытию массой 75 мг на капсуле 0 размера. В некоторых вариантах осуществления капсула имеет толщину покрытия от 0,1 $мг/мм^2$ до 0,2 $мг/мм^2$, предпочтительно 0,15 $мг/мм^2$. В некоторых вариантах осуществления толщина покрытия на капсуле может быть от 4 $мг/см^2$ до 20 $мг/см^2$, от 4 $мг/см^2$ до 6 $мг/см^2$, от 5 $мг/см^2$ до 10 $мг/см^2$ или от 5 $мг/см^2$ до 20 $мг/см^2$. Толщиной покрытия может быть толщина первого покрытия.

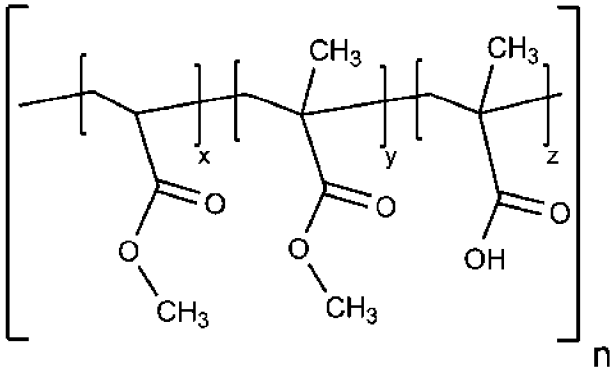
[327] В некоторых вариантах осуществления таблетка имеет толщину покрытия от 0,1 $мг/мм^2$ до 0,2 $мг/мм^2$, от 0,1 $мг/мм^2$ до 0,5 $мг/мм^2$ или от 0,1 $мг/мм^2$ до 1,0 $мг/мм^2$, предпочтительно 0,15 $мг/мм^2$. В некоторых вариантах осуществления толщина покрытия на таблетке может быть от 4 $мг/см^2$ до 20 $мг/см^2$, от 4 $мг/см^2$ до 6 $мг/см^2$, от 5 $мг/см^2$ до 10 $мг/см^2$ или от 5 $мг/см^2$ до 20 $мг/см^2$. Толщиной покрытия может быть толщина первого покрытия.

[328] Первый сополимер может иметь индивидуальное номинальное растворение при pH>5,5. pH номинального растворения показывает pH, при котором сополимер становится растворимым. Первый сополимер может содержать метакриловую кислоту и этилакрилат. Первый полимер может иметь средневесовую молекулярную массу от 200000 г/моль до 450000 г/моль или от 250000 г/моль до 400000 г/моль, или от 280000 г/моль до 370000 г/моль, или от 300000 г/моль до 340000 г/моль. Первый полимер может иметь соотношение свободных карбоксильных групп и групп сложных эфиров в первом сополимере от 0,8:1 и 1,2 до 1. Первый сополимер может содержать полимер формулы I, где каждый из x, y и n больше или равен единице. Первый сополимер может представлять собой эудрагит® L 30 D-55.



Формула I

[329] Второй сополимер может иметь номинальное растворение при pH>7,0. Второй сополимер может содержать метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат. Второй полимер может иметь средневесовую молекулярную массу от 160000 г/моль до 400000 г/моль или от 200000 г/моль до 360000 г/моль, или от 240000 г/моль до 320000 г/моль, или от 260000 г/моль до 300000 г/моль. Второй полимер может иметь соотношение свободных карбоксильных групп и групп сложных эфиров во втором сополимере от 0,8:1 до 1,2 до 1. Второй полимер может содержать полимер формулы II, где каждый из x, y, z и n больше или равен единице. Второй сополимер может содержать эудрагит® FS 30 D.



Формула II

[330] Второй сополимер может отличаться от первого сополимера. PH номинального растворения смеси первого сополимера и второго сополимера может отличаться от pH номинального растворения первого сополимера или второго сополимера по отдельности. Например, номинальным растворением смеси первого сополимера и второго сополимера может быть номинальное растворение между номинальными растворениями первого сополимера и второго сополимера. Первое покрытие может содержать равное количество второго сополимера относительно количества первого сополимера. Первое покрытие может содержать большее количество второго сополимера относительно количества первого сополимера. Массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера может составлять приблизительно или между любым из 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95 или 0:100. Массовое соотношение эудрагит® L30D55:эудрагит® FS30D может быть приблизительно 50:50,

45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95 или 0:100.

[331] А массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии может быть от 0:100 до 100:0. Массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии может быть от 45:55 до 55:45 от 25:75 до 35:65 от 15:85 до 25:75 или от 15:85 до 0:100.

[332] В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии от 45:55 до 55:45 с эквивалентной толщиной покрытия от 40 мг до 70 мг на капсуле 1 размера приводит к высвобождению терапевтического груза в терминальном отделе подвздошной кишки. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера 50:50 с толщиной покрытия приблизительно 0,15 мг/мм^2 приводит к высвобождению терапевтического груза в терминальном отделе подвздошной кишки.

[333] В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии от 15:85 до 25:75 с эквивалентной толщиной покрытия от приблизительно 118 мг до 138 мг на капсуле 1 размера приводит к высвобождению терапевтического груза в дистальном отделе ободочной кишки.

[334] В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии от 15:85 до 25:75 с эквивалентной толщиной покрытия от 40 мг до 70 мг на капсуле 1 размера приводит к высвобождению терапевтического груза в проксимальном отделе ободочной кишки. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера 20:80 с толщиной покрытия приблизительно 0,15 мг/мм^2 приводит к высвобождению терапевтического груза в проксимальном отделе ободочной кишки.

[335] Первое покрытие может дополнительно содержать препятствующее слипанию средство, пластификатор, поверхностно-активное вещество или их комбинации. Препятствующим слипанию средством может быть моностеарат глицерина. Пластификатором может быть триэтилцитрат. Поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат 80.

[336] В некоторых вариантах осуществления от 5% до 15% (м/м) первого покрытия представляет собой смесь препятствующего слипанию средства, пластификатора и поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления от 40% до 50% (м/м) первого покрытия составляет первый сополимер. В некоторых вариантах осуществления от 40% до 50% (м/м) первого покрытия составляет второй сополимер. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение первого сополимера и второго сополимера и смеси препятствующего слипанию средства, пластификатора и поверхностно-активного вещества составляет от 8:1 до 10:1, от 8,5:1 до 9,5:1 или от 8,8:1 до 9,2:1.

[337] В некоторых вариантах осуществления от 5% до 15% (м/м) первого покрытия составляет смесь моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80. В некоторых вариантах осуществления от 40% до 50% (м/м) первого покрытия составляет первый

сополимер, содержащий метакриловую кислоту и этилакрилат. В некоторых вариантах осуществления от 40% до 50% (м/м) первого покрытия составляет второй сополимер, содержащий метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат.

[338] Как описано ранее, пероральная лекарственная форма может содержать первое покрытие из сукцината ацетата гипромеллозы (HPMCAS или HPMC-AS). Первое покрытие HPMCAS может содержать смесь первого HPMCAS и второго HPMCAS. Первый HPMCAS может стать растворимым при pH больше или равном 6,8. Второй HPMCAS может стать растворимым при pH больше или равном 6,0. Первый HPMCAS может представлять собой HPMCAS-HF. Второй HPMCAS могут представлять собой HPMCAS-MF. Соотношение первого HPMCAS и второго HPMCAS может быть от приблизительно 40:60 до приблизительно 60:40 или от приблизительно 45:55 до приблизительно 55:45.

[339] В некоторых вариантах осуществления пероральной лекарственной формой может быть пероральная лекарственная форма, представленная На Фиг. 31A. Пероральная лекарственная форма 3200 может содержать капсулу или таблетку, при этом капсула или таблетка имеет внутреннюю область 3201, содержащую терапевтический белок и одно или несколько вспомогательных средств. Пероральная лекарственная форма 3200 может содержать первое покрытие 3203. Первое покрытие 3203 может содержать смесь первого сополимера и второго сополимера. Первое покрытие 3203 может дополнительно содержать препятствующее слипанию средство, пластификатор и поверхностно-активное вещество. Пероральная лекарственная форма 3200 может дополнительно содержать второе покрытие 3202. Второе покрытие 3202 может содержать гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). Второе покрытие может запечатывать шов капсулы. В некоторых вариантах осуществления капсула представляет собой капсулу из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC). Пероральная лекарственная форма 3200 может содержать третье покрытие 3204. Третье покрытие 3204 может содержать HPMC. В некоторых вариантах осуществления первое покрытие 3203, второе покрытие 3202, третье покрытие или их комбинации наносят на капсулу или таблетку путем напыления покрытия. В некоторых вариантах осуществления раствор HPMC с концентрацией HPMC от 6,5% до 8,5% (м/м) наносят напылением на капсулу или таблетку для нанесения второго покрытия 3202, третьего покрытия или как второго покрытия 3202, так и третьего покрытия. В некоторых вариантах осуществления второе покрытие 3202 содержит от 9 мг до 13 мг, от 10 мг до 12 мг или от 10,5 мг до 11,5 мг HPMC на капсуле 0 размера. Эквивалентные массы второго покрытие 3202 можно применять к капсулам других размеров. В некоторых вариантах осуществления третье покрытие 3204 содержит от 9 мг до 13 мг, от 10 мг до 12 мг или от 10,5 мг до 11,5 мг HPMC на капсуле 0 размера. Эквивалентные массы третьего покрытие 3204 можно применять к капсулам других размеров.

[340] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма может представлять собой пероральную лекарственную форму, представленную На Фиг.

31B. Пероральная лекарственная форма 3205 может содержать капсулу или таблетку, при этом капсула или таблетка содержит внутреннюю область 3201, содержащую терапевтический белок и одно или несколько вспомогательных средств. Пероральная лекарственная форма 3200 может содержать первое покрытие 3203. Первое покрытие 3203 может содержать смесь первого сополимера и второго сополимера. Первое покрытие 3203 может дополнительно содержать препятствующее слипанию средство, пластификатор и поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма 3205 не содержит второе покрытие или третье покрытие.

[341] Пероральная лекарственная форма может иметь срок годности по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяца. Срок годности можно оценить путем хранения таблетки в течение указанного периода времени, удаления покрытия с таблетки, растворения внутренней сердцевины таблетки и оценки процентного содержания димера, как описано в данном документе.

[342] Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от приблизительно 20% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0 от 2 до 8 часов при 37°C. Раствором может быть цитратно-фосфатный буфер с подходящим pH. Раствором может быть пищеварительный сок. Пищеварительный сок может представлять собой желудочный сок, кишечный сок (succus entericus) или их комбинации. Пищеварительный сок может содержать пищеварительные ферменты. Пищеварительный сок может находиться в желудке, тонкой кишке, ободочной кишке или их комбинации. IL-10 может быть в виде конструкции доставки IL-10.

[343] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 80% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, от 2 до 8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 75% до 100%, от 75% до 85% или от 85% до 95% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, в течение 2 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,9 до приблизительно 7,1, предпочтительно pH 7,0, в течение 2 часов.

[344] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 50% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение приблизительно 2-8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 50% до 95%, от 60% до 70% или от 75% до 90% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение 2 или 3 часов. Пероральная лекарственная форма

может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 6,4 до приблизительно 6,6, предпочтительно pH 6,5, в течение 2 или 3 часов.

[345] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения от 20% до 100% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение приблизительно 2-8 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения от 20% до 80% или от 20% до 30% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение 2 или 3 часов. Пероральная лекарственная форма может быть выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% IL-10 при воздействии раствора с pH от приблизительно 5,9 до приблизительно 6,1, предпочтительно pH 6,0, в течение 2 или 3 часов.

[346] В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, что от 20% до 30% IL-10, высвобождаемого при воздействии раствора при pH от приблизительно 6,5 до 7,0 в течение 2 часов, находится в форме димера. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, что по меньшей мере 15%, 20%, 25% или 30% IL-10, высвобождаемого при воздействии раствора при pH от приблизительно 6,5 до 7,0 в течение 2 часов, находится в форме димера. В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, что не более 50%, 60%, 70%, 80% или 90% IL-10, высвобождаемого при воздействии раствора при pH от приблизительно 6,5 до 7,0 в течение 2 часов, находится в форме димера. В некоторых вариантах осуществления после погружение пероральной лекарственной формы в раствор при pH 7,0, процентное содержание IL-10 в форме димера составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45% или 50%.

[347] Пероральная лекарственная форма, содержащая конструкции доставки IL-10, может быть изготовлена так, чтобы по меньшей мере 15% конструкций доставки IL-10 оставалось в форме димера после пятиминутной инкубации с имитированным кишечным соком (SIF)/панкреатином. Анализ панкреатина предусматривает инкубацию пероральной лекарственной формы, содержащей терапевтический белок, с панкреатином (10 мкг) в PBS (100 мкл) при 37°C.

[348] Пероральная лекарственная форма может содержать от 0,3 мг до 10 мг, от 0,3 мг до 5 мг, от 0,3 мг до 3 мг, от 1 мг до 3 мг, от 1 мг до 5 мг, от 1 мг до 10 мг, от 1 мг до 20 мг, от 20 мг до 50 мг, от 20 мг до 100 мг или от 50 мг до 100 мг конструкций доставки IL-10. Пероральная лекарственная форма может содержать 0,3 мг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг или 20 мг конструкций доставки IL-10.

[349] Пероральная лекарственная форма, содержащая конструкцию доставки IL-10, может иметь срок годности по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по

меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяца. Пероральная лекарственная форма, содержащая конструкцию доставки IL-10, может быть стабильной при указанной температуре (например, 2-8°C или комнатной температуре) в течение указанного периода времени (например, по меньшей мере в течение 1 месяца, 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев). Например, пероральная лекарственная форма, содержащая конструкцию доставки IL-10, может иметь достаточную стабильность, чтобы процентное содержание конструкций доставки IL-10 в форме димера не снижалось более, чем на 1%, 2%, 3%, 4% или 5% при хранении при указанной температуре (например, 2-8°C или при комнатной температуре) в течение указанного периода времени (например, по меньшей мере в течение 1 месяца, 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев). В некоторых вариантах осуществления пероральная лекарственная форма является достаточно стабильной, чтобы уровень димеров конструкции доставки IL-10 в пероральной лекарственной форме оставался более 80%, более 85% или более 90% после истечения периода времени.

[350] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны наборы, содержащие по меньшей мере одну стандартную лекарственную форму пероральной лекарственной формы, описанной в данном документе. Стандартные лекарственные формы могут быть представлены в упаковке, дозаторе или бутылке. Упаковка может содержать металлическую или пластиковую фольгу. Пример упаковки может включать в себя, но без ограничения, блистерную упаковку. Бутылка может представлять собой бутылку из полиэтилена высокой плотности (HDPE). Бутылка может дополнительно содержать индукционное уплотнение. Стандартные лекарственные формы могут быть упакованы в набор по отдельности (например, в разных блоках блистерной упаковки) или вместе (например, объединены в одном контейнере, таком как бутылка). Набор может дополнительно содержать инструкции по применению стандартных лекарственных форм для лечения расстройства, вызывающего воспаление. Набор может содержать уведомление, связанное с контейнером, в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов. Государственным органом может быть Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. Уведомление может быть утвержденным вкладышем к продукту.

Лечение

[351] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом индивидуума. Индивидуумом может быть млекопитающее. Млекопитающим может быть примат. Приматом может быть человек. Индивидуумом может быть индивидуум, у которого диагностирован, подозревается или имеется риск заболевания или состояния. Заболеванием или состоянием может быть заболевание или состояние, которое приводит к воспалению

ткани индивидуума, также называемое воспалительное заболевание. Заболеванием или состоянием, вызывающим воспаление, может быть заболевание или состояние, характеризующееся дефицитом экспрессии IL-10. Лечение заболевания или состояния (например, воспалительного заболевания) может включать введение терапевтически эффективного количества IL-10 или конструкции доставки IL-10 индивидууму, болеющему, с подозрением на заболевание или с рецидивом заболевания или состояния (например, воспалительного заболевания).

[352] В рамках настоящего изобретения термин «терапевтически эффективное количество» может означать, что вводимое количество, например, IL-10 или конструкции доставки IL-10, содержащейся в композиции, например в лекарственной форме или пероральной лекарственной форме, описанной в данном документе, является достаточным количеством для достижения намеченной цели, такой как, например, для лечения заболевания или состояния, например заболевания или состояния, вызывающего воспаление. В некоторых вариантах осуществления введение лекарственной формы индивидууму представляет собой введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы индивидууму.

[353] Индивидуумом, нуждающимся в лечении, может быть индивидуум, трудно поддающийся лечению или резистентный по меньшей мере к одному противовоспалительному средству. Противовоспалительным средством может быть аминосалицилат. Аминосалицилатом может быть 5-аминосалициловая кислота (5-ASA; месалазин), 4-аминосалициловая кислота (4-ASA), балсалазид, олсалазин, сульфасалазин или их комбинации. Противовоспалительным средством может быть кортикостероид. Кортикостероид может представлять собой вводимый перорально кортикостероид или вводимый внутривенно (IV) кортикостероид. Кортикостероидом может быть преднизолон. Противовоспалительным средством может быть иммунодепрессант. Иммунодепрессантом может быть азатиоприн, 6-меркаптопурин или их комбинации. Противовоспалительным средством может быть ингибитор TNFα. Ингибитором TNFα может быть адалимумаб, цертолизумаб, этанерцепт, голимумаб, инфликсимаб или их комбинации. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть ингибитор янус-киназы (JAK). Ингибитором JAK может быть филготиниб, упадацитиниб, пефицитиниб, тофацитиниб или их комбинации. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть антагонист рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P). Антагонистом рецептора S1P может быть озанимод, амизелимод, этрасимод или их комбинации. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть блокатор интегрина. Блокатором интегрина может быть этролизумаб, натализумаб, ведолизумаб, абрилумаб, метилкаротеграст или их комбинации. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть ингибитор IL-23. Ингибитором IL-23 может быть устекинумаб, мирикизумаб, бразикумаб, гуселкумаб, рисанкизумаб или их комбинации. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть ингибитор фосфодиэстеразы 4 (PDE4). По меньшей мере одним ингибитором PDE4 может быть апремиласт,

циломиласт, рофлумиласт, тетомиласт, ролипрам или их комбинации. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть лаквинимод.

[354] В некоторых случаях индивидуумом, нуждающимся в лечении, может быть индивидуум, который не получал лечения противовоспалительным средством. В некоторых случаях индивидуумом, нуждающимся в лечении, может быть индивидуум, который не получал лечения 5-ASA. В некоторых случаях индивидуумом, нуждающимся в лечении, может быть индивидуум, который частично или по существу отвечал на 5-ASA. В некоторых случаях нуждающегося в лечении индивидуума можно лечить конструкцией доставки IL-10 и 5-ASA.

[355] В некоторых вариантах осуществления пероральные лекарственные формы, содержащие конструкцию доставки IL-10, описанную в данном документе, вводят нуждающемуся в этом индивидууму перорально. В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы, содержащие конструкцию доставки IL-10, описанную в данном документе, вводят нуждающемуся в этом индивидууму ректально. Лекарственные формы, содержащие конструкцию доставки IL-10, можно вводить индивидууму по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней. Лекарственную форму можно вводить один раз в день, два раза в день или три раза в день. Индивидуумом, нуждающимся в лечении, может быть человек. Индивидуумом, нуждающимся в лечении, может быть индивидуум, у которого диагностирован, подозревается или имеется риск заболевания или состояния, вызывающее воспаление. Заболеванием или состоянием, вызывающим воспаление, может быть заболевание или состояние, характеризующееся дефицитом экспрессии IL-10. Заболеванием или состоянием, вызывающим воспаление, может быть язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), целиакия, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системная красная волчанка (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, псориатический артрит или псориаз. язвенный колит может быть язвенным колитом легкой и умеренной степени или язвенным колитом средней и тяжелой степени. Болезнь Крона может быть фистулизирующей болезнью Крона. В некоторых вариантах осуществления при лечении заболевания, вызывающего воспаление, используют пероральную лекарственную форму. Пероральную лекарственную форму можно использовать для лечения заболевания, вызывающего воспаление. Способ может включать введение индивидууму дозы пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. Введение индивидууму дозы пероральной лекарственной формы может приводить к иммуномодулирующему ответу.

[356] Иммуномодулирующий ответ может включать в себя снижение концентрации фекального кальпротектина (FCP) относительно исходного уровня FCP. Фекальный кальпротектин является биомаркером воспаления кишечника. Концентрацию FCP можно определить из образца кала или из биопсии ободочной кишки. Концентрацию FCP можно определить с помощью иммуноанализа. Иммуноанализ может представлять

собой иммуноферментный анализ (ELISA). В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP выражается в мг кальпротектина на килограмм фекалий или в мкг кальпротектина на грамм фекалий. Снижением концентрации FCP может быть снижение по меньшей мере на 20%, 30%, 40% или 50% относительно исходного уровня FCP. Снижением концентрации FCP может быть снижение от приблизительно 50% до приблизительно 80% относительно исходного уровня FCP. В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP снижается до 50 мкг/г или менее. В некоторых вариантах осуществления снижение концентрации FCP указывает на уменьшение воспаления желудочно-кишечного тракта.

[357] Исходный уровень FCP может представлять собой начальную концентрацию FCP у индивидуума или в популяции перед введением. Начальная концентрация FCP может быть показателем наличия заболевания. Начальной концентрацией FCP, являющейся показателем заболевания, может быть концентрация FCP более 150 мкг/г. В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP более 150 мкг/г является показателем наличия язвенного колита (UC). В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP снижается по меньшей мере на 50% относительно начальной концентрации FCP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

[358] Исходный уровень FCP может быть скорректированным по плацебо исходным уровнем FCP. Скорректированный по плацебо исходный уровень FCP может представлять собой процентное изменение концентрации FCP после введения плацебо индивидууму или популяции относительно исходной концентрации FCP перед введением. В некоторых вариантах осуществления концентрация FCP у индивидуума или популяции, получавших лечение конструкцией доставки IL-10, снижается по меньшей мере на 20% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня FCP, а доза пероральной лекарственной формы конструкции доставки IL-10 составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

[359] В одном иллюстративном примере у индивидуума или популяции, которым вводили плацебо, начальная концентрация FCP составляла 200 мкг/г, а после введения плацебо увеличивалась до 250 мкг/г (что составляет увеличение 25%), а у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, начальная концентрация FCP составляла 200 мкг/г, а после введения конструкции доставки IL-10 снижалась до 100 мкг/г (что составляет снижение 50%). В этом примере можно сказать, что концентрация FCP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10: (i) снижается на 50%, когда исходный уровень FCP представляет собой начальную концентрацию FCP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, перед введением, или (ii) снижается на 75% (50% + 25%), когда исходный уровень FCP является скорректированным по плацебо исходным уровнем FCP.

[360] В другом иллюстративном примере у индивидуума или популяции, которым вводили плацебо, начальная концентрация FCP составляла 200 мкг/г и снижалась до 150

мкг/г после введения плацебо (что составляет снижение 25%), а у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, начальная концентрация FCP составляла 200 мкг/г, а после введения конструкции доставки IL-10 снижалась до 100 мкг/г (что составляет снижение 50%). В этом примере можно сказать, что концентрация FCP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10: (i) снижается на 50%, когда исходный уровень FCP представляет собой начальную концентрацию FCP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, перед введением, или (ii) снижается на 25%, когда исходный уровень FCP является скорректированным по плацебо исходным уровнем FCP.

[361] Иммуномодулирующий ответ может включать в себя снижение концентрации С-реактивного белка (CRP) относительно исходного уровня CRP. С-реактивный белок (CRP) является биомаркером системного воспаления. Концентрацию CRP можно определить из образца крови. Концентрация CRP может быть концентрацией CRP в сыворотке. Концентрацию CRP можно определить с помощью иммуноанализа или нефелометрического анализа. Иммуноанализ может представлять собой иммуноферментный анализ (ELISA). Снижением концентрации CRP может быть снижение по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% относительно исходного уровня CRP. Снижением концентрации CRP может быть снижение от приблизительно 5% до приблизительно 60% от приблизительно 10% до приблизительно 50% от приблизительно 30% до приблизительно 90% или от приблизительно 40% до приблизительно 80% относительно исходного уровня CRP. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP снижается до менее 5 мг/л. В некоторых вариантах осуществления снижение концентрации CRP указывает на уменьшение системного воспаления или воспаления желудочно-кишечного тракта.

[362] Исходным уровнем CRP может быть начальная концентрация CRP у индивидуума или популяции перед введением. Начальная концентрация CRP может быть показателем наличия заболевания. Начальной концентрацией CRP, являющейся показателем заболевания, может быть концентрация CRP более 5 мг/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP более 5 мг/л является показателем заболевания раздраженного кишечника (IBD). В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP снижается по меньшей мере на 40% относительно начальной концентрации CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

[363] Исходный уровень CRP может быть скорректированным по плацебо исходным уровнем CRP. Скорректированный по плацебо исходный уровень CRP может представлять собой процентное изменение концентрации CRP после введения плацебо индивидууму или популяции, которым вводили плацебо, относительно исходной концентрации CRP перед введением. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP у индивидуума или популяции, получавших лечение конструкцией доставки IL-10, снижается по меньшей мере на 10% относительно скорректированного по

плацебо исходного уровня CRP, а доза пероральной лекарственной формы конструкции доставки IL-10 составляет приблизительно 3 мг. В некоторых вариантах осуществления концентрация CRP у индивидуума или популяции, получавших лечение конструкцией доставки IL-10, снижается по меньшей мере на 40% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня CRP, а доза пероральной лекарственной формы конструкции доставки IL-10 составляет приблизительно 1 мг.

[364] В одном иллюстративном примере начальная концентрация CRP у индивидуума или популяции, которым вводили плацебо, составляет 8 мг/л, а после введения плацебо увеличивается до 10 мг/л (что составляет увеличение 25%), а начальная концентрация CRP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, составляет 8 мг/л, а после введения конструкции доставки IL-10 снижается до 4 мг/л (что составляет снижение 50%). В этом примере можно сказать, что концентрация CRP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10: (i) снижается на 50%, когда исходный уровень CRP представляет собой начальную концентрацию CRP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, перед введением, или (ii) снижается на 75% (50% + 25%), когда исходный уровень CRP является скорректированным по плацебо исходным уровнем CRP.

[365] В другом иллюстративном примере начальная концентрация CRP у индивидуума или популяции, которым вводили плацебо, составляет 8 мг/л и снижается до 6 мг/л после введения плацебо (что составляет снижение 25%), а начальная концентрация CRP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, составляет 8 мг/л, а после введения конструкции доставки IL-10 снижается до 4 мг/л (что составляет снижение 50%). В этом примере можно сказать, что концентрация CRP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10: (i) снижается на 50%, когда исходный уровень CRP представляет собой начальную концентрацию CRP у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, перед введением, или (ii) снижается на 25% (50% - 25%), когда исходный уровень CRP является скорректированным по плацебо исходным уровнем CRP.

[366] Иммуномодулирующий ответ может включать в себя снижение показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes. система оценки Geboes является стандартной меркой гистологического ответа (Geboes et al. Gut. 2000 Sep; 47(3):404-9). В рамках настоящего изобретения показатель Geboes может представлять собой систему гистологической оценки от 0 до 22 баллов, в которой более высокая оценка соответствует более тяжелому заболеванию. Исходным уровнем показателя Geboes может быть исходный показатель Geboes индивидуума или популяции перед введением. Исходным уровнем показателя Geboes может быть скорректированный по плацебо исходный уровень показателя Geboes. Скорректированный по плацебо исходный уровень показателя Geboes может представлять собой разницу показателя Geboes после введения плацебо индивидууму или популяции от исходного показателя Geboes перед введением

плацебо. В некоторых вариантах осуществления показатель Geboes снижается по меньшей мере на 2 единицы относительно скорректированного по плацебо исходного уровня показателя Geboes, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 30 мг.

[367] В одном иллюстративном примере у индивидуума или популяции, которым вводили плацебо, начальный показатель Geboes составляет 10, а после введения плацебо увеличивается до 12 (что составляет увеличение на 2 единицы или 20%), а у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, начальный показатель Geboes составляет 10, а после введения конструкции доставки IL-10 снижается до 5 (что составляет снижение на 5 единиц или 50%). В этом примере можно сказать, что у индивидуума, которому вводили конструкцию доставки IL-10, показатель Geboes: (i) снижается на 5 единиц или 50%, когда исходным уровнем показателя Geboes является исходный показатель Geboes у индивидуума, которому вводили конструкцию доставки IL-10, или (ii) снижается на 7 единиц или 70% (50% + 20%), когда исходным уровнем показателя Geboes является скорректированный по плацебо исходный уровень показателя Geboes.

[368] В другом иллюстративном примере у индивидуума или популяции, которым вводили плацебо, начальный показатель Geboes составляет 10 и снижается до 8 после введения плацебо (что составляет снижение на 2 единицы или 20%), а у индивидуума или популяции, которым вводили конструкцию доставки IL-10, начальный показатель Geboes составляет 10, а после введения конструкции доставки IL-10 снижается до 5 (что составляет снижение на 5 единиц или 50%). В этом примере можно сказать, что показатель Geboes у заболевшего индивидуума: (i) снижается на 5 единиц или 50%, когда исходным уровнем показателя Geboes является исходный показатель Geboes у индивидуума, которому вводили конструкцию доставки IL-10, или (ii) снижается на 3 единицы или 30% (50% - 20%), когда исходным уровнем показателя Geboes является скорректированный по плацебо исходный уровень показателя Geboes.

[369] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение концентрации FCP относительно исходного уровня FCP и снижение концентрации CRP относительно исходного уровня CRP. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение концентрации FCP относительно исходного уровня FCP и снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение концентрации CRP относительно исходного уровня CRP и снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий ответ включает снижение концентрации FCP относительно исходного уровня FCP, снижение концентрации CRP относительно исходного уровня CRP и снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes.

[370] В ткани толстой кишки человека с воспалительным заболеванием желудочно-

кишечного тракта может наблюдаться инфильтрация собственной пластинки мононуклеарными клетками, эозинофилами и гистиоцитами или их комбинацией в дополнение к нейтрофильной инфильтрации эпителия, связанной с разрушением архитектуры крипт, эрозиями и изъязвлениями. Введение конструкции доставки IL-10 индивидууму может приводить к уменьшению инфильтрации собственной пластинки мононуклеарными клетками, эозинофилами и гистиоцитами или их комбинацией в дополнение к нейтрофильной инфильтрации эпителия, связанной с разрушением архитектуры крипт, эрозиями и изъязвлениями.

[371] В некоторых вариантах осуществления менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% конструкций доставки IL-10 IL-10 попадает в кровоток.

[372] В некоторых вариантах осуществления пероральные лекарственные формы, содержащие конструкцию доставки IL-10, описанную в данном документе, вводят перорально нуждающемуся в этом индивидууму. Лекарственные формы, содержащие конструкцию доставки IL-10, можно вводить индивидууму по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней. Лекарственную форму можно вводить один раз день.

[373] Введение индивидууму терапевтически эффективного количества дозы пероральной лекарственной формы от приблизительно 1 мг до приблизительно 60 мг может приводить к более 20% увеличению концентрации IL-1Ra в плазме у индивидуума относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме. В некоторых вариантах осуществления исходный уровень концентрации IL-1Ra в плазме представляет собой концентрацию IL-1Ra в плазме индивидуума перед введением. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 30 мг, а увеличение концентрации IL-1Ra в плазме относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме составляет более 30%. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 30 мг, а увеличение концентрации IL-1Ra в плазме относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме составляет от 30% до 45%. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 3 мг до приблизительно 10 мг, а увеличение концентрации IL-1Ra в плазме относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме составляет от 30% до 35%. В некоторых вариантах осуществления доза пероральной лекарственной формы составляет приблизительно 30 мг, а увеличение концентрации IL-1Ra в плазме относительно исходного уровня концентрации IL-1Ra в плазме составляет от 40% до 43%. Доза пероральной лекарственной формы может относиться к количеству IL-10 или конструкции доставки IL-10 в пероральной лекарственной форме.

[374] Введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму может приводить к концентрации IL-10 в плазме у индивидуума, не превышающей 1500 пг/мл, 1000 пг/мл, 900 пг/мл, 800 пг/мл, 700 пг/мл, 600 пг/мл, 500 пг/мл, 400 пг/мл, 300 пг/мл, 200 пг/мл, 100 пг/мл, 50 пг/мл или 10 пг/мл. Введение дозы пероральной лекарственной

формы индивидууму может приводить к концентрации IL-10 в плазме у индивидуума, не превышающей 1500 пг/мл. Введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму может приводить к концентрации IL-10 в плазме у индивидуума, не превышающей 1000 пг/мл. Введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму может приводить к концентрации IL-10 в плазме у индивидуума, не превышающей 500 пг/мл. Введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму может приводить к концентрации IL-10 в плазме у индивидуума, не превышающей 100 пг/мл.

[375] Введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы, содержащей IL-10, индивидууму может приводить к увеличению концентрации IL-1Ra в плазме индивидуума по меньшей мере на 5000 пг/мл относительно исходного уровня IL-1Ra. Исходный уровень IL-1Ra может быть обычной концентрацией IL-1Ra в плазме индивидуума перед введением. Концентрация IL-1Ra может достигать максимального значения по меньшей мере 5000 пг/мл, 6000 пг/мл, 7000 пг/мл, 8000 пг/мл, 9000 пг/мл, 10000 пг/мл, 11000 пг/мл, 12000 пг/мл, 15000 пг/мл, 20000 пг/мл или 25000 пг/мл. Концентрация IL-1Ra может достигать максимального значения от 1000 пг/мл до 10000 пг/мл, от 8000 пг/мл до 12000 пг/мл или от 25000 пг/мл до 28000 пг/мл. Максимальная концентрация IL-1Ra может быть достигнута по меньшей мере через 1, 2, 3 или 4 часа. Максимальная концентрация IL-1Ra может быть достигнута через 2-4 часа, через 2-3 часа или через 3-4 часа после введения. В одном примере концентрация IL-1Ra может достигать максимального значения от 25000 пг/мл до 28000 пг/мл через 2,5-3,5 часа после введения. В другом примере концентрация IL-1Ra может достигать максимального значения от 8000 пг/мл до 12000 пг/мл через 3,5-4,5 часа после введения.

[376] Введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы, содержащей IL-10, индивидууму с заболеванием или состоянием (например с воспалительным заболеванием) может приводить по меньшей мере к одному из: (1) пиковой концентрации IL-10 менее 50 пг/мл в плазме индивидуума и (2) совместной локализации IL-10 с клеткой, экспрессирующей CD3, в собственной пластинке индивидуума. Пиковая концентрация IL-10 может быть менее 50 пг/мл, 40 пг/мл, 30 пг/мл, 20 пг/мл, 10 пг/мл, 2,5 пг/мл, 2,0 пг/мл, 1,5 пг/мл или 1,0 пг/мл. Пиковая концентрация IL-10 может быть достигнута через 1-5 часов, 1-3 часа, 2-3 часа или 3-5 часов после введения. Клеткой, экспрессирующей CD3, может быть лимфоцит. Лимфоцитом может быть Т-клетка.

[377] Введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы, содержащей IL-10, индивидууму с заболеванием или состоянием (например с воспалительным заболеванием) может приводить к увеличению соотношения экспрессии IL-Ra и интерлейкина 1 бета (IL-1β) (IL-1Ra:IL-1β) в ткани толстой кишки индивидуума. Соотношение IL-1Ra:IL-1β может быть по меньшей мере 1:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1 или 3:1. Соотношение IL-1Ra:IL-1β может быть от 2:1 до 3:1.

[378] Введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы,

содержащей IL-10, индивидууму с заболеванием или состоянием (например с воспалительным заболеванием) может приводить к незначительному увеличению концентрации по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в плазме индивидуума. По меньшей мере одним провоспалительным цитокином может быть интерферон гамма (IFN-γ), IL-1β, интерлейкин 2 (IL-2), интерлейкин 8 (IL-8) или их комбинации. Введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы, содержащей IL-10, индивидууму с заболеванием или состоянием (например с воспалительным заболеванием) может приводить к увеличению концентрации IL-1Ra в плазме индивидуума. Концентрация IL-1Ra может достигать максимального значения от 25000 пг/мл до 28000 пг/мл через 2,5-3,5 часа после введения.

[379] Введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы, содержащей IL-10, индивидууму с заболеванием или состоянием (например с воспалительным заболеванием) может приводить к: (a) увеличению экспрессии агониста рецептора интерлейкина 1 (IL-1Ra) в ткани толстой кишки индивидуума; (b) снижению экспрессии по меньшей мере одного провоспалительного гена в ткани толстой кишки; (c) увеличению экспрессии по меньшей мере одного противовоспалительного гена в ткани толстой кишки индивидуума; (d) увеличению экспрессии по меньшей мере одного гена репарации ткани в ткани толстой кишки индивидуума; (e) увеличению экспрессии по меньшей мере одного антимикробного гена в ткани толстой кишки индивидуума; или (f) их комбинации. В некоторых вариантах осуществления введение терапевтически эффективного количества лекарственной формы, содержащей IL-10, индивидууму с заболеванием или состоянием (например с воспалительным заболеванием) приводит к увеличению соотношения экспрессии IL-1Ra и интерлейкина 1 бета (IL-1R: IL-1β) в ткани толстой кишки индивидуума. Соотношение IL-1R: IL-1β может быть более 1:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1 или 3:1.

[380] По меньшей мере одним провоспалительным геном может быть MHC-II, HPGDS, FCER1A, PLA2G2D, CCL13, FUT3, CCL28, UGT1A1, CCL20, NLRP1, TPH или их комбинации. По меньшей мере одним провоспалительным геном может быть CD163, SCNN1G, STC1, HGF, SGK1, miR-24-2, SCNN1B, PTGDR, MTNR1A, ACE2, NOX2, BEST2, VNN2, LTB4R2, B2GALT5 или их комбинации. По меньшей мере одним геном репарации ткани может быть SCNN1G, STC1, TIMP1, SCNN1B, BEST2, B3GALT5 или их комбинации. По меньшей мере антимикробным геном может быть PI15, PI3, BDKRB1, CCI28, SERPINE2 или их комбинации.

[381] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы предотвращения рецидива воспалительного заболевания у индивидуума в стадии ремиссии воспалительного заболевания, включающие введение индивидууму лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств. У индивидуума может быть стадия ремиссии воспалительного заболевания по меньшей мере в течение одного месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет или 5 лет.

[382] В некоторых вариантах осуществления в данном документе описаны способы лечения воспалительного заболевания у индивидуума, трудно поддающегося лечению или резистентного по меньшей мере к одному противовоспалительному средству, причем способ включает введение индивидууму лекарственной формы, содержащей IL-10. Противовоспалительным средством может быть аминосалицилат. В некоторых вариантах осуществления аминосалицилат выбирают из группы, состоящей от 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA; месалазин), 4-аминосалициловой кислоты (4-ASA), балсалазида, олсалазина и сульфасалазина. Противовоспалительным средством может быть кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой преднизолон. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой вводимый перорально кортикостероид или вводимый внутривенно (IV) кортикостероид. Противовоспалительным средством может быть иммунодепрессант. В некоторых вариантах осуществления иммунодепрессант выбирают из группы, состоящей из азатиоприна, 6-меркаптопурина и их комбинации. Противовоспалительным средством может быть ингибитор TNFα. В некоторых вариантах осуществления ингибитор TNFα выбирают из группы, состоящей из адалимумаба, цертолизумаба, этанерцепта, голимумаба и инфликсимаба. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть ингибитор янус-киназы (JAK). В некоторых вариантах осуществления ингибитор JAK выбирают из группы, состоящей из филготиниба, упадацитиниба, пефицитиниба и тофацитиниба. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть антагонист рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P). В некоторых вариантах осуществления антагонист рецептора S1P выбирают из группы, состоящей из озанимода, амизелимода и этрасимода. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть блокатор интегрина. В некоторых вариантах осуществления блокатор интегрина выбирают из группы, состоящей из этролизумаба, натализумаба, ведолизумаба, абрилумаба и метилкаротеграста. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть ингибитор IL-23. В некоторых вариантах осуществления ингибитор IL-23 выбирают из группы, состоящей из устекинумаба, мирикизумаба, бразикумаба, гуселкумаба и рисанкизумаба. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть ингибитор фосфодиэстеразы 4 (PDE4). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ингибитор PDE4 выбирают из группы, состоящей из апремиласта, циломиласта, рофлумиласта, тетомиласта и ролипрама. По меньшей мере одним противовоспалительным средством может быть лаквинимод. В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму вводят индивидууму ежедневно по меньшей мере в течение 5, 7, 10, 12 или 14 дней.

Комбинированная терапия

[383] В данном документе представлены способы лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение терапевтического средства IL-10 в комбинации с иммуносупрессором, отличным от IL-10. В некоторых случаях терапевтическое средство IL-10 является пероральным терапевтическим

средством. В некоторых случаях лечение иммуносупрессором, отличным от IL-10, начинают перед лечением пероральным терапевтическим средством IL-10. В некоторых случаях лечение иммуносупрессором, отличным от IL-10, начинают одновременно с лечением пероральным терапевтическим средством IL-10. В некоторых случаях субъект ранее получал лечение иммуносупрессором, отличным от IL-10, и ответ был неадекватным. В некоторых случаях у субъекта прогнозируют неадекватный ответ на иммуносупрессор, отличный от IL-10, на основании истории болезни, семейного анамнеза, наследственности или экспрессии биомаркеров. В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, не является интерлейкином.

[384] В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, представляет собой антиинтегриновую терапию, например ведолизумаб. В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, представляет собой ингибитор янус-киназы (ингибитор JAK). В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, является антагонистом IL-23 и/или антагонистом IL-12/IL-23. В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, представляет собой модулятор сфингозин-1-фосфата (S1P) или модулятор рецептора сфингозин-1-фосфата. В других случаях иммуносупрессором, отличным от IL-10, является IL-22 или агонист IL-22.

[385] В некоторых случаях иммуносупрессор, отличный от IL-10, представляет собой ингибитор TNF альфа. В некоторых случаях лечение ингибитором TNF альфа начинают перед лечением терапевтическим средством IL-10. В некоторых случаях лечение ингибитором TNF альфа начинают одновременно с лечением терапевтическим средством IL-10. В некоторых случаях субъект ранее получал лечение ингибитором TNF альфа, и ответ был неадекватным. В некоторых случаях у субъекта прогнозируют неадекватный ответ на ингибитор TNF альфа на основании истории болезни, семейного анамнеза, наследственности или экспрессии биомаркеров.

[386] Кроме того, представлены способы лечения воспалительного заболевания у субъекта, при этом ответ субъекта на лечение ингибитором TNF альфа был неадекватным, причем способ включает введение терапевтического средства IL-10. В некоторых случаях лечение ингибитором TNF альфа продолжают одновременно с терапевтическим средством IL-10.

[387] В некоторых случаях воспалительное заболевание может представлять собой заболевание кишечника или пищеварительного тракта. В некоторых случаях воспалительное заболевание может проявляться или присутствовать в ткани, дистально или на значительном расстоянии от пищеварительного тракта. В некоторых случаях воспалительное заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из: воспалительного заболевания кишечника, псориаза, бляшечного псориаза, гнойного гидраденита, псориатического артрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бактериального сепсиса, болезни Крона, фистулизирующей болезни Крона, язвенного колита средней и тяжелой степени, язвенного колита легкой и средней степени, язвенного колита, коллагенового

колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, синдрома Бехчета, неуточненного колита, ревматоидного артрита, панкреатита, воспаления печени, резервуарного илеита, проктита, увеита, болезни «трансплантат против хозяина» и повреждения эпителиальных клеток. В некоторых случаях воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит. В некоторых случаях воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. В некоторых случаях воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит. В некоторых случаях воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

[388] В некоторых случаях терапевтическое средство IL-10 можно вводить местно в очаг заболевания. Например, терапевтическое средство IL-10 можно вводить перорально для лечения заболевания пищеварительного тракта, такого как язвенный колит или болезнь Крона. В некоторых случаях терапевтическое средство IL-10 можно вводить перорально для достижения системной дозы, которая может лечить заболевание, дистальное к пищеварительному тракту. Например, терапевтическое средство IL-10 можно вводить перорально для лечения ревматоидного артрита или псориаза.

[389] Неадекватный ответ на терапевтическое средство может содержать частичный ответ или отсутствие ответа. В некоторых случаях неадекватный ответ представляет собой ответ, отличный от полного излечения или полной ремиссии заболевания. Субъект, у которого был неадекватный ответ на терапевтическое средство, может иметь меньше симптомов или может иметь менее тяжелые симптомы во время или после лечения по сравнению с состоянием до лечения. В других случаях субъект, у которого был неадекватный ответ на заболевание, может иметь то же количество симптомов или те же симптомы, что и до лечения. В некоторых случаях субъект, у которого был неадекватный ответ на терапевтическое средство, может иметь больше симптомов или более тяжелые симптомы после лечения по сравнению с состоянием до лечения.

[390] В некоторых случаях у субъекта с ревматоидным артритом, у которого был неадекватный ответ на терапевтическое средство, может сохраняться один или несколько симптомов артрита после лечения терапевтическим средством (например, только ингибитором TNF-альфа). Например, у субъекта может быть один или несколько суставов с активным заболеванием. Активное заболевание может быть выявлено с помощью флуоресцентной оптической или магнитно-резонансной томографии. Субъект с неадекватным ответом на лечение ревматоидного артрита может иметь один или несколько больных суставов и/или один или несколько опухших суставов. Другие симптомы, которые могут присутствовать, включают тугоподвижность или слабость суставов, покраснение кожи над суставами, припухлости над суставами, воспаление, сухость во рту, физическую деформацию или ощущение покалывания.

[391] В некоторых случаях у субъекта с язвенным колитом, у которого был неадекватный ответ на терапевтическое средство, может сохраняться один или несколько

симптомов язвенного колита после лечения терапевтическим средством (например, только ингибитором TNF-альфа). Субъект с неадекватным ответом на лечение язвенного колита может иметь показатель по модифицированной клинической шкале Мэйо (MMS) от приблизительно 4 баллов до приблизительно 9 баллов. У субъекта может быть централизованно считываемый эндоскопический дополнительный показатель MCS 2 степени или выше. В некоторых случаях у субъекта может быть дополнительный показатель ректального кровотечения MMS 1 балл или выше. В некоторых случаях у субъекта может быть заболевание, проходящее на 15 см или более от анального края. Другие симптомы язвенного колита включают боль/дискомфорт в животе, кровь или гной в кале, лихорадку, потерю массы, частую рецидивирующую диарею, утомляемость, снижение аппетита и тенезмы.

[392] В некоторых случаях у субъекта может быть неадекватный ответ после лечения ингибитором TNF альфа. В некоторых случаях у субъекта может быть неадекватный ответ на ингибитор TNF альфа после по меньшей мере 6 или по меньшей мере 12 недель лечения ингибитором TNF альфа.

[393] Ингибитором TNF альфа может быть моноклональное антитело. Примеры терапевтических средств против TNF альфа включают инфликсимаб (Remicade), адалимумаб (Humira) и голимумаб (Simponi). В некоторых случаях ингибитором TNF альфа является этанерцепт. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа не является этанерцептом.

[394] Ингибитор TNF альфа можно вводить путем подкожной инъекции или любым другим подходящим способом. Например, адалимумаб можно вводить путем подкожной инъекции. В некоторых случаях адалимумаб можно вводить в дозе 40 мг раз в две недели. В некоторых случаях одна или несколько исходных доз может быть выше поддерживающей дозы. Например, схема лечения адалимумабом может включать первую дозу 160 мг, с последующей второй дозой 80 мг приблизительно через две недели, за которой через две недели следуют поддерживающие дозы 40 мг раз в две недели. В некоторых случаях исходная доза адалимумаба может составлять 80 мг, за которой через две недели следуют поддерживающие дозы 40 мг раз в две недели.

[395] Ингибитор TNF альфа можно вводить путем внутривенной инфузии. Например, инфликсимаб можно вводить путем внутривенной инфузии. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа можно вводить путем внутривенной инфузии в течение периода времени не менее двух часов. В некоторых случаях инфликсимаб можно вводить в дозе 5 мг/кг. В других случаях инфликсимаб можно вводить в дозе 3 мг/кг или в дозе 10 мг/кг. В некоторых случаях схема лечения может включать более частые начальные дозы, с последующими поддерживающими дозами. В некоторых случаях схема лечения может включать введение ингибитора TNF альфа на 0, 2 и 6 неделе, затем каждые 8 недель.

[396] Ингибитор TNF альфа может вводить медицинский работник, или его можно предоставить пациенту для самостоятельного введения. В некоторых случаях ингибитор TNF альфа можно поставлять в предварительно заполненном шприце с однократной дозой

или в автоматическом инъекторе с однократной дозой. Например, адалимумаб можно поставлять в виде ручки HUMIRA Pen с однократной дозой.

[397] В некоторых случаях терапевтическое средство IL-10 можно вводить перорально. В некоторых случаях терапевтическое средство IL-10 можно вводить приблизительно одновременно с ингибитором TNF альфа. Например, терапевтическое средство IL-10 можно вводить непосредственно перед или непосредственно после ингибитора TNF альфа. В некоторых случаях терапевтическое средство IL-10 можно вводить в тот же день, что и ингибитор TNF альфа, или в предшествующий день или в день после введения ингибитора TNF альфа. Например, терапевтическое средство IL-10 и ингибитор TNF альфа можно вводить на 0, 2 и 6 неделе, а затем после этого каждые 8 недель. В другом примере терапевтическое средство IL-10 и ингибитор TNF альфа можно вводить каждые две недели.

[398] В некоторых случаях терапевтическим средством IL-10 может быть конструкция доставки IL-10.

ПРИМЕРЫ

[399] Пример 1: разработка конструкции доставки IL-10

[400] IL-10 представляет собой иммуномодулирующий цитокин, который подавляет активацию и эффекторную функцию множества врожденных и адаптивных иммунных клеток. Была разработана конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Эта конструкция представляла собой рекомбинантный гомодимерный белок слияния, когда каждый мономер состоял из N-концевого метионина, домена cholix^{386} (SEQ ID NO: 4) и домена рекомбинантного человеческого IL-10 (rhIL-10) (SEQ ID NO: 2), связанного аминокислотным полипептидным спейсером из остатков глицина и серина (polyGlySer) (SEQ ID NO: 6). Домен cholix^{386} представлял собой усеченную форму варианта cholix, нетоксичного мутанта, полученного из Vibrio cholera, содержащего 386 аминокислот. Конструкция имела молекулярную массу 125796 Да и изоэлектрическую точку (pI) 5,49.

[401] Домен cholix^{386} облегчает активную транспортировку конструкции доставки IL-10 SEQ ID NO: 5 через эпителиальные клетки посредством везикулярного трансцитоза в локальную подслизистую ткань желудочно-кишечного тракта. Направленная доставка rhIL-10 непосредственно в собственную пластинку пероральным путем может обойти один или несколько недостатков, возникающих при системном введении, и привести к более высоким концентрациям в слизистой оболочке и клинически значимому уменьшению воспаления и заболевания.

[402] Как использовано в примерах в данном документе, лекарственное вещество (DS) использовано в отношении лиофилизированного порошка, и лекарственный продукт (DP) использован в отношении формы капсулы или таблетки.

[403] Пример 2: экспрессия целевой конструкции

[404] Плазмиды, содержащие кодирующую последовательность (SEQ ID NO: 10) целевую конструкцию (SEQ ID NO: 5), конструировали путем клонировани в сайты Nde I и EcoRI скелета pET26(b). Последовательность, кодируемая SEQ ID NO: 10, представляет

собой кодон-улучшенную последовательность для экспрессии в клетках бактерий. Плазмида содержала промотор T7 и придавала устойчивость к канамицину. клетки BL21 E. coli трансфицировали плазмидой с целевой конструкцией с использованием метода трансформации с тепловым шоком следующим образом: аликвоту клеток BL21 и плазмиды с целевой конструкцией помещали в пробирку и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем пробирки подвергали тепловому шок в течение 30-45 секунд при температуре 42°C ± 2°C на водяной бане. Непосредственно после теплового шока пробирки помещали на лед в течение 2-5 минут. в каждую пробирку добавляли среду, и пробирки инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Трансформированные клетки высевали на чашки с агаром LB/Kan и инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем с чашки с агаром отбирали одну колонию, инокулировали в 4 мл среды LB и выращивали в течение ночи в смесительной колбе. К культуре добавляли маточный глицерин (80%), затем разливали в криопробирки и хранили при -80 ± 10°C. Затем дополнительно получали пре-RCB (исследовательский банк клеток; маточный раствор культуры+глицерина) для получения основного банка клеток (MCB).

[405] Для получения MCB клетки из RCB размножали в смесительных колбах до накопления достаточной клеточной массы, извлекали с помощью центрифугирования, ресуспендировали в среде для криоконсервации, аликвоты распределяли по 300 криопробиркам и охлаждали до замораживания. MCB хранили при температуре -80 ± 5°C в помещении для GMP с контролируемым доступом. MCB получали и сохраняли в соответствии с процедурами cGMP и рекомендациями ICH Q5B и Q5D.

[406] После размножения в смесительной колбе клетки переносили в производственный биореактор. Ферментацию проводили в биореакторе объемом 1500 л в присутствии канамицина для селективного давления. Производственная ферментация состоит из фазы роста клеток, за которой следует фаза экспрессии с использованием изопропIL-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) в качестве индуктора, когда белок экспрессируется внутриклеточно в виде нерастворимых телец включения. В производственном реакторе регулировали заданные значения pH, температуры и уровня растворенного кислорода, указанных в производственной методике: pH регулировали путем добавления фосфорной кислоты и гидроксида аммония; растворенный кислород регулировали потоками воздуха и газообразного кислорода. Все газы пропускали через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм и менее. Производственный реактор содержал питательную среду для бактерий с определенными компонентами. Перед инокуляцией эти ингредиенты стерилизовали в соответствии с письменными стандартными рабочими процедурами. Фаза производства представляла собой периодический процесс, в котором добавляют питательную среду на основе глюкозы для поддержания роста клеток и жизнеспособности культуры.

[407] В конце производства клетки собирали путем центрифугирования, а клеточную пасту подвергали дальнейшей обработке или замораживали для последующей обработки. Для высвобождения тел включения, содержащих продукт, использовали

гомогенизацию под высоким давлением. Затем тельца включения ресуспендировали, промывали и отделяли от других клеточных компонентов путем центрифугирования. Тела включения либо обрабатывали сразу, либо замораживали для использования позднее. Клеточную пасту и/или суспензию телец включения хранили при температуре -20 ± 5°C до дальнейшего использования.

[408] Пример 3: Оптимизация рефолдинга

[409] Солюбилизацию телец включения (ТВ) проводили с использованием высокой концентрации гидрохлорида гуанидина, сильного хаотропа. После солюбилизации первоначальные усилия с использованием традиционного подхода к рефолдингу, восстановление с помощью DTT, а затем разбавление окислительно-восстановительной смесью, привели к низкому выходу правильно сложенного димера (<5% димера). Был реализован второй подход с использованием сульфитолиза, который привел к более высокому извлечению. Пептид сначала восстанавливали сульфитом натрия, а затем свободные сульфгидрилы блокировали тетратионатом калия. После диафильтрации для удаления остаточных реагентов сульфитолиза белок разбавляли окислительно-восстановительной смесью, что обеспечивало рефолдинг и окисление белка. При использовании этого подхода выход был приблизительно в 2 раза выше (~ 10% димера), но все же ниже желаемого. Дополнительно исследовали эффект рефолдинга в присутствии осмолитов, таких как сахароза, а также других модифицирующих воду средств, таких как глицерин.

[410] эффективность рефолдинга оценивали после изменения концентрации аргинина и концентрации целевой конструкции (белка) в растворе для рефолдинга (Таблица 5; Фиг. 25A-25B). Эффективность рефолдинга, показанная в этом примере в Таблицах и На Фигурах, эквивалентна процентному содержанию димеров в полученных подвергнутых рефолдингу целевых конструкциях, и ее оценивали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC). На Фиг. 28 показана иллюстративная хроматограмма, показывающая % димеров при использовании четырех различных растворов для рефолдинга. На Фиг. 29 показана эффективность рефолдинга четырех растворов для рефолдинга, показанных на хроматограмме Фиг. 28.

Таблица 5 - Концентрации компонентов в девяти растворах для рефолдинга с различными концентрациями аргинина (М) и целевой конструкции (мг/мл)

	Аргинин	Концентрация Белка
1	0,50	0,75
2	0,50	1,00
3	0,50	1,50
4	0,75	1,00
5	0,75	1,00
6	0,75	1,50
7	1,00	0,75

8	1,00	1
9	1,00	1,5

[411] эффективность рефолдинга оценивали после изменения pH и концентрации глицерина раствора для рефолдинга (Таблица 6; Фиг. 26A-26B).

Таблица 6 - Концентрации компонентов в девяти растворах для рефолдинга с различными концентрациями глицерина (мМ) и pH

	Аргинин	Концентрация Белка	Глицерин	pH
1	0,75	1,00	0	7,5
2	0,75	1,00	10	7,5
3	0,75	1,00	30	7,5
4	0,75	1,00	0	8
5	0,75	1,00	10	8
6	0,75	1,00	30	8
7	0,75	1,00	0	8,5
8	0,75	1,00	10	8,5
9	0,75	1,00	30	8,5

[412] эффективность рефолдинга оценивали после изменения концентрации сахарозы и концентрации PEG раствора для рефолдинга (Таблица 7; Фиг. 27A-27B).

Таблица 7 - концентрации компонентов в девяти растворах для рефолдинга с различными концентрациями PEG и сахарозы (М) %

	Аргинин	Концентрация Белка	PEG 3350	Сахароза, М
1	0,75	1,00	0	0
2	0,75	1,00	0,1	0
3	0,75	1,00	0,5	0
4	0,75	1,00	0	0,25
5	0,75	1,00	0,1	0,25
6	0,75	1,00	0,5	0,25
7	0,75	1,00	0	0,5
8	0,75	1,00	0,1	0,5
9	0,75	1,00	0,5	0,5

[413] эффективность рефолдинга оценивали после изменения концентрация сахарозы, глицерина и PEG раствора для рефолдинга (Таблица 8).

Таблица 8 - Концентрации компонентов в десяти растворах для рефолдинга и полученная эффективность рефолдинга (димер %)

	Аргинин, М	Концентрация Белка, мг/мл	Сахароза, М	Глицерин, %	PEG 3350, %	Димер (%)

1	1,00	1,00	0	0	0,2	17,38%
2	1,00	1,00	0,1	0	0	18,29%
3	1,00	1,00	0,25	0	0	18,16%
4	1,00	1,00	0	5	0,1	17,71%
5	1,00	1,00	0,1	5	0,2	19,00%
6	1,00	1,00	0,25	5	0,1	18,21%
7	1,00	1,00	0	10	0	16,30%
8	1,00	1,00	0,1	10	0,1	18,10%
9	1,00	1,00	0,25	10	0,2	16,61%
10	1,00	1,00	0,25	5	0	17,90%

[414] Пример 4: Очистка подвергнутых рефолдингу конструкций

[415] Во время разработки способа оценивали несколько режимов хроматографии. Катионный обмен (CEX) был неудачным при относительно низком pH, так как белок осаждался при pH ниже pI целевой конструкции (pH 5,5). Хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC) также оказалась безуспешной, поскольку белок оказался нестабильным при высокой концентрации соли, необходимой для связывания.

[416] Анионный обмен (AEX) работал хорошо, так как белок был стабилен при более высоком pH и связывался с приемлемой способностью. Были оценены несколько носителей AEX от различных поставщиков, при этом Capto™ Q ImpRes показал наилучшие общие характеристики, особенно в отношении отделения активных димерных частиц от двух основных связанных с продуктом примесей, остаточных мономерных и агрегированных частиц. В качестве этапа очистки керамический гидроксиапатит (CHT) использовали в виде независимого этапа смешанного режима для дальнейшего уменьшения примесей, связанных с продуктом и процессом.

[417] Подвергнутые рефолдингу целевые конструкции подвергали хроматографии AEX с последующей хроматографией с CHT. Для первоначальной клинической кампании использовали градиентное элюирование на обеих этапах хроматографии, при этом возможность разработки оптимизированных ступенчатых элюций оценивали по мере клинической разработки. Во время элюирования фракции собирали, и каждую фракцию анализировали с помощью SE-HPLC на содержание димеров целевой конструкции. Фракции, содержащие выше указанного порога (например, 75%), затем объединяли, чтобы соответствовать желаемому процентному содержанию димера. После этапа CHT конечную массу концентрировали и подвергали диафильтрации с использованием UF/DF в буфер лекарственной формы. На Фиг. 30 показан анализ SDS-PAGE основных промежуточных продуктов процесса, который продемонстрировал увеличение чистоты димера во время последующей обработки.

[418] Пример 5: Лиофилизация жидкого промежуточного продукта

[419] Для получения пероральной капсулы, содержащей конструкцию доставки IL-

10, очищенный жидкий промежуточный продукт, полученный в соответствии с протоколом очистки, описанным в Примере 4, трансформировали в высушенный порошок. Было определено, что лиофилизация является подходящим способом получения порошка при минимальном образовании агрегатов.

[420] Разработку лекарственной формы для создания буфера для лиофилизации выполняли путем первоначального скрининга стабильности жидкости при замораживании-оттаивании и сдвиговой деформации целевой конструкции после диализа в комбинациях нескольких компонентов, описанных ниже:

1) Поверхностно-активное вещество: полисорбат 80, 20 и полоксамер 188.

2) диапазон pH от 5 до 8

3) Осмолит: 5% сахароза

4) Соли: хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl), хлорид магния ($MgCl_2$), сульфат аммония (NH_4SO_4) и сульфат натрия (Na_2SO_4).

[421] На основании данных первоначального скрининга жидкой лекарственной формы было определено, что полоксамер 188 снижает агрегацию целевой конструкции при сдвиговом напряжении, и что фосфатно-солевой буфер (PBS) и NaCl в концентрации 150-200 мМ также демонстрируют повышенную стабильность.

[422] После тестирования на основе результатов первоначального скрининга жидкой лекарственной формы, были проведены первоначальные исследования выполнимости лиофилизации с использованием условий, указанных в Таблице 9. К этому скринингу добавляли глицин и маннит, которые, как известно, используют при лиофилизации белков в качестве аморфных объемообразующих средств, гистидин при pH 7,0 добавляли для более детальной оценки влияния pH в диапазоне 7,0-7,5, а трегалозу добавляли в качестве опции к сахарозе в качестве осмолита. На Фиг. 21 и 22 показано процентное содержание целевых конструкций в димерной форме до и после инкубации при 25°C в течение 3 дней (Фиг. 21) и до и после 5 циклов замораживания/оттаивания (Фиг. 22).

Таблица 9 - Краткое изложение условий, используемых в первоначальных исследованиях выполнимости лиофилизации

Буфер	Объемообразующее Средство	Стабилизатор
10 мМ Гистидин pH 7,0	-	150 мМ NaCl
	2% Глицин	-
	2% Глицин	0,5% Сахароза
	2% Глицин	0,5% Трегалоза
	3% Глицин	-
	4% Глицин	50 мМ NaCl, 0,5% Трегалоза
	4% Глицин	150 мМ NaCl, 0,5%

		Трегалоза
	4% Глицин	50 мМ NaCl, 0,5% Сахароза
10 мМ фосфата натрия pH 7,5	-	150 мМ NaCl
	2% Глицин	-
	2% Глицин	0,5% Сахароза
	2% Глицин	0,5% Трегалоза
	3% Глицин	-
	4% Маннит	50 мМ NaCl, 0,5% Трегалоза
	4% Маннит	150 мМ NaCl, 0,5% Трегалоза
	4% Маннит	50 мМ NaCl, 0,5% Сахароза

[423] это первоначальное исследование выполнимости лиофилизации показало, что целевая конструкция была более стабильной при pH 7,5 с сахарозой и глицином относительно восстановленной агрегации. На основании результатов этого исходного исследования проводили второй скрининг лиофилизации с использованием лекарственных форм, приведенных в Таблице 10.

Таблица 10 - Краткое изложение дополнительного скрининга буфера лекарственных форм

					Перед лиофилизацией (%)			После лиофилизации (%)		
Буфер	Буферное Средство	Стабилизатор	ПАВ	pH	HMW	Димер	Мономер	HMW	Димер	Мономер
АМТ-10 (исходный Материал)					2,6	89,2	8,2			
10 мМ фосфат натрия	2% Глицин	0,5% Сахароза	0,3% Полоксамер	7,5	2,9	89,8	7,4	4,3	89,3	6,4
		1% Сахароза			2,96	90,1	6,9	4,1	89	6,9
		1% Трегалоза			2,9	90,3	6,8	3,6	89,8	6,6
	4% Маннит	Сахароза, 1,3% аргинин			3,1	90,1	6,8	3,9	89,5	6,6
		2,6%			4,9	86,7	8,4	4,1	89,5	6,4

		аргинин								
10 мМ Калий	2% Глицин	1% Сахароза			3,15	90,3	6,6	3,7	89,8	6,4
		1% Трегалоза			3,2	90,1	6,7	3,9	89,5	6,6
10 мМ Гистидин		1% Сахароза		7	2,8	90,9	6,3	3,5	89,9	6,6
		1% Трегалоза			2,95	90,5	6,6	3,3	90,2	6,5

[424] Из этого скрининга двумя составами, которые демонстрировали наилучшую стабильность, были:

1) 10 мМ фосфата калия, 2% глицин, 1% сахароза или 1% трегалоза, 0,3% полоксамер 188 при pH 7,5

2) 10 мМ гистидина, 2% глицин, 1% сахароза или 1% трегалоза, 0,3% полоксамер при pH 7,0.

[425] При использовании этих двух составов, чтобы убедиться, что этап UF/DF будет работать, как задумано, и что замораживание в начале процесса лиофилизации будет приемлемым, проводили скрининг окончательной жидкой лекарственной формы при замораживании/оттаивании, и проводили исследование краткосрочной стабильности при более высоких концентрациях белка, как указано в Таблице 11 ниже.

Таблица 11 - Составы для скрининга замораживания/оттаивания

Состав
10 мМ Фосфат калия, 2% Глицин, 1% Сахароза, 0,3% Полоксамер 188, pH 7,5
10 мМ Фосфат калия, 2% Глицин, 1% Трегалоза, 0,3% Полоксамер 188, pH 7,5
10 мМ Гистидин, 2% Глицин, 1% Сахароза, 0,3% Полоксамер 188, pH 7,0
10 мМ Гистидин, 2% Глицин, 1% Трегалоза, 0,3% Полоксамер 188, pH 7,0

[426] Целевая конструкция в концентрации 20 мг/мл не продемонстрировала какого-либо значительного увеличения агрегации во время замораживания/оттаивания или на 1 неделе при 4°C для любых тестируемых условий. Было установлено, что буфер лекарственной формы, состоящий из 10 мМ фосфата калия, 2% глицина, 1% сахарозы, 0,3% полоксамера 188 при pH 7,5, обладает наилучшей общей стабильностью при 2-8°C и 25°C в течение одной недели (см. Данные На Фиг. 24C и Фиг. 24D, рамка и стрелки указывают на лучший состав). Этот состав было рекомендовано использовать в качестве буфера для использования на стадии получения лекарственной формы UF/DF перед

лиофилизацией. Данные экспериментов по замораживанию/оттаиванию показаны На Фиг. 23А и Фиг. 23Б. Данные исследования краткосрочности стабильности показаны На Фиг. 24А-24Д.

[427] Массовую лиофилизацию проводили путем оттаивания и распределения жидкого промежуточного продукта в лотки, которые загружали в лиофилизатор. Параметры управления во время цикла лиофилизации, такие как температура и вакуумметрическое давление, выполняли в зависимости от времени. Образцы в процессе отбирали после завершения цикла. Лиофилизированный порошок объединяли и смешивали на основном вкладыше из полиэтилена низкой плотности (LDPE), который помещали внутрь дополнительного вкладыша из LDPE. Второй вкладыш термосваривали, а затем помещали в майларовый пакет, который также термосваривали. При лиофилизации целевая конструкция представляла собой порошок от белого до почти белого цвета. Комбинированный лиофилизированный порошок является лекарственным веществом с целевой конструкцией (DS).

[428] Пример 6: Оценка составов покрытий in vitro

[429] Различные типы составов можно использовать для облегчения адресной доставки активного фармацевтического ингредиента (API) в желаемое место его действия и для защиты API от определенных физиологических условий, имеющихся в желудочно-кишечном тракте, которые могут повлиять на его стабильность. При приеме внутрь API вступает в контакт с низким pH желудка и протеолитическим пепсином в желудке, что может повлиять на его стабильность. После прохождения через желудок API попадает в тонкую кишку, которая характеризуется более высокими значениями pH. Секреция солей желчных кислот и протеолитических ферментов поджелудочной железы может иметь огромное влияние на стабильность API. Кроме того, pH желудка и концентрации протеолитических ферментов значительно различаются между состояниями после еды и натощак. Таким образом, цель этого примера состояла в том, чтобы исследовать распад пяти различных составов и последующее целенаправленное высвобождение из них кофеина во время прохождения через весь желудочно-кишечный тракт.

[430] Установка реактора, используемая в этом эксперименте, была адаптирована с помощью симулятора микробной экосистемы кишечника человека (SHIME®), представляющего желудочно-кишечный тракт (GI) взрослого человека, как описано у Molly et al. (Appl Microbiol Biotechnol 39:254-258 (1993)), который включен в настоящее описание в качестве ссылки. В этой системе первые два реактора имитировали различные этапы поглощения и пищеварения пищи, при этом перистальтические насосы добавляли определенное количество пищи, панкреатической и желчной жидкости соответственно в отдел желудка и тонкой кишки и опорожняли соответствующие реакторы через определенные промежутки времени. Последние три отдела, реакторы непрерывного перемешивания с постоянным регулированием объема и pH, имитировали восходящий, поперечный и нисходящий отделы ободочной кишки. Время удерживания и pH различных сосудов выбирают таким образом, чтобы они соответствовали условиям in vivo в

различных частях желудочно-кишечного тракта.

[431] В этом эксперименте использовали адаптированную систему SHIME®, отображающую физиологические условия желудка и тонкой кишки в одном и том же реакторе с течением времени (Фиг. 3). Чтобы имитировать условия после еды или натощак, в реактор добавляли желудочную суспензию. После этого добавляли стандартизированный фермент и желчную жидкость для имитации условий тонкого кишечника. Условия инкубации (профили pH, время инкубации) были оптимизированы, чтобы походить на условия in vivo в различных областях желудочно-кишечного тракта для условий натощак или после еды.

[432] Протокол имитации желудка и тонкого кишечника

[433] В ходе исследования растворение капсул тестировали при прохождении через желудок и тонкий кишечник натощак.

[434] В желудочной фазе инкубация происходила в течение 45 минут при 37°C при перемешивании путем встряхивания при pH 2,0 (Фиг. 3). Добавляли в 4 раза более низкие уровни пепсина и фосфатидилхолина по сравнению с условиями после еды. В качестве фоновой среды использовали только соли и муцины. Отбор образцов и визуальная оценка при t=0 и 45-минутной инкубации в желудке.

[435] В тонкокишечной фазе при смешивании путем встряхивания pH сначала автоматически увеличивается с 2,0 до 5,5 в течение 5 минут, после чего pH среды увеличивается с 5,5 до 6,5 в течение первого часа, с 6,5 до 7,0. в течение второго часа и оставался постоянным на уровне 7,0 в течение третьего часа инкубации в тонкой кишке (Фиг. 5). Температуру регулировали на уровне 37°C. Что касается ферментов поджелудочной железы, использовали как сырой экстракт поджелудочной железы животных (панкреатин), содержащий все соответствующие ферменты в определенном соотношении, так и определенные соотношения различных ферментов. В условиях натощак добавляли в 5 раз более низкие уровни ферментов поджелудочной железы по сравнению с экспериментами, проведенными в условиях приема пищи. Что касается солей желчных кислот, обычно добавляли 3,3 мМ экстракта бычьей желчи, поскольку бычья желчь более близка к человеческой, чем свиная, с точки зрения содержания тауро- и гликохолата.

[436] Протокол имитации ободочной кишки

[437] Во время этого исследования образец фекалий одного донора собирали и хранили при -80°C до дальнейшего использования в качестве источника кишечного микробиотика для применения во время всех инкубаций в ободочной кишке, которые следовали за прохождением через верхние отделы желудочно-кишечного тракта. Таким образом, использование одного и того же кишечного микробиотика позволило сравнить результаты, полученные в ходе различных экспериментов. После помещения образца фекалий в коробку для образцов добавляли пакет с анаэрогеном, и коробку немедленно запечатывали. Порошок в пакете с анаэрогеном немедленно удалил весь кислород из коробки для отбора образцов. Затем к образцу фекалий добавляли анаэробный PBS и

готовили фекальную суспензию путем гомогенизации в желудке. Фекальную суспензию кратковременно центрифугировали для удаления крупных частиц. Затем к фекальному супернатанту добавляли равный объем раствора криопротектора. После гомогенизации криозащищенную фекальную суспензию быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

[438] Перед началом реальных экспериментов с ободочной кишкой криоконсервированный образец фекалий предварительно инкубировали в биореакторах, чтобы получить полностью метаболически активную фоновую микробиоту ободочной кишки, которую использовали для инокуляции инкубаций ободочной кишки. Вкратце, 2,5% (о/о) фекальной суспензии инокулировали в богатую среду ободочной кишки, содержащую субстраты, полученные как у хозяина, так и из пищи. Сосуды делали анаэробными путем продувки газообразным азотом и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Таким образом, через 24 часа инкубации была получена полностью укоренившаяся и метаболически активная микробиота ободочной кишки.

[439] После взятия SIend (конец ободочной кишки или подвздошная кишка) в конце экспериментов с желудком/ободочной кишкой начинали инкубацию в ободочной кишке. Это было сделано путем добавления 200 мл свежей среды ободочной кишки, содержащей субстраты, полученные у хозяина и из пищи, к 200 мл суспензии желудка/тонкой кишки. Моделирование метаболически активной микробиоты просвета ободочной кишки было получено путем добавления 300 мл предварительно инкубированного фекального материала в биореакторы. Сосуды делали анаэробными путем продувки газообразным азотом и затем инкубировали в течение 18 ч при 37°C. Визуальную оценку капсул и отбор образцов реакторов проводили после 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 ч; и 18 ч инкубации в ободочной кишке.

[440] Распад капсул

[441] Во время прохождения по смоделированному желудочно-кишечному тракту визуальный осмотр капсул проводили в соответствии со следующей оценкой: 1: капсула цела; 2: капсула повреждена, но почти весь продукт все еще находится в капсуле; 3: капсула повреждена, и весь продукт был высвобожден; 4: капсула разрушена.

[442] Был реализован метод HPLC-UV/Vis, который позволил количественно определить концентрацию кофеина в образцах, взятых из реакторов. Вкратце, образцы анализировали методом изократического разделения (25% метанола:75% воды) на колонке C18. Температуру колонки регулировали на уровне 25°C. Общее время обработки на образец составило 7 мин. Вводимый объем составлял 10 мкл, а детектор UV/Vis задействовали при 272 нм. Количественное определение кофеина проводили с использованием внешних стандартов. Перед введением в колонку образцы центрифугировали в течение 15 минут при 9000 об/мин. Затем супернатант фильтровали через фильтр 0,2 мкм во флаконы для HPLC.

[443] Статистически значимые различия между концентрацией кофеина определяли между каждой точкой отбора образцов и предыдущей во время экспериментов

в условиях натощак, чтобы продемонстрировать изменения в зависимости от времени. С точки зрения статистики, различия для всех обсуждаемых данных, обозначенных как «$p < 0,05$» или «*», были значимыми с доверительным интервалом 95%, что продемонстрировано с помощью t-критерия Стьюдента.

[444] Исследовали распад пяти различных типов составов при прохождении через желудочно-кишечный тракт (Таблица 12). Наряду с экспериментами с пятью составами был проведен контрольный эксперимент для определения исходной концентрации кофеина. В каждый реактор добавляли по одной капсуле, и капсулы устанавливали в загрузчик капсул. Все эксперименты были выполнены в биологической трехкратной повторности.

Таблица 12 - Изученные лекарственные формы

Идентичность Капсул	Соотношение эудрагит® L30D55: эудрагит® FS30D	Содержание Капсул	Толщина покрытия	Фигура, показывающая профиль высвобождения кофеина
A	50:50	20 мг SEQ ID NO: 5 10 мг кофеина	60 мг	Фиг. 5A
B	50:50	20 мг SEQ ID NO: 5 10 мг кофеина	128 мг	Фиг. 5B
C	20:80	10 мг rHSA 10 мг кофеина	60 мг	Фиг. 5C
D	20:80	10 мг rHSA 10 мг кофеина	120 мг	Фиг. 5D
E	0:100	10 мг rHSA 10 мг кофеина	60 мг	Фиг. 5E

[445] Определение концентрации кофеина, присутствующего в различных точках отбора образцов во время контрольных экспериментов, показало, что это соединение не присутствовало в экспериментах по прохождению желудочно-кишечного тракта в фазе желудка, тонкой кишки и ободочной кишки. Следовательно, фоновая среда, использованная во время экспериментов с пятью составами, не могла мешать обнаружению кофеина, высвобождаемого из капсул.

[446] Капсула 1, имеющая толщину покрытия 60 мг на капсуле размера 1 и соотношение эудрагит® L30D55:FS30D, равное 50:50, оставалась полностью целой во время прохождения через искусственный желудок натощак, тем самым защищая API от условий низкого pH, имеющегося в фазе инкубации в желудке. Капсулы оставались визуально неповрежденными в течение первого часа инкубации в тонком кишечнике, в течение которого pH среды повышался с 5,5 до 6,5. Капсулы повреждались в течение

второго часа инкубации в тонком кишечнике, в течение которого pH увеличивался от значения 6,5 до значения 7,0. На Фиг. 5A представлено высвобождение кофеина из капсулы 1.

[447] Несмотря на визуальное повреждение капсулы, большая часть порошка осталась в капсулах, о чем свидетельствуют низкие количества кофеина, измеренные после 2 часов инкубации в тонком кишечнике. Капсулы еще более повреждались в течение третьего часа инкубации в тонком кишечнике (стабильный pH 7,0), что приводило к высвобождению большей части порошка внутри капсул, что было очевидно при количественном определении кофеина в этой точке отбора образцов. Во время инкубации в ободочной кишке количество кофеина оставалось довольно постоянным. Наблюдалось небольшое увеличение, в основном из-за неполного высвобождения кофеина из капсулы во время экспериментов повторности 2. Капсулы не были полностью разрушены в конце фазы инкубации в ободочной кишке, и визуальный осмотр капсул показал, что незначительная часть порошка все еще находилась внутри капсул. Это объясняет причину, по которой общая доза 10 мг кофеина, которая находилась в капсулах, почти полностью высвобождалась к концу инкубации в ободочной кишке. Таким образом, можно сделать вывод, что капсула 1 способствует целенаправленной доставке API на конечных стадиях инкубационной фазы тонкого кишечника, что соответствует терминальному отделу подвздошной кишки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

[448] Капсула 2, имеющая толщину покрытия 128 мг на капсуле размера 1 и соотношение эудрагит® L30D55:FS30D 50:50, оставалась полностью целой во время прохождения через желудок натощак (Фиг. 5B).

[449] Кроме того, по сравнению с капсулой 1 (такое же соотношение эудрагит®) увеличенная толщина покрытия капсулы 2 предотвратила повреждение капсулы во время прохождения через фазу инкубации в тонком кишечнике, где pH среды увеличивается со значения с 5,5 до 7,0.

[450] Попадание капсулы в среду ободочной кишки приводило к визуальному повреждению капсул через 1,5 часа инкубации, что приводило к небольшому высвобождению кофеина через 4 часа инкубации в ободочной кишке. Длительная инкубация в ободочной кишке вызывала дальнейшее повреждение капсул, что приводило к высвобождению большого количества кофеина в просвет ободочной кишки через 18 часов инкубации в ободочной кишке. На протяжении фазы инкубации в ободочной кишке pH среды регулировали на уровне выше 5,8. Таким образом, можно сделать вывод, что увеличенная толщина покрытия капсулы 2 привела к замедленному высвобождению кофеина по сравнению с капсулой 1. Капсулы не были полностью разрушены после прохождения через желудочно-кишечный тракт, что указывает на то, что один из полимеров капсулы не растворялся при значениях pH, которые имелись при прохождении через ЖКТ. Таким образом, можно сделать вывод, что капсула 2 способствует целенаправленной доставке API на конечных стадиях фазы инкубации в ободочной кишке, которая соответствует дистальному отделу ободочной кишки желудочно-

кишечного тракта.

[451] Капсула 3, имеющая толщину покрытия 60 мг на капсуле размера 1 и соотношение эудрагит® L30D55:FS30D 20:80, оставалась полностью целой во время прохождения через желудок натощак (Фиг. 5C). В то время как капсулы не становились визуально поврежденными во время прохождения через тонкую кишку, небольшие количества кофеина были обнаружены через 3 часа инкубации в тонкой кишке, что указывает на возникновение неопределяемых микроскопических повреждений капсул. Капсулы становились визуально поврежденными через 0,5 часа инкубации в ободочной кишке, что приводило к повышенному количеству кофеина, высвобождаемому из капсул после 4 часов инкубации в ободочной кишке. Количество кофеина, обнаруженное в среде ободочной кишки, дополнительно увеличивалось между 4 и 18 часами инкубации в ободочной кишке. Капсулы не разрушались полностью в конце прохождения через весь желудочно-кишечный тракт. Таким образом, сравнение данных, полученных в ходе экспериментов с капсулой 1 и 3, показало, что увеличение доли FS30D за счет L30D55 приводило к направленной доставке API в начале фазы инкубации в ободочной кишке, которая соответствует проксимальному отделу ободочной кишки желудочно-кишечного тракта

[452] Капсула 4, имеющая толщину покрытия 120 мг на капсуле размера 1 и соотношение эудрагит® L30D55:FS30D 20:80, оставалась визуально неповрежденной на протяжении всего прохождения желудочно-кишечного тракта (Фиг. 5D). Лишь в опытах 2 и 3 повторностей было обнаружено незначительное количество кофеина. Следовательно, увеличение толщины покрытия и соотношения FS30D за счет L30D55 предотвратило высвобождение API в верхнем отделе желудочно-кишечного тракта и проксимальном отделе ободочной кишки. Можно предположить, что содержимое будет высвобождаться в направлении дистального отдела ободочной кишки только при более длительном времени инкубации при повышении pH.

[453] Капсула 5, имеющая толщину покрытия 60 мг на капсуле размера 1 и соотношение эудрагит® L30D55:FS30D 0:100, становилась визуально поврежденной через 3 часа инкубации в тонком кишечнике, когда pH суспензии тонкого кишечника составляла 7 (Фиг. 5E). Однако почти весь порошок оставался внутри капсулы, о чем свидетельствует отсутствие измеримого количества кофеина в конце фазы инкубации в тонком кишечнике. При попадании в ободочную кишку капсулы не подвергались дальнейшему визуальному повреждению. Только во время повторения 3 эксперимента кофеин был обнаружен в достаточном количестве после 18 часов инкубации в ободочной кишке. Таким образом, можно сделать вывод, что исключение L30D55 из полимерной смеси капсулы привело к отсутствию направленной доставки API во время прохождения через верхний отдел ЖКТ и проксимальный отдел ободочной кишки. Можно предположить, что содержимое будет высвобождаться в направлении дистального отдела ободочной кишки только при более длительном времени инкубации при повышении pH.

[454] Заключение

[455] В ходе настоящего исследования оценивали распад пяти различных составов при прохождении через желудок, тонкую кишку и ободочную кишку. Растворение капсул тестировали с помощью визуальной оценки в определенные моменты времени и путем определения количества кофеина, высвобождаемого из капсул во время прохождения через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ).

[456] Все пять составов демонстрировали различные характеристики растворения, которые определялись толщиной их покрытия и соотношением эудрагит® L30D55:FS30D. Капсулы согласно настоящему исследованию с толщиной покрытия 60 мг способствовали направленной доставке API в конце инкубации в тонкой кишке или в начале инкубации в ободочной кишке, когда их соотношение эудрагит® L30D55:FS30D составляло 50:50 или 20: 80, соответственно. Увеличение толщины покрытия капсул с эудрагит® L30D55:FS30D в соотношении 50:50 с 60 мг до 128 мг привело к направленной доставке API на конечных этапах инкубации в проксимальных отделах ободочной кишки. В то время как капсулы 1, 2, 3 были способны обеспечить направленную доставку API, эти капсулы не растворялись полностью в конце прохождения через ЖКТ, что приводило к присутствию материала капсул на конечных стадиях инкубации в ободочной кишке. Капсулы 4 (толщина покрытия 120, соотношение эудрагит® L30D55:FS30D 20:80) и капсула 5 (толщина покрытия 60 мг и соотношение эудрагит® L30D55:FS30D 0:100) не распадались при прохождении через верхний отдел ЖКТ и проксимальный отдел ободочной кишки, что приводило к отсутствию направленной доставки API во время текущего эксперимента. Можно предположить, что содержимое будет высвобождаться в направлении дистального отдела ободочной кишки только при более длительном времени инкубации при повышении pH.

[457] Пример 7: Оценка кишечнорастворимого покрытия

[458] Композиция кишечнорастворимого покрытия была выбрана на основе экспериментов, проведенных на исследовательских партиях капсул с кишечнорастворимым покрытием. Композиция этих исследовательских партий приведена в Таблице 13. Капсулы HPMC размера 1 использовались для всех партий. Масса наполнения rHSA (рекомбинантный сывороточный альбумин человека) или порошка вещества составляла приблизительно 30 мг, поскольку содержание белка в каждом из них составляло приблизительно одну треть массы порошка. Композиции для покрытий включали смеси эудрагит® L30D55 с номинальным pH растворения >5,5 и эудрагит® FS30D с номинальным pH растворения >7 (информация о продукте Evonik GmbH). Высвобождение капсулы при значении pH приблизительно 6,5 было желательным для обеспечения адекватной защиты в тонкой кишке, в то же время допуская высвобождение целевой конструкции в кишечнике.

Таблица 13 - Композиции капсул для разработки лекарственных форм. Все партии были заполнены капсулами HPMC размера 1.

Композиция покрытия эудрагита	Целевая масса Кишечнорастворимого	Содержание Капсулы

(соотношение L30D55:FS30D)	покрытия (мг)	
50:50 30:70 20:80 0:100	60 120 180	Кофеин (10 мг), rHSA (10 мг) Кофеин (10 мг), конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) (10 мг)

[459] Оценку покрытия проводили в двух исследованиях с несколькими партиями капсул с покрытием.

[460] Для первого исследования было приготовлено двенадцать партий капсул, содержащих кофеин и рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин (rHSA), включающих сочетания четырех различных композиций покрытия и трех разных толщин покрытия. Композиции покрытия содержали соотношения эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D от 50:50 до 0:100 по массе.

[461] Кофеин был включен в это исследование в качестве легко обнаруживаемого маркера высвобождения из капсулы. rHSA считался подходящим суррогатным белком для целевой конструкции в этом исследовании, поскольку он был приготовлен в виде лиофилизированной композиции с использованием того же буфера для лиофилизации, что и для лекарственного вещества целевой конструкции, приблизительно при том же содержании белка, что и лекарственное вещество целевой конструкции и сопоставимой физической форме лиофилизированной композиции.

[462] Для второго исследования были приготовлены три партии капсул, содержащих кофеин и целевую конструкцию, с толщиной покрытия трех разных размеров лекарственной формы с покрытием, содержащей равные количества эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D.

[463] Капсулы из каждой исследовательской партии помещали в перемешиваемый раствор 0,1 N HCl по меньшей мере на 60 мин с последующим переносом в буферные растворы с заданными более высокими значениями pH. Эти условия были предназначены для имитации воздействия кислой среды желудка с последующим приблизительно нейтральным pH при прохождении в кишечник. В каждом эксперименте периодически отбирали образец супернатанта и тестировали на концентрацию содержимого капсулы, выделившегося из капсулы в раствор.

[464] Результаты этих экспериментов приведены ниже. Ни в одном случае содержимое капсул с кишечнорастворимым покрытием не высвобождалось в течение 1 часовой фазы инкубации в 0,1 N HCl. Таким образом, данные, представленные в Таблицах, отражают высвобождение только во время фазы инкубации в буфере. Как и ожидалось, все тестируемые покрытия демонстрируют защиту от кислой среды в тонкой кишке.

[465] Первое исследование: выбор композиции покрытия

[466] Композицию кишечнорастворимого покрытия выбирали в ходе первоначального исследования с использованием капсул, содержащих кофеин в качестве

маркера высвобождения, и rHSA в качестве заменителя белка для целевой конструкции. Соотношение эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D меняли от 50:50 до 0:100, чтобы исследовать влияние композиции покрытия на высвобождение из капсулы в зависимости от pH раствора.

[467] В Таблицах 14-17 показано поведение 12 наборов капсул с покрытием, содержащих кофеин и rHSA, в буфере с pH 7,0. Значения кофеина и rHSA были нормализованы до 100% для капсул, достигающих максимального высвобождения, в противном случае данные не корректировали. Кинетика высвобождения кофеина и rHSA менялась в зависимости от массы и композиции покрытия капсулы, хотя высвобождение обоих соединений было сопоставимо для каждой отдельной партии капсул. Таким образом, кофеин (малая молекула) и rHSA (белок) дали аналогичную информацию о высвобожденииз капсулы в этих условиях.

Таблица 14 - Процентное высвобождения кофеина и rHSA из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении 50:50, PH буфера 7,0

	Высвобождение кофеина за указанное время						высвобождение rHSA за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
60	6	84	87	87	88	90	41	97	97	100	97	98
125	2	6	77	95	98	100	0	5	94	97	98	100
180	1	2	3	56	97	100	0	0	4	53	100	100

Таблица 15 - Процентное высвобождения кофеина и rHSA из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении 30:70, PH буфера 7,0

	Высвобождение кофеина за указанное время						высвобождение rHSA за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
61	15	95	96	98	99	100	24	98	98	98	98	100
118	1	4	82	91	95	100	0	3	92	95	98	100
182	0	1	3	55	93	100	0	0	0	74	94	100

Таблица 16 - Процентное высвобождение кофеина и rHSA из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении20:80, PH буфера 7,0

	Высвобождение кофеина за указанное время						Высвобождение rHSA за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
56	5	87	97	97	100	98	7	96	98	97	99	100
120	1	2	7	78	95	100	0	0	2	89	98	100
177	1	1	1	5	56	100	0	0	0	2	87	100

Таблица 17 - Процентное высвобождения кофеина и rHSA из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении0:100, PH буфера 7,0

	Высвобождение кофеина за указанное время						высвобождение rHSA за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
59	1	19	93	97	99	100	0	50	97	98	98	100
120	1	1	3	23	83	100	0	0	0	0	94	100
181	1	2	2	ND	2	18	0	0	0	0	0	45

[468] Для этих партий капсул большая общая масса кишечнорастворимого покрытия коррелировала с более медленным началом высвобождения кофеина и rHSA в буфере с pH 7,0 и более длительным временем достижения полного высвобождения. Менее значительная корреляция наблюдалась между высвобождением в буфере с pH 7,0 и композицией покрытия. Почти все капсулы полностью высвобождали свое содержимое в буфере с pH 7,0 в ходе испытаний, за исключением капсул, покрытых FS30D и L30D55 в соотношении 100:0, продемонстрировавших отсроченное начало высвобождения и неполное высвобождение при большей массе покрытия.

[469] В Таблицах 18-19 приведено поведение тех же капсул в буферах с pH 6,5 и pH 6,0. Представлены только значения rHSA, поскольку кинетика высвобождения кофеина и rHSA снова были сопоставимы для каждой капсулы. Значения rHSA были нормализованы до 100% для капсул, достигающих максимального высвобождения, в противном случае данные не корректировались. Масса покрытия, показанная в Таблицах 18-19, представляла собой заданную массу покрытия, но фактическая масса покрытия отличалась от заданной массы покрытия не более чем на 5 мг.

Таблица 18 - Высвобождение rHSA из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в разных соотношениях, PH буфера 6,5

	Высвобождение rHSA из капсул с указанной композицией покрытия за указанное время																	
Композиция Покрытия	50:50 FS30D/L30D55						70:50 FS30D/L30D55						80:50 FS30D/L30D55					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
60	11	93	96	98	99	100	8	78	95	97	98	100	0	17	64	77	82	92
120	0	2	13	94	98	100	0	7	36	64	92	100	0	0	0	0	12	42
180	0	0	2	3	94	100	0	0	0	4	43	85	0	0	0	0	1	10

Таблица 19 - Высвобождение rHSA из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в разных соотношениях, PH буфера 6,0

	Высвобождение rHSA из капсул с указанной композицией покрытия за указанное время																	
Композиция Покрытия	50:50 FS30D/L30D55						70:30 FS30D/L30D55						80:20 FS30D/L30D55					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
60	12	79	97	98	100	100	4	30	43	58	62	67	0	0	29	39	52	100
120	0	6	21	23	83	98	0	0	0	0	39	72	0	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	6	30	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0

[470] В любом буферном состоянии наблюдалась четкая тенденция в кинетике высвобождения по отношению к массе покрытия, при этом увеличение общей массы кишечнорастворимого покрытия коррелировало с более медленным началом высвобождения rHSA и более длительным временем для достижения полного высвобождения. При pH 6,5 и pH 6,0 также была очевидна тенденция изменения композиции покрытия. Покрытия, содержащие большее количество эудрагит® FS30D, демонстрировали отсроченное начало высвобождения при более низком pH буфера, и в этих случаях наблюдалось неполное высвобождение или отсутствие высвобождения при большей массе покрытия. Никакого высвобождения не наблюдалось ни для одной капсулы, покрытой FS30D и L30D55 в соотношении 100:0 в этих условиях при pH 6,5 или

6,0.

[471] Таким образом, высвобождение rHSA зависело как от массы, так и от композиции кишечнорастворимого покрытия. Масса покрытия 60 мг с композицией эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении 50:50 обеспечивала наиболее быстрое высвобождение капсул, протестированных в этих условиях.

[472] Второе исследование: выбор массы покрытия

[473] Оценка массы покрытия была продолжена во втором исследовании с капсулами, содержащими целевые конструкции.

[474] В Таблицах 20-22 показано поведение трех партий капсул, содержащих кофеин и целевые конструкции, с различной массой покрытия из полимеров эудрагит® L30D55 и FS30D в соотношении 50:50. Исследовали высвобождение кофеина и целевых конструкций в буферах с pH 7,0, pH 6,5 и pH 6,0. Эти капсулы предварительно инкубировали в 0,1 N HCl в течение 1 ч, и ни в одном случае не было обнаружено высвобождения кофеина или целевой конструкции. Значения кофеина и целевой конструкции были нормализованы до 100% для капсул, достигающих максимального высвобождения, в противном случае данные не корректировали. ND означает, что точка данных не может быть определена из-за потери образца.

Таблица 20 - Высвобождение кофеина и целевых конструкций из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении 50:50, pH буфера 7,0

	Высвобождение кофеина за указанное время						Высвобождение AMT-101 за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
60	13	100	97	97	98	100	8	81	81	81	78	75
128	0	3	60	95	98	100	0	0	60	81	81	ND
178	0	1	3	5	76	100	0	0	6	6	45	39

Таблица 21 - Высвобождение кофеина и целевых конструкций из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении 50:50, pH буфера 6,5

	Высвобождение кофеина за указанное время						Высвобождение AMT-101 за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
60	5	22	97	98	98	100	0	60	72	72	73	70
128	0	1	6	36	81	100	0	0	0	32	41	39
178	0	0	0	2	11	37	0	0	0	0	0	5

Таблица 22 - Высвобождение кофеина и целевых конструкций из капсул, покрытых эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D в соотношении 50:50, PH буфера 6,0

	Высвобождение кофеина за указанное время						Высвобождение AMT-101 за указанное время					
Масса покрытия (мг)	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч	8 ч
60	3	16	56	88	98	100	7	13	18	18	17	17
128	0	0	3	8	51	88	0	0	0	0	6	6
178	0	0	0	2	11	34	0	0	0	0	0	0

[475] Время до начала высвобождения кофеина и целевых конструкций было сопоставимо для каждой капсулы. Как было показано ранее для капсул rHSA, наблюдалась четкая тенденция кинетики высвобождения в зависимости от массы покрытия, при этом увеличение общей массы кишечнорастворимого покрытия коррелировало с более поздним началом высвобождения кофеина и целевых конструкций и более длительным временем достижения полного высвобождения. В целом высвобождение целевых конструкций достигало более низких концентраций, чем рассчитано на основе массы наполнения капсулы. Более высокие концентрации целевых конструкций, как правило, достигались для капсул с более ранним временем начала высвобождения. Причина более низкого, чем ожидалось, высвобождения целевых конструкций будет исследована в будущих исследованиях. На этой ранней стадии разработки были выбраны быстро высвобождающиеся композиции покрытия, чтобы свести к минимуму потенциальную потерю целевых конструкций во время высвобождения капсулы.

[476] Выбор кишечнорастворимого покрытия

[477] на основании исследований капсул для клинического применения была выбрана композиция покрытия, содержащая смесь 50:50 полимеров эудрагит® L30D55 и FS30D. Масса целевого покрытия 60 мг на капсуле размера 1 была выбрана для обеспечения защиты от растворения в желудочном соке, но высвобождения содержимого капсулы при достижении среды с нейтральным pH. Масса покрытия 60 мг на капсуле размера 1 обеспечивает толщину покрытия, эквивалентную толщине покрытия 75 мг для капсулы размера 0, выбранной для клинических проявлений.

[478] Пример 8: Данные растворения in vitro

[479] Восемь составов покрытия капсул (составы A-H в Таблице 23) тестировали на скорость растворения in vitro при разных pH. В первый час проходила кислотная стадия, когда капсула подвергалась воздействию растворяющей среды, содержащей 0,1 М соляной кислоты при pH 1,0. Оставшиеся часы проводили на стадии буфера, где капсула подвергалась воздействию растворяющей среды, содержащей цитратно-фосфатный буфер с pH 7,0, 6,5 или 6,0. Каждую капсулу удаляли пластиковым шпателем при смене среды.

Капсулы помещали в стеклянный химический стакан на 150 мл при перемешивании мешалкой со скоростью 100 об/мин и нагревателе, установленном на 37°C. Процент высвобождения кофеина определяли путем измерения УФ-поглощения. Процентное высвобождение конструкции доставки IL-10 определяли с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (Таблица 24), и димерную форму определяли в виде одиночного пика. Зарегистрированные значения определяли по стандартной кривой соответствующего аналита. Во время SE-HPLC для определения молекулярной массы элюированных пиков используют детектирование по многоугловому рассеянию света (MALS) в сочетании с детектированием по УФ-поглощению и показателю преломления (RI). Детекцию проводили по поглощению при 280 нм.

[480] Капсулы, покрытые эудрагитом, подвергали растворению на стадии кислоты в течение 1 часа, а затем растворению на стадии буфера. Капсулу без покрытия эудрагитом (только с покрытием HPMC) тестировали только на стадии буфера. Среду для растворения перемешивали при 100 об/мин на протяжении всего анализа. Аликвоты по 500 мкл образцов собирали в конце стадии кислоты, через 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч стадии буфера в фильтры центрифужных пробирок Spin-X из ацетата целлюлозы 0,22 мкм (Costar Cat № 8161). Центрифугирование проводили при 15000 x g в течение 2 мин. Затем аликвоты образцов объемом 150 мкл переносили во флаконы для HPLC и анализировали с помощью сначала SEC, а затем RP хроматографии.

Таблица 23 - Состав капсул, исследованных на растворение in vitro содержимого капсул

Идентификатор Состава	Количество Целевой конструкции (мг) на капсулу	Количество Кофеина (мг) на капсулу	Покрытие Капсулы HPMC (мг)	Композиция Эудрагита® (L30D55/FS30D)	Увеличение массы покрытия Эудрагита®	Описание
A	10	10	10	50/50	60	Эталонная композиция
B	10	10	10	50/50	30	Тонкое покрытие Эудрагита® 50/50
C	10	10	10	30/70	30	Тонкое покрытие Эудрагита

						® 30/70
D	10	10	10	30/70	60	Стандарт 30/70
E	10	10	10	30/70	90	Стандарт 30/70
F	10	10	10	30/70	120	Толстое покрытие 30/70
G	10	10	60	50/50	30	Увеличение HPMC
H	10	10	180	50/50	30	Толстое покрытие HPMC

Таблица 24 - Способ SE-HPLC

Система	Система UHPLC Vanquish C Детектором PDA
Колонка	Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200Å 1,7 мкм, 4,6×150 мМ Часть No: 186005225
Температура Колонки	25°C
Температура автоматического пробозаборника	4°C
Подвижная Фаза	100 мМ фосфата натрия, 150 мМ Хлорида натрия, pH 7,0±0,1
Режим разделения	Изократный
Скорость потока	0,3 мл/мин
Общее время записи	10 мин
Длина волны детектирования	215 нм, 280 нм
Объем Инъекции	100 мкл (или колеблется)

[481] Процентное содержание кофеина, высвобождаемого при pH 7,0, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 6A), состава C-F для капсул (Фиг. 6B) и состава G-H для капсул (Фиг. 6C). Процентное значение кофеина, высвобождаемого при pH 6,5, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 7A), состава C-F для капсул (Фиг. 7B) и состава G-H для капсул (Фиг. 7C). Процентное значение кофеина, высвобождаемого при pH 6,0, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 8A), состава C-F для капсул (Фиг. 8B) и состава G-H для капсул (Фиг. 8C).

[482] Процентное содержание целевой конструкции, высвобождаемой при pH 7,0,

измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 9A), состава C-F для капсул (Фиг. 9B) и состава G-H для капсул (Фиг. 9C). Процентное содержание целевых конструкций, высвобождаемых при pH 6,5, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 10A), состава C-F для капсул (Фиг. 10B) и состава G-H для капсул (Фиг. 10C). Процентное содержание целевых конструкций, высвобождаемых при pH 6,0 измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 11A), состава C-F для капсул (Фиг. 11B) и состава G-H для капсул (Фиг. 11C).

[483] Также определяли процентное содержание целевых конструкций, высвобождаемых в форме димера. Процентное содержание целевых конструкций, высвобождаемых в форме димера при pH 7,0, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 12A), состава C-F для капсул (Фиг. 12B) и состава G-H для капсул (Фиг. 12C). Процентное содержание целевых конструкций, высвобождаемых в форме димера при pH 6,5, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 13A), состава C-F для капсул (Фиг. 13B) и состава G-H для капсул (Фиг. 13C). Процентное содержание целевых конструкций, высвобождаемых в форме димера при pH 6,0, измеряли для каждого состава A-B для капсул (Фиг. 14A), состава C-F для капсул (Фиг. 14B) и состава G-H для капсул (Фиг. 14C).

[484] Пример 9: Исследование покрытия капсул у яванских макаков

[485] Восемь составов покрытия капсул (составы A-H в Таблице 25) тестировали на самцах яванских макаков. Капсулы вводили в виде однократной дозы по 2 капсулы на животное и вводили перорально с помощью пистолета для капсул. Образцы плазмы брали через 8 часов после введения капсул и анализировали на IL-10 (Фиг. 15A, 16A и 17A), кофеин (Фиг. 15B, 16B и 17B) и антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) (Фиг. 15C, 16C и 17C).

Таблица 25 - Состав капсул, вводимых яванским макакам

Идентификатор Состава	Количество Целевой конструкции (мг) на капсулу	Количество Кофеина (мг) на капсулу	Покрытие Капсулы HPMC (мг)	Композиция Эудрагита® (L30D55/FS30D)	Увеличение массы покрытия Эудрагита®	Описание	Количество капсул на животное	N
A	10	10	10	50/50	62	Эталонная композиция	2	3
B	10	10	10	50/50	31	Тонкое покрыти	2	3

						е Эудраги та® 50/50 Тонкое покрыти е		
C	10	10	10	30/70	31	Эудраги та® 30/70	2	3
D	10	10	10	30/70	62	Стандар т 30/70	2	3
E	10	10	10	30/70	92	Стандар т 30/70	2	3
F	10	10	10	30/70	123	Толстое покрыти е 30/70	2	3
G	10	10	60	50/50	31	Увеличе ние HPMC	2	3
H	10	10	180	50/50	31	Толстое покрыти е HPMC	2	3

[486] Устойчивый сигнал кофеина указывал на поведение при открытии капсулы. Время открытия капсулы и кинетика (кофеина) хорошо коррелируют с данными о растворении in vitro. Более тонкие покрытия показали наиболее быстрое открытие (покрытие 30 мг эудрагитаа® L30D55/FS30D 50/50 и эудрагита® L30D55/FS30D 30/70). Системные уровни IL-10 и IL-1RA были повышены для некоторых составов. Временной ход сигналов фармакокинетики и биомаркеров хорошо коррелировал с данными о времени высвобождения кофеина. Более тонкие покрытия показали наиболее значительное повышение системных IL-10 и IL-1RA (покрытие 30 мг эудрагита® L30D55/FS30D 50/50 и эудрагита® L30D55/FS30D 30/70).

[487] Пример 10: Разработка порошка с улучшенными характеристиками

[488] Составы лиофилизированных композиций низкой плотности могут иметь плохие характеристики текучести. Цель состояла в том, чтобы разработать состав лиофилизированной композиции с повышенной плотностью и улучшенными свойствами текучести. Лиофилизированную композицию смешивали с вспомогательными средствами

для улучшения наполнения капсулы или получения возможности приготовления таблетки.

[489] Рекомбинантный человеческий сывороточный альбумин (rHSA) использовали в качестве суррогатного белка для наполнения. Лиофилизированный rHSA (лио-rHSA) был получен с использованием того же процесса, композиции и плотности, что и лиофилизированные целевые конструкции, с целевым содержанием 20 мг API на капсулу (эквивалентно 56 мг лиофилизированной композиции).

[490] Систему наполнения капсул Profill использовали для получения семи различных смесей (Таблица 26), включая лиофилизированное лекарственное вещество (содержащее только лиофилизированный rHSA), а также лиофилизированное лекарственное вещество в дополнение к другим вспомогательным средствам, таким как глицин и сахароза.

Таблица 26 - Смеси Profill

Смесь	Целевая Масса заполнения (мг)	Целевая Масса Заполненной капсулы (мг)	Допустимый % Капсул ± 5%	Допустимый % Капсул ± 7,5%
100% lyo-rHSA	56,4	118,0	53	82
95% lyo-rHSA, 5% Глицин	59,4	121,0	65	78
90% lyo-rHSA, 10% Глицин	62,6	124,4	45	63
80% lyo-rHSA, 20% Глицин	70,4	132,0	29	42
95% lyo-rHSA, 5% 2:1 Сахароза:Глицин	59,4	121,0	61	75
90% lyo-rHSA, 10% 2:1 Сахароза:Глицин	62,8	124,4	57	66
80% lyo-rHSA, 10% 2:1 Сахароза:Глицин	70,4	132,0	55	69

[491] В заключение, систему ProFill можно использовать для заполнения капсул порошком, таким как лиофилизированная конструкция доставки IL-10. Можно также сделать вывод, что добавление вспомогательных веществ не было необходимым для достижения наполнения порошка с помощью ProFill. Кроме того, порошок из капсул, вес которых не соответствует установленным требованиям, можно восстановить и переработать.

[492] Пример 11: Скрининг совместимости целевой конструкции и уплотняющих вспомогательных средств

[493] Совместимость различных вспомогательных средств для таблеток с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) оценивали в сухом (порошковом) состоянии.

[494] Конструкцию доставки IL-10 в сухом состоянии (лекарственное вещество конструкции доставки IL-10 или DS), разработанную с использованием буфера для

лекарственной формы, ранее определенного как обладающего наилучшей общей стабильностью (10 мМ фосфата калия, 2% глицина, 1% сахарозы, 0,3% полоксамера 188 при pH 7,5), как описано в примере 5), смешивали с каждым отдельным вспомогательным средством, затем инкубировали, оставляя при 40°C в течение 72 часов перед анализом. Композиция и аналитическая сводка каждого образца описаны в Таблице 27. Конструкция доставки IL-10 DS и вспомогательное средство (равная масса каждого, соотношение API: вспомогательное средство 1:3) помещали в закрытый флакон из боросиликатного стекла емкостью 4 мл и смешивали, используя систему TURBULA® в течение 2 минут, затем образцы инкубировали, оставляя при 40°C в течение 72 часов в закрытом флаконе из боросиликатного стекла емкостью 4 мл. Порошковую смесь затем восстанавливали с помощью PBS до 0,5 мг/мл раствора конструкции доставки IL-10. Затем образцы пропускали через фильтр 0,2 мкм перед анализом SEC (Фиг. 18). Несовместимости с целевыми конструкциями в порошкообразном состоянии не наблюдалось.

Таблица 27 - Композиция и анализ SEC перемешанных всухую порошков конструкция доставки IL-10/вспомогательное средство

Композиция					Анализ SEC		
Образец #	Вспомогательное средство	Степень	Масса (мг)	API масса (мг)	HMW	Димер	Мономер
1	только DS	NA	0	12	10,1	81,5	7,1
2	Силикатированная микрокристаллическая целлюлоза	Просолв SMCC 90	36	12	11,7	82,4	5,9
3	Кросповидон	Коллидон CL	36	12	11,7	80,3	8
4	Лактозы моногидрат	Лигамед	36	12	12,2	81,2	6,7
5	МСС	ВИВАПУР	36	12	12,7	81,0	6,2
6	Бегенат глицерина	КОМПРИТОЛ	36	12	12,3	80,1	7,6
7	Стеарат магния	Лигамед	36	12	11,5	79,2	9,3
8	Кроскармеллоза натрия	VIVASOL GF	36	12	12,9	79,2	7,8
9	Крахмал	Aldrich	36	12	12,5	80,8	6,7

[495] Для изготовления таблеток материал подвергали процессам уплотнения и прессования. Для белкового препарата с потенциально чувствительной третичной и четвертичной структурой эти механические напряжения требуют исследования сохранения целостности белка.

[496] Совместимость конструкции доставки IL-10 оценивали для начальных этапов формирования таблетки. Провели процессы смешивания и прессования. Провели как

валковое уплотнение, так и комкование с последующим измельчением в гранулы в каждом случае. Композиция каждого состава показана в Таблице 28. Для изучения функциональности и совместимости вспомогательных средств в три состава были включены разные вспомогательные средства.

Таблица 28 - Композиции первоначальных составов для прессования/гранулирования; IG=внутригранулярная композиция; EG=внегранулярная композиция. % значения представлены в виде м/м и являются номинальными значениями (не скорректированными по содержанию белка)

	Композиция F1			Композиция F2			Композиция для Комкования/гранулирования		
Компонент	Идентичность	IG (%)	EG (%)	Идентичность	IG (%)	EG (%)	Идентичность	IG (%)	EG (%)
Активный ингредиент	SEQ ID NO: 5	8,00	-	SEQ ID NO: 5	8,00	-	SEQ ID NO: 5	17,31	-
Объемообразующее средство	SMCC	68,00	18,35	DCP/MCC	68,00	18,35	Сахароза	72,32	-
Разрыхлитель	Кросповидон	3,00	1,00	Кроскармеллоза натрия	3,00	1,00	Кросповидон	3,24	1,94
Смазывающее вещество	Стеарат Mg	1,00	0,25	Стеарат Mg	1,00	0,25	Бегенат глицерина	3,24	1,94

[497] Результаты 2 составов предварительной смеси (F1 и F2) показаны в Таблице 29. Валковое прессование проводили при 2 усилиях, и полученные ленты гранулировали по отдельности. Материалы восстанавливали в PBS при 0,65 мг/мл SEQ ID NO: 5 и фильтровали с помощью фильтра 0,2 мкм (Advantec) перед анализом SEC. Образцы также инкубировали при 40°C в течение двух недель перед восстановлением и анализом.

Таблица 29 - Чистота димеров конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) во время процесса грануляции для композиций F1 и F2; Валковое уплотнение при 2 усилиях на малогабаритном устройстве. Гранулирование через скрининг 1,2 мкм.

	Комнатная температура (RT) Чистота димера		40°C Чистота димера	
Промежуточный продукт	F1	F2	F1	F2
Лекарственное вещество (DS)	75,9		78,6	
Предварительная смесь	75,1	73,7	77,3	76,3

Лента (низкое усилие)	72,5	74,4	76,1	74,5
Лента (высокое усилие)	71,6	71,1	73,7	72,6
Гранула (низкое усилие)	74,3	74,6	74,5	72,6
Гранула (высокое усилие)	74,5	73,8	71,9	72,4

[498] Данные по чистоте димеров промежуточных продуктов F1 и F2 показали небольшую разницу в результате этих этапов обработки, а значения после инкубации при 40°C были аналогичны исходным образцам. Тем не менее, каждый промежуточный продукт процесса показал несколько сниженную чистоту димера по сравнению с лекарственным веществом.

[499] Такой же анализ проводили для промежуточных продуктов, образующихся в процессе комкования/грануляции (Таблица 30). Помимо иного метода уплотнения, партия комкования/гранулирования отличалась композицией связующего вещества и смазывающего вещества. Чистота димера образца демонстрировала небольшое отличие или отсутствие отличия между обрабатываемыми образцами, и было лишь небольшое снижение чистоты димера по сравнению с лекарственным веществом. Это свидетельствует о том, что композиция и процесс комкования/грануляции образцов сохраняли целостность конструкции доставки IL-10.

Таблица 30 - Чистота димеров конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) во время процесса грануляции для комкования/гранулирования лекарственных форм

Промежуточный Продукт	Лекарственное вещество (DS)	Фильтрованное DS	Предварительно смешанная Смесь	Конечная Смесь	Комок	Гранула
Чистота	81,2	79,5	79,4	80,4	79,3	78,9

[500] Выбранные промежуточные образцы процесса подвергали оценке стабильности после восстановления в PBS (Фиг. 95). Раствор конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) был стабилен при комнатной температуре в ходе эксперимента, но демонстрировал значительную деградацию при хранении при 37°C. Большинство образцов показали сравнимую стабильность в растворе с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) с DS, но смеси F1 и F2 показали более быструю деградацию по сравнению с образцами, полученными в процессе комкования/грануляции.

[501] эти результаты свидетельствуют о том, что компоненты составов F1 и F2 были менее совместимы с SEQ ID NO: 5 или что процесс уплотнения может влиять на конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[502] Чтобы определить, присутствуют ли в композиции F1/F2 вредные компоненты, отдельные вспомогательные средства оценивали на совместимость с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в растворе. DS и одно вспомогательное средство суспендировали в PBS в концентрации 0,3 мг/мл конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Образцы инкубировали при 37°C при встряхивании в течение 5 ч, при

этом образцы периодически отбирали для анализа SEC. Результаты показаны На Фиг. 96.

[503] В большинстве образцов наблюдалась деградация, сравнимая с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) DS, но присутствие стеарата магния, используемого в качестве смазывающего вещества в композициях F1/F2, вызывало значительное увеличение скорости деградации конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Примечательно, что дибегенат глицерина не оказывал неблагоприятного воздействия на чистоту димера конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[504] Стеарат магния обладает свойствами, подобными ионному поверхностно-активному веществу, тогда как бегенат глицерина является неионным поверхностно-активным веществом. Чтобы дополнительно охарактеризовать совместимость смазочных веществ, был оценен ряд дополнительных смазочных веществ-кандидатов. Результаты показаны На Фиг. 97.

[505] Стеарилфумарат натрия, соль жирной кислоты, родственная стеарату магния, вызывала слегка ускоренную деградацию конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Лаурисульфат натрия с сильноанионной сульфатной группой разрушал конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) сразу после смешивания.

[506] Пример 12: Скрининг сил сжатия для разработки таблеток

[507] Для создания таблеток F1 (Таблица 31) и таблеток F2 (Таблица 32) использовали различные силы сжатия. Также после прессования в таблетку проверяли чистоту димера целевой конструкции. Белок целевой конструкции был устойчив к прессованию и грануляции, хотя в конечной форме таблетки наблюдалась некоторая агрегация (Фиг. 19). Также после растворения различных таблеток при pH 7,0 оценивали восстановление димера (Фиг. 20A-20D).

Таблица 31 - Свойства таблетки F1

Продукт	сила сжатия, lb.f	Толщина, мм.	Скрининг хрупкости (n=1), % (±0,5%)	Твердость, kp	Распадаемость (фрагмент), 37°C
конструкция доставка IL-10 (SEQ ID NO: 5), таблетки F-1 из конечной смеси партия #44A	2000	4,04	0,0	18,4	2 мин 45 сек: набухание + эрозия 10мин: первоначально небольшое набухание, затем медленная эрозия
	2,500	3,88	0,0	25,0	
	3000	3,83	0,0	26,5	14 мин. 30 сек:

					медленная эрозия
	3,500	3,80	0,0	27,1	16мин: медленная эрозия

Таблица 32 - Свойства таблетки F2

Продукт	Сила сжатия, Ib.f	Толщина, мМ	Скрининг хрупкости (n=1), % (±0,5%)	Твердость, kp	Распадаемость (фрагмент), 37°C
конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), таблетки F-2 Из конечной смеси партия #46A	2000	3,74	0,0	14,4	1 мин 10 сек: быстрое разрушение на мелкие частицы
	2,500	3,61	0,0	16,2	10 мин: небольшое набухание 3 мин:эрозия
	3000	3,49	0,0	20,4	5 мин 30 сек: медленная эрозия
	3,500	3,49	0,0	20,4	7 мин: медленная эрозия

[508] Была изготовлена дополнительная таблетка (F3), которая была аналогична таблетке F1, но с дибегенатом глицерина вместо стеарата магния (Таблица 33). Данная замена произведена из-за несовместимости стеарата магния при растворении целевых конструкций в растворе.

Таблица 33 - Композиция F3 таблетки F3

Фаза	Составная часть	Степень	Доля, %	Масса на таблетку, мг	Количество в г, для партии 15 г
IG	конструкция доставки IL-10	n/a			
	SMCC	Просолв SMCC 90	80,00%	16 136 6 2	1,2000
	Кросповидон	Коллидон CL	68,000%		10,2000
	Дибегенат глицерина	Компритол 888 ATO	3,000%		0,4500
			1,000%		0,1500

EG	SMCC Кросповидон Дибегенат глицерина	Просолв SMCC 90 Коллидон CL Компритол 888 ATO		18,750% 1,000% 0,250%	37,5 2 0,5	2,8125 0,1500 0,0375
	Общая масса сердцевины			100,000%	200	15,0000

[509] Пример 13: Оценка эффективности in vivo пероральных лекарственных форм в виде капсул с покрытием у здоровых субъектов

[510] Основными задачами исследования являются: оценка эффективности in vivo однократных пероральных доз лекарственных форм в виде капсул с покрытием с использованием сцинтиграфических методов и сравнение эффективности in vivo однократных пероральных доз выбранной лекарственной формы в виде капсулы с покрытием у пациентов после еды и натощак с помощью сцинтиграфических методов. Дополнительной задачей исследования является: предоставление информации о безопасности лекарственных форм в виде капсул с покрытием после перорального приема. Исследовательской задачей исследования является: сбор профилей pH, температуры и давления натощак для каждого субъекта исследования, когда SmartPill® проходит через кишечник.

[511] Дизайн Исследования

[512] это было одноцентровое, открытое, нерандомизированное, последовательное сцинтиграфическое исследование с однократной дозой в течение четырех периодов у здоровых субъектов. Была набрана одна когорта из 12 субъектов. Каждый субъект получал схемы, указанные в Таблице 34. Составы покрытия капсул, нанесенные на капсулы размера 0, описаны в Таблице 35, и по прогнозу высвобождение конструкции доставки IL-10 происходит в подвздошной кишке, проксимальном отделе ободочной кишки (позже +1) или дистальном отделе ободочной кишки (позже+2). Пероральные лекарственные формы в виде капсул с покрытием поставлялись в виде капсул размера 0 с кишечнорастворимым покрытием, предназначенных для перорального приема. В этом исследовании изучались составы покрытия капсул, а не конструкция доставки IL-10 SEQ ID NO: 5. Капсула в этом исследовании не содержала никакого активного ингредиента. Минимальный период вымывания между дозами составлял 3 дня. После периода 3 был период промежуточного анализа и обзора данных безопасности и сцинтиграфии из предыдущих периодов, чтобы определить, какой состав покрытия капсул следует выбрать для приема после еды в период 4.

Таблица 34 - Схема, приеняемая для здоровых пациентов

Период	*Схема*	*Доза Тестируемого Продукта (TP)*

1	A	*Капсула с покрытием составом 1, с радиометкой нМТ 1* MBq ^{111}In, *в состоянии натощак*
2	B	*Капсула с покрытием составом 2, с радиометкой нМТ 1* MBq ^{111}In, *в состоянии натощак*
3	C	*Капсула с покрытием составом 3, с радиометкой нМТ 1* MBq ^{111}In, *в состоянии натощак*
4	D	*Капсулы с покрытием составом 1, 2 или 3, с радиометкой нМТ 1* MBq ^{111}In, *в состоянии после еды*

^{111}In: индий-111; нМТ: не более; MBq: мегабеккерель

Таблица 35 -Составы покрытия для сцинтиграфического исследования

Количество	Композиция кишечнорастворимого покрытия (L30D55/FS30D)	Толщина кишечнорастворимого покрытия (мг)	Толщина HPMC (мг)	Прогнозируемое Высвобождение
1	50/50	75	10	подвздошная кишка
2	30/70	75	10	Позже +1
3	20/80	40	10	Позже +2

[513] Субъектов проверяли на соответствие требованиям для участия в исследовании за 28 дней до приема дозы в период 1. Для каждого периода лечения подходящих субъектов помещали в клиническое отделение вечером за день до приема дозы (1 день). Субъекты получали лекарственные формы утром в 1 день после ночного периода без приема пищи в течение как минимум 10 часов (схемы A, B и C) или после завтрака с высоким содержанием жиров (схема D). Введение осуществляли в 1 день с соответствующим интервалом между субъектами, исходя из требований сцинтиграфического изображения (например приблизительно 10 мин). Время начала было определено исходя из логистики. Субъекты оставались в клиническом отделении до 24 часов после приема дозы. Во время каждого режима натощак 4 субъекта получали капсулу SmartPill® сразу после введения пероральной капсулы. Каждый субъект получал SmartPill только по одной схеме; субъекты с 001 по 004 получали SmartPill® по схеме A, субъекты с 005 по 008 получали SmartPill® по схеме B, а субъекты с 009 по 012 получали SmartPill® по схеме C. Если данные все еще продолжали собирать из SmartPill®, находившейся на месте, субъект не получал дозу при следующем приеме лекарства. Минимальный период вымывания между каждым введением продукта составлял 3 дня. Во все периоды с каждым меченым радиоактивным изотопом тестируемым продуктом (TP) давали напиток 99mTc-DTPA, чтобы получить схему желудочно-кишечного тракта, чтобы сделать возможным сцинтиграфический анализ. Телефонный звонок с целью

последующего наблюдения делали через 5-7 дней после последней дозы, чтобы убедиться в благополучии субъектов.

[514] Гамма-сцинтиграфия

[515] Для всех схем передние двойные изотопные изображения продолжительностью приблизительно 50 секунд собирали с регулярными интервалами вплоть до 24 часов после введения дозы. Изображения напитка, меченного радиоактивным изотопом 99mTc-DTPA, использовали только для получения схемы желудочно-кишечного тракта и не анализировали. Качественный анализ сцинтиграфических данных проводили с целью определения следующих параметров: время и анатомическая локализация начального высвобождения радиоактивной метки из капсулы, а также время и анатомическая локализация полного высвобождения радиоактивной метки из капсулы. Анатомическую локализацию высвобождения радиоактивной метки определяли в: желудке, проксимальном отделе тонкой кишки, дистальном отделе тонкой кишки, восходящей ободочной кишке (включая печеночный изгиб), поперечном отделе ободочной кишки (включая селезеночный изгиб) и нисходящем отделе ободочной кишки (включая сигмовидную кишку и прямую кишку). Качественную сцинтиграфическую оценку прохождения капсулы через желудочно-кишечный тракт до полного высвобождения радиоактивной метки проводили путем анализа следующих параметров: время опорожнения желудка и время поступления в ободочную кишку. После полного высвобождения радиоактивной метки дальнейшие параметры транзита не оценивали.

[516] Капсулы pH-телеметрии

[517] Во время каждого режима натощак четыре субъекта получали капсулу SmartPill® сразу после введения ТР. Каждый субъект получал SmartPill® только по одной схеме. Капсула SmartPill® представляет собой одноразовую капсулу для приема внутрь, предназначенную для использования врачами в диагностических целях. Датчики внутри проглатываемой капсулы измеряют pH, температуру и давление по мере того, как капсула проходит по желудочно-кишечному тракту. Измерения передавались из капсулы в желудочно-кишечный тракт посредством амплитудно-модулированного радиочастотного сигнала на частоте 434 МГц на носимый субъектом приемник данных, а затем загружались в портативный компьютер для анализа и просмотра после прохождения капсулы. Программное обеспечение MotiliGI™ автоматически выполняло анализ данных и предоставляло врачу отчет для печати, содержащий время опорожнения желудка и индекс моторики. Капсула SmartPill® обычно выводится в течение нескольких дней.

[518] Форма, размер и вес капсулы с покрытием плацебо и SmartPill® не были одинаковыми, поэтому 2 капсулы не могли пройти через желудочно-кишечный тракт в одно и то же время. Тем не менее, SmartPill® предоставил данные, которые позволяют охарактеризовать информацию о pH, давлении и температуре из разных областей кишечника.

[519] Результаты

[520] После введения капсулы с покрытием составом 1 начальное высвобождение радиоактивной метки наблюдалось со средним значением 2,675 ч после введения дозы (Таблицы 36, 37; Фиг. 32A). Полное высвобождение радиоактивной метки было достигнуто приблизительно через 1,1 часа, в среднем через 3,758 часа после введения дозы (Таблицы 36, 37; Фиг. 32B). Отмечено, что анатомические локализации распада сильно различаются: от желудка до восходящего отдела ободочной кишки (AC) для начального (Фиг. 33A) и до нисходящего отдела ободочной кишки (DC) для полного высвобождения (Фиг. 33B).

[521] После введения капсулы с покрытием составом 2 начальное высвобождение радиоактивной метки наблюдалось со средним значением 4,903 ч после введения дозы (Таблицы 36, 38; Фиг. 32A). Подобно капсуле с покрытием составом 1 полное высвобождение радиоактивной метки произошло приблизительно через 1,3 часа, при этом среднее время после введения дозы составило 6,176 часа (Таблицы 36, 38; Фиг. 32B). Анатомические локализации начальной (Фиг. 33A) и полной (Фиг. 33B) дезинтеграции показали меньшую изменчивость, при этом все высвобождение радиоактивной метки происходило между дистальным отделом тонкой кишки (DSB) и AC.

[522] После введения капсулы с покрытием составом 3 первоначальное высвобождение радиоактивной метки происходило несколько раньше, чем для капсулы с покрытием составом 2, через 4,082 ч после введения дозы (Таблицы 36, 39; Фиг. 32A). Как и в случае с капсулами с покрытием составом 1 и 2, полное высвобождение радиоактивной метки наблюдалось приблизительно через 1,2 часа, со средним временем 5,308 часа после введения дозы (Таблицы 36, 39; Фиг. 32B). Анатомические локализации распада были менее вариабельны, чем для капсул с покрытием составом 1, хотя и более вариабельны, чем капсул с покрытием составом 2. Первоначальное высвобождение колебалось от проксимального отдела тонкой кишки (PSB) до AC (Фиг. 33A), в то время как полное высвобождение колебалось от DSB до поперечного отдела ободочной кишки (TC) (Фиг. 33B).

Таблица 36 - Качественные сцинтиграфические параметры для времени и локализации первоначального и полного высвобождения радиоактивной метки у здоровых добровольцев после введения пероральных лекарственных форм в виде капсул с покрытием.

	начальное высвобождение радиоактивной метки* (ч после введения дозы)	Категория начальной локализации (n)	Полное высвобождение радиоактивной метки* (ч после введения дозы)	Категория полной локализации[a] (n)	Продолжительность распадаемости (ч)

Схема A Капсула с покрытием составом 1 (N=12)	2,675 (1,140)	Желудок (n=1) Желудок/PSB (n=1) PSB (n=2) DSB (n=5) DSB/AC (n=1) AC (n=2)	3,758 (1,736)	Желудок (n=1) PSB (n=2) DSB (n=5) DSB/AC (n=1) AC (n=1) TC (n=1) DC (n=1)	1,083 (0,857)
Схема B Капсула с покрытием составом 2 (N=12)	4,903 (1,298)	DSB (n=9) AC (n=3)	6,176 (2,289)	DSB (n=5) DSB/AC (n=2) AC (n=5)	1,273 (1,444)
Схема C Капсула с покрытием составом 3 (N=12)	4,082 (1,769)	PSB (n=1) DSB (n=8) DSB/AC (n=1) AC (n=2)	5,308 (2,738)	DSB (n=8) AC (n=3) TC (n=1)	1,226 (1,454)

*Среднее значение (±SD)

[a]Категории локализации, определяемые в: желудке, проксимальном отделе тонкой кишки (PSB), дистальном отделе тонкой кишки (DSB), восходящем отделе ободочной кишки (AC; включая печеночный изгиб), поперечном отделе ободочной кишки (TC; включая селезеночный изгиб), нисходящем отделе ободочной кишки (DC; включая сигмовидную кишку и прямую кишку). Когда нельзя определить точную локализацию, использовали категорию локализации сустава.

Таблица 37 - Качественные сцинтиграфические параметры у здоровых добровольцев после введения пероральной капсулы с покрытием составом 1 (схема A)

номер субъекта	начальное высвобождение радиоактивно	Анатомическое положение капсулы во время	Полное высвобождение радиоактивной	Анатомическое положение капсулы во время	Продолжительность распада

	й метки (ч после введения дозы)	первоначального высвобождения [a]	метки (ч после введения дозы)	полного высвобождения [a]	емости (ч)
001 002 003 004 005 006 007 008 009 010 011 012	2,63 1,63 2,14 2,38 2,13 5,13 3,88 4,13 1,38 2,88 1,89 1,90	PSB DSB DSB PSB Желудок AC AC DSB/AC Жел/PSB DSB DSB DSB	4,13 2,88 2,39 2,88 2,38 7,88 4,13 5,88 1,63 4,13 4,15 2,64	DSB DSB DSB PSB Желудок DC AC TC PSB DSB DSB/AC DSB	1,50 1,25 0,25 0,50 0,25 2,75 0,25 1,75 0,25 1,25 2,26 0,74
Среднее SD Медиана Мин Max n=	2,675 1,140 2,260 1,38 5,13 12		3,758 1,736 3,505 1,63 7,88 12		1,083 0,857 0,995 0,25 2,75 12

[a] Категории локализации, определяемые в: желудке, проксимальном отделе тонкой кишки (PSB), дистальном отделе тонкой кишки (DSB), восходящем отделе ободочной кишки (AC; включая печеночный изгиб), поперечном отделе ободочной кишки (TC; включая селезеночный изгиб), нисходящем отделе ободочной кишки (DC; включая сигмовидную кишку и прямую кишку). Когда нельзя определить точную локализацию, использовали категорию локализации сустава.

Таблица 38 - Качественные сцинтиграфические параметры у здоровых добровольцев после введения пероральной капсулы с покрытием составом 2 (схема B)

номер субъекта	начальное высвобождение радиоактивной метки (ч после введения	Анатомическое положение капсулы во время первоначального высвобождения	Полное высвобождение радиоактивной метки (ч после введения	Анатомическое положение капсулы во время полного высвобождения [a]	Продолжительность распадаемости (ч)

	дозы)	[a]	дозы)		
001 002 003 004 005 006 007 008 009 010 011 012	5,88 6,88 3,13 4,14 6,14 5,88 4,38 4,38 4,13 3,88 3,39 6,63	AC AC DSB DSB DSB DSB DSB DSB DSB DSB DSB AC	6,13 11,50 4,38 4,40 6,89 9,53 5,13 5,13 4,38 4,13 5,38 7,13	AC AC AC DSB DSB DSB/AC DSB DSB DSB/AC DSB AC AC	0,25 4,62 1,25 0,26 0,75 3,65 0,75 0,75 0,25 0,25 1,99 0,50
Среднее SD Медиана Мин Max n=	4,903 1,298 4,380 3,13 6,88 12		6,176 2,289 5,255 4,13 11,50 12		1,273 1,444 0,750 0,25 4,62 12

[a] Категории локализации, определяемые в: желудке, проксимальном отделе тонкой кишки (PSB), дистальном отделе тонкой кишки (DSB), восходящем отделе ободочной кишки (AC; включая печеночный изгиб), поперечном отделе ободочной кишки (TC; включая селезеночный изгиб), нисходящем отделе ободочной кишки (DC; включая сигмовидную кишку и прямую кишку). Когда нельзя определить точную локализацию, использовали категорию локализации сустава.

Таблица 39 - Качественные сцинтиграфические параметры у здоровых добровольцев после введения пероральной капсулы с покрытием составом 3 (схема C)

номер субъекта	начальное высвобождение радиоактивной метки (ч после введения дозы)	Анатомическое положение капсулы во время первоначального высвобождения [a]	Полное высвобождение радиоактивной метки (ч после введения дозы)	Анатомическое положение капсулы во время полного высвобождения [a]	Продолжительность распадаемости (ч)
001 002 003 004 005 006 007	5,63 3,64 8,50 5,38 3,88 3,38 4,15 1,88 3,65 3,88 2,63 2,38	DSB DSB AC DSB DSB AC DSB/AC DSB DSB DSB PSB DSB	5,63 3,88 11,50 8,50 4,63 3,63 8,51 3,38 4,14 4,13 2,88 2,88	DSB DSB TC DSB DSB AC AC DSB AC DSB DSB DSB	0,00 0,24 3,00 3,12 0,75 0,25 4,36 1,50 0,49 0,25 0,25 0,50

008 009 010 011 012					
Среднее SD Медиана Мин Max n=	4,082 1,769 3,765 1,88 8,50 12		5,308 2,738 4,135 2,88 11,50 12		1,226 1,454 0,495 0,00 4,36 12

[a] Категории локализации, определяемые в: желудке, проксимальном отделе тонкой кишки (PSB), дистальном отделе тонкой кишки (DSB), восходящем отделе ободочной кишки (AC; включая печеночный изгиб), поперечном отделе ободочной кишки (TC; включая селезеночный изгиб), нисходящем отделе ободочной кишки (DC; включая сигмовидную кишку и прямую кишку). Когда нельзя определить точную локализацию, использовали категорию локализации сустава.

[523] Пример 14: Оценка эффективности конструкции доставки IL-10 в индуцированной оксазолоном мышиной модели язвенного колита Th2

[524] Воспалительные заболевания кишечника (IBD), болезнь Крона (CD) и язвенный колит (UC) представляют собой хронические рецидивирующие заболевания, характеризующиеся воспалением желудочно-кишечного тракта (GI). Пациенты с IBD страдают от прогрессирующих и изнурительных симптомов, возникающих в результате сложного взаимодействия генетических факторов, факторов окружающей среды и неадекватной воспалительной реакции хозяина на люминальные антигены, вызванной иммунной системой слизистой оболочки.

[525] Цитокины регулируют многочисленные аспекты иммунного ответа, участвующего в установлении и/или поддержании провоспалительного или противовоспалительного сдвига, который регулирует многие аспекты здоровья и заболевания. В желудочно-кишечном тракте иммуномодулирующие клетки реагируют на широкий спектр экологических стимулов и ответственны за инициацию провоспалительного сигнального каскада в ответ на патологические антигены. Эпителиальные клетки и клетки, расположенные в подстилающей собственной пластинке желудочно-кишечного тракта, реагируют на множество цитокинов, которые регулируют воспалительный статус этой ткани. В случае IBD, связанного с желудочно-кишечным трактом, включая UC и CD, активация провоспалительных путей происходит слишком быстро, и урегулирование этих событий для поддержания гомеостаза желудочно-

кишечного тракта является недостаточным. Таким образом, начало, прогрессирование и регрессия IBD регулируются балансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Манипулируя провоспалительными цитокинами, связанными с желудочно-кишечным трактом, посредством воздействий на окружающие факторы, можно создать доклинические модели животных, которые воссоздают многие патофизиологические аспекты, наблюдаемые у пациентов с IBD.

[526] Индуцированный оксазолоном колит у мышей представляет собой надежную систему для оценки потенциальных методов лечения IBD, когда окружающие факторы используют для провоцирования острого воспалительного состояния. Характеризуется смешанной нейтрофильной и лимфоцитарной инфильтрацией, ограниченной поверхностным слоем слизистой, что связано с изъязвлением. В этой модели за периферической пресенсибилизацией следует ректальное введение гаптенизирующего средства оксазолона. Этот протокол сенсибилизации/активации приводит к Th2-опосредованному иммунному ответу, который характеризуется увеличением секреции тканевых интерлейкинов (IL)-4 и IL-5, что отражает отличительные молекулярные признаки UC. Важно отметить, что воздействие оксазолона также повышает уровень других тканевых цитокинов, которые играют некоторую роль в воспалении, в том числе хемокинов моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-1, макрофагального воспалительного белка (MIP)-1β, фактора роста, гранулоцитарно-колониестимулирующего фактора (G-CSF) и провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли (TNF)-α и IL-1α. Системные концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов обычно также повышены у пациентов с IBD; в частности, секреция TNF-α может коррелировать с тяжестью заболевания. Таким образом, анализ цитокинов плазмы может отражать воспаление кишечника и эффективность лекарственного средства, а также способствовать выяснению механизма действия лекарственного средства.

[527] Цели данного исследования заключались в следующем: (1) оценить способность раствора конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), доставляемой через желудочный зонд, предотвращать индуцированный оксазолоном колит у мышей путем оценки множества параметров заболевания при жизни (потеря массы тела, консистенция кала, скрытая кровь), выживаемости, морфологии ободочной кишки после вскрытия (масса и длина) и гистопатология ободочной кишки в конце исследования; (2) оценить противовоспалительную эффективность и механизм конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в изолированной ткани кишечника посредством иммуногистохимического окрашивания TNF-α, NFκB, IL-4, CD4 и Foxp3 ободочной кишки; и (3) оценить противовоспалительное действие конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) путем измерения концентраций цитокинов и хемокинов в плазме с использованием платформ Luminex и Meso Scale Discovery (MSD).

[528] Способы

[529] Самок мышей SJL/J получали из The Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine

04609 USA. В начале исследования мыши были в возрасте 7-8 недель и весили 18-22 г. Мышей содержали в регулируемой среде с температурой 70-72°F, влажностью 30-70% и фотоциклом 12 часов света и 12 часов темноты. Мышам давали 18% рацион TEKLAD 2018-Global и питьевую воду Arrowhead без ограничений. Мышей акклиматизировали в течение семи дней.

[530] Индукцию и лечение колита у мышей проводила компания Invitek Inc. (Hayward, CA). Мышей предварительно сенсибилизировали 3% оксазолоном (Sigma Aldrich, USA; № по каталогу: E0753) в 100% этаноле на участке кожи спины на -5 день, и в 0 день интраректально вводили 1% оксазолона в 40% этаноле. Контрольным мышам (без лечения) вводили 100% (-5 день) и 40% этанол (0 день). Мышам через зонд q.d. Перорально вводили (10 мл/кг) конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO:5) (8,45 мг/кг), аминосалицилат (5-ASA, 100 мг/кг, растворенный в воде; Sigma Aldrich, USA; № по каталогу: A3537), или вводили контроль в виде носителя для конструкции доставки IL-10 с -5 дня по 6 день. Схема эксперимента и номера групп приведены в Таблице 40. Ежедневный вес тела и параметры заболевания (консистенцию фекалий, положительную скрытую кровь) регистрировали для получения индекса активности заболевания (DAI). Плазму и ткань ободочной кишки собирали по окончании исследования на 7 день. Перед фиксацией измеряли массу и длину ободочной кишки.

Таблица 40 - Дизайн исследования

Группа	Описание	N	Путь введения	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Частота введения дозы
1	Контроль, без оксазолона (без обработки)	5	p.o.	n/a	10	q.d. с -5 по +6 день
2	Обработка оксазолоном+пероральный прием носителя (носитель)	10	p.o.	n/a	10	q.d. с -5 по +6 день
3	конструкция доставки IL-10	15	p.o.	8,45	10	q.d. с -5 по +6 день
4	5-ASA	15	p.o.	100	10	q.d. с -5 по +6 день

[531] Окрашивание гематоксилином и эозином фиксированных в формалине и залитых парафином поперечных срезов приблизительно проксимального, среднего и дистального отделов ободочной кишки и их гистопатологическую оценку проводили в IDEXX Reference Laboratories, Inc. Наличие колита и степень тяжести оценивали в

соответствии с наличием воспаления, лейкоцитарной инфильтрации, плотности сосудов, толщины стенки ободочной кишки, абсцессами крипт и наличием бокаловидных клеток и изъязвлений.

[532] Фиксированные в формалине и залитые парафином поперечные срезы проксимального, среднего и дистального отделов ободочной кишки (по 2 среза в каждом) получавших лечение мышей обрабатывали для окрашивания IHC мышиных NF-kB p65, TNF-α, IL-4, CD4, Foxp3 в HistoTox (Boulder, CO). Анализ изображений проводили на цифровых изображениях предметных стекол с использованием программного обеспечения Visiopharm по следующей процедуре. Ткани обрабатывали с помощью фильтров визуализации чтобы отделить положительное окрашивание от контрастного окрашивания, затем обработанные изображения классифицировали с использованием метода пороговой оценки, когда пороговое устанавливают на основе значений пикселей, связанных с положительно окрашенными тканями. Количественную оценку величины положительного окрашивания определяли путем анализа меченого изображения; процент положительных результатов рассчитывали путем деления площади положительной ткани на общую площадь ткани, чтобы получить показатель положительного результата.

[533] Цитокины плазмы количественно определяли с использованием набора V-plex Proinflammatory Panel 1 Mouse. Количество IL-1Ra в плазме определяли с помощью сэндвич-иммуноанализа с использованием пары антител из набора Mouse IL-1Ra/IL-1F3 DuoSet ELISA (R&D Systems #DY480), меченного стрептавидином SULFO-TAG (MSD #R32AD-1), комплекта планшетов Multi-Array 96, планшета SECTOR MSD #L15XA-3 и буфера T считывания (4x) (MSD #R92TC-2). Образцы считывали с помощью планшетного ридера QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

[534] Анализ Luminex проводили в Центре мониторинга иммунитета человека в Стэнфордском университете. Наборы Mouse 38 plex приобрели у eBiosciences/Affymetrix и использовали в соответствии с рекомендациями производителя с модификациями, как описано в данном документе. В 96-луночный планшет добавляли шарики и промывали в промывочной машине Biotek ELx405. Образцы добавляли на планшет, содержащий смешанные шарики, связанные с антителами, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C при встряхивании. Этапы инкубации при холодной и комнатной температуре проводили на орбитальном шейкере по 500-600 об/мин. После инкубации в течение ночи планшеты промывали в промывочной машине Biotek ELx405, а затем добавлялии биотинилированные дентифицирующие антитела в течение 75 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали, как описано выше, и добавляли стрептавидин-PE. После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре проводили промывание, как описано выше, и в лунки добавляли буфер для считывания. Каждый образец измеряли в двух повторениях. Планшеты считывали с использованием прибора Luminex 200 с нижней границей 50 гранул на образец на цитокин. Во все лунки добавляли специальные контрольные шарики производства Radix Biosolutions.

[535] Статистический анализ проводили с использованием Prism 5,0 (данные Invitek) или Prism 7,0 (GraphPad Software, Inc.). Данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа или двухфакторного дисперсионного анализа с последующими ретроспективными анализами Бонферрони, Тьюки или Даннетта. P значения < 0,05 считались значимыми.

[536] Результаты

[537] Индуцированное оксазолоном воспаление ободочной кишки связано со значительным снижением массы тела и снижением выживаемости (контроль с введением носителя по сравнению с контролемными группами, не получавшими лечение; Фиг. 35 и Фиг. 36). Было обнаружено, что это снижение массы тела ослабляется при лечении 5-ASA ($p < 0,05$ на 4-7 дни); однако статистических различий не было обнаружено у мышей, получавших конструкцию доставки IL-10 (Фиг. 35). Лечение конструкцией доставки IL-10 улучшало выживаемость по сравнению с носителем (3% увеличение), тогда как лечение 5-ASA приводило к более выраженному улучшению выживаемости (10%), (Фиг. 36). Не было обнаружено различий в консистенции кала или положительной скрытой крови (наличие крови в кале) между любой из групп (данные не показан). Обработка оксазолоном индуцировала воспаление ободочной кишки у получавших носитель мышей, на что указывала гистопатологическая оценка тяжести, которая ослаблялась при лечении конструкцией доставки IL-10 ($p < 0,05$; носитель по сравнению с конструкцией доставки IL-10), но не при лечении 5-ASA (Фиг. 37). Обработка оксазолоном также значительно увеличивала массу ободочной кишки в группе, получавшей носитель, что улучшалось благодаря присутствию конструкции доставки IL-10 и 5-ASA ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно), (Фиг. 38A). По сравнению с получавшими носитель животными улучшение при лечении конструкцией доставки наблюдалось в отношении положительной скрытой крови (Фиг. 38B), консистенции кала (Фиг. 38C) и индекса активности заболевания (Фиг. 38D). Наблюдалось опосредованное лечением подавление повышенных уровней в сыворотке макрофагального колониестимулирующего фактора 1 (MCSF, Фиг. 38E), белка IL12 p70 (Фиг. 38F) и IL-3 (Фиг. 38G).

[538] NFκB представляет собой фактор транскрипции, играющий главную роль в воспалении; передача сигналов через NFκB регулирует провоспалительные цитокины IL-1β, IL-6 и TNF-α. Чтобы понять локальный эффект конструкции доставки IL-10, экспрессию белков TNF-α, NF-kB, IL-4, CD4 и Foxp3 анализировали в срезах ободочной кишки с помощью IHC (Фиг. 39A-39E). Воспаление, индуцированное оксазолоном (представленное группой, получавшей носитель), приводило к тенденции к увеличению количества клеток в ободочной кишке, экспрессирующих CD4. Эти данные указывают на присутствие большего количества активированных CD4+ Т-клеток, которые могут включать эффекторные клетки Th2, основной фактор воспаления в этой модели. Также было обнаружено, что экспрессия Foxp3 повышена в группе, получавшей носитель (356% по сравнению с не получавшими лечения животными). Однако, как и в случае с 5- ASA, лечение конструкцией доставки IL-10 не оказывало существенного влияния на

экспрессию любого из исследованных белков.

[539] Чтобы дополнительно оценить эффективность конструкции доставки IL-10 и понять механизмы его действия, определяли циркулирующие концентрации 38 хемокинов, факторов роста, противовоспалительных цитокинов и провоспалительных цитокинов с использованием матрицы Luminex. Колит, вызванный оксазолоном (группа, получавшая носитель), не приводил к статистически значимым изменениям уровней этих молекул в плазме по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию оксазолона (группа, не подвергавшаяся лечению). Однако наблюдалась тенденция к повышению уровней провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-23 в плазме (Фиг. 40A-40B) у животных с индуцированным оксазолоном колитом по сравнению с группой, не получавшей лечения; уровни этих цитокинов в плазме повышены при IBD.

[540] Подавление тенденции к индукции оксазолоном провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-23 наблюдали при лечении 5-ASA и конструкцией доставки IL-10 (Фиг. 40A-40B). По сравнению с контролем в виде носителя профилактическое лечение конструкцией доставки IL-10 приводило к снижению концентраций IL-23 и IL-6 в плазме на 73% и 33%, соответственно.

[541] Концентрацию в плазме 10 цитокинов и хемокинов, которые играют ключевую эффекторную или регуляторную роль в воспалении, определяли с использованием высокочувствительного иммунологического электрохемилюминесцентного анализа MSD (Фиг. 41A-41J). Индукция колита оксазолоном приводила к тенденциям к увеличению уровней всех цитокинов, за исключением IL-5, хотя ни для одного из них не было достигнуто статистической значимости (вероятно, из-за высокой изменчивости, наблюдаемой в контрольных группах, получавших носитель). По сравнению с контролемной группой, получавшей носитель, конструкция доставки IL-10 значительно снижала экспрессию IL-1β и IL-2 ($p < 0,05$) и обнаруживала тенденцию к подавлению индукции IL-4 (62%), IL-6 (61%), IL-12p70 (65%) и хемоаттрактанта нейтрофилов KC/GRO (51%).

[542] Обсуждение

[543] В этом исследовании эффективности in vivo оценивали способность конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) 8,45 мг/кг, вводимой через желудочный зонд, предотвращать (профилактический способ лечения) развитие химически индуцированного колита, вызванного оксазолоном в качестве гаптена. Лечение конструкцией доставки IL-10 продемонстрировало эффективность в этой модели, о чем свидетельствует благотворное влияние на вес ободочной кишки и оценку гистопатологической тяжести, которые являются соответствующими показателями патологического заболевания, установленными ранее в этой модели индуцированного колита у мышей. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, эти наблюдения, вероятно, связаны с прямым влиянием конструкции доставки IL-10 на собственную пластинку.

[544] На молекулярном уровне оксазолон увеличивал количество экспрессирующих CD4 и Foxp3 Т-клеток в ободочной кишке. Однако эта модель

индуцированного оксазолоном воспаления ободочной кишки не инициировала значительный каскад хемокинов и цитокинов, обычно связанных с иммунным ответом при UC. Отсутствие надежного ответа может быть связано с наличием высокой вариабельности в группах лечения.

[545] Заключение

[546] В заключение, результаты в совокупности продемонстрировали, что профилактическое лечение конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), доставляемой в виде раствора для перорального применения по 8,45 мг/кг (mpk), обладало способностью подавлять вызванное оксазолоном колит у мышей, оцениваемый по клиническим признакам UC. В то время как пероральная доставка конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) не оказывала явного влияния на профиль иммунологического экспрессии в ободочной кишке, субхроническое применение действительно вызывало значительное и имеющее тенденцию к подавлению системных провоспалительных цитокинов, которые связаны с воспалением кишечника.

[547] Пример 15 - Дозозависимая эффективность конструкции доставки IL-10 в мышиных моделях язвенного колита, индуцированного оксазолоном и декстрансульфатом натрия (DSS)

[548] В экспериментальной модели колита, вызванного DSS, у мышей использована доставка химического колитогена с антикоагулянтными свойствами в питьевой воде. Инсульт приводит к повреждению эпителиального монослоя толстой кишки и диспергированию провоспалительного содержимого кишечника в подлежащие ткани. Популярность этой модели в исследованиях IBD обусловлена ее быстротой и воспроизводимостью, и моделью можно манипулировать для выявления острых, хронических и рецидивирующих моделей IBD в зависимости от концентрации DSS и частоты введения.

[549] В примере 13 показан терапевтический потенциал конструкции доставки IL-10 при профилактическом применении; раствор для перорального введения, содержащий 8,45 мг/кг конструкции доставки IL-10, продемонстрировал умеренную эффективность в отношении предотвращения развития колита, что измерялось несколькими параметрами заболевания.

[550] В этом примере обе модели колита, индуцированного оксазолоном и DSS, использовали для оценки дозозависимой эффективности конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Противовоспалительное средство 5-ASA было включено в исследование в качестве положительного контроля подавления воспаления, вызванного оксазолоном. 5-ASA имеет широкое клиническое использование для лечения язвенного колита легкой и средней степени тяжести благодаря его относительной эффективности, безопасности и хорошей переносимости. Иммунодепрессант циклоспорин (CsA) использовали в качестве положительного контроля в исследовании DSS; это лечение имеет широкое клиническое использование для лечения болезни Крона (CD).

[551] Для оценки целевого воздействия дозирующего раствора авторов

изобретения антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra) оценивали в качестве потенциального фармакодинамического биомаркера конструкции доставки IL-10. Секретируемый эпителиальными, иммунными клетками и адипоцитами, IL-1Ra связывается с рецептором IL-1, но не может индуцировать передачу сигнала, таким образом противодействуя опосредованному IL-1 воспалению. Эффективность профилактического лечения конструкцией доставки IL-10 оценивали путем оценки ряда параметров заболевания in vivo. Кроме того, также оценивали влияние конструкции доставки IL-10 на циркулирующие концентрации цитокинов и хемокинов, которые изменяются при воспалении кишечника.

[552] Цели данного исследования заключались в следующем: (1) оценить реакцию на дозу конструкции доставки IL-10 (0,3, 1, 3 и 9 мг/кг) при индуцированном оксазолоном колите у мышей путем оценки множества прижизненных параметров заболевания (потеря массы тела, консистенция кала, скрытая кровь в кале), выживаемости, морфологии ободочной кишки после вскрытия (масса и длина) и гистопатологии ободочной кишки; (2) оценить реакцию на дозу конструкции доставки IL-10 (0,3, 3, 10, 30 мг/кг) в модели DSS-колита путем оценки прижизненных параметров заболевания и вскрытия, и гистологии; (3) оценить противовоспалительную эффективность и механизм конструкции доставки IL-10 путем измерения концентрации цитокинов и хемокинов в плазме с использованием платформ Luminex и MSD; и (4) оценить потенциальные фармакодинамические биомаркеры, индуцированные конструкцией доставки IL-10, путем определения экспрессии тканевых генов и концентраций IL-1Ra в плазме и концентрации pSTAT3 в тканях.

[553] Способы

[554] Мышей содержали в контролируемой среде с температурой 70-72°F, влажностью 30-70% и фотоциклом 12 часов света и 12 часов темноты. Мышам давали 18% рацион TEKLAD 2018-Global и питьевую воду Arrowhead без ограничений. Мышей акклиматизировали в течение семи дней.

[555] Проводили индуцирование колита оксазолоном и профилактическое лечение у мышей. Самок мышей SJL/J в возрасте 7-8 недель предварительно сенсибилизировали 3% раствором оксазолона в 100% этаноле (Sigma Aldrich, USA; № по каталогу: E0753) на участке кожи спины на -5 день и интраректально заражали 1% раствором оксазолона в 40% этаноле в 0 день. Животным перорально вводили q.d. растворы с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) (0,3, 1, 3 и 9 мг/кг), аминосалицилатом (5-ASA, 100 мг/кг; Sigma Aldrich, USA; № по каталогу: A3537) или контроль в виде носителя (10 мг/мл соевого ингибитора трипсина в 200 мМ бикарбоната натрия; буфер лекарственной формы конструкции доставки IL-10) с -5 дня до 6 дня. Не получающих лечение мышей предварительно сенсибилизировали и заражали только этанолом. Ежедневный вес тела и параметры заболевания (консистенцию кала, положительную скрытую кровь в кале) регистрировали для получения индекса активности заболевания (DAI). Плазму и ткани толстой кишки собирали по окончании исследования на 7 день. Это исследование

проводили в условиях без GLP и в соответствии с протоколом INVITEK и стандартными рабочими процедурами INVITEK. Дизайн исследования и номера групп для лечения оксазолоном приведены в Таблице 41.

[556] Индукция DSS мышиного колита проводили Bolder BioPath, Inc. (Co, USA). Самкам мышей C57BL6/J (8-10 недель) давали 2,5% декстрана сульфата натрия (м/о) (Spectrum, Lot# 2DC0020) в питьевой воде без ограничения с 0 дня до 7 дня. На 7 день DSS заменяли водой, а животных содержали до 10 дня. Мышам перорально вводили (q.d.) конструкции доставки IL-10 (0,3, 3,0, 10 или 30 мг/кг), контроль в виде носителя (10 мг/мл ингибитор соевого трипсина в 200 мМ бикарбоната натрия; буфер для лекарственной формы для конструкции доставки IL-10) или циклоспорин А в виде положительного контроля (Teva, Lot # 4R506001), полученный в kolliphor EL (SIGMA, C5135, Lot # BCBP4773V) и 1% карбоксиметилцелцеллюлозу (CMC : BBP, Batch # 2017, Lot # 3) по 75 мг/кг, начиная с 0 дня до 10 дня, когда их умерщвляли для сбора плазмы и тканей через 4 часа после введения дозы. Дизайн исследования и номера группы для обработки DSS приведены в Таблице 42.

Таблица 41 - Информация о лечении и группе Оксазолона

Группа	Описание	N	Путь введения	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Частота введения дозы
A	Контроль, без оксазолона (без обработки)	5	p.o.	N/A	10	q.d. с -5 по +6 день
B	Оксазолон+ пероральный прием носителя (носитель)	10	p.o.	N/A	10	q.d. с -5 по +6 день
C	5-ASA (положительный контроль)	15	p.o.	100	10	q.d. с -5 по +6 день
D	конструкция доставки IL-10 (9,0 мг/кг; синий)	15	p.o.	N/A	10	q.d. с -5 по +6 день
E	конструкция доставки IL-10 (3,0 мг/кг; зеленый)	15	p.o.	N/A	10	q.d. с -5 по +6 день

F	конструкция доставки IL-10 (1,0 мг/кг; красный)	15	p.o.	N/A	10	q.d. с -5 по +6 день
G	конструкция доставки IL-10 (0,3 мг/кг; фиолетовый)	15	p.o.	N/A	10	q.d. с -5 по +6 день

Таблица 42 - Группа DSS и информация о лечении

Группа	Описание	N	Путь введения	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Частота введения дозы
1	Без обработки	5	n/a	n/a	n/a	n/a
2	носитель	10	PO	n/a	10	q.d., 0-10 день
3	CsA	10	PO	75	10	q.d., 0-10 день
4	конструкция доставки IL-10	10	PO	0,3	10	q.d., 0-10 день
5	конструкция доставки IL-10	10	PO	3	10	q.d., 0-10 день
6	конструкция доставки IL-10	10	PO	10	10	q.d., 0-10 день
7	конструкция доставки IL-10	10	PO	30	10	q.d., 0-10 день

[557] Для исследования колита как с оксазолоном, так и с DSS, в Bolder BioPath (Boulder, CO) проводили окрашивание гематоксилином и эозином фиксированных в формалине и залитых парафином поперечных срезов приблизительно проксимального, среднего и дистального отделов ободочной кишки. Для каждого отдела вырезали две равноудаленные части и заливали парафином. Каждую часть оценивали индивидуально, и значения усредняли отделено для проксимального, среднего, дистального отдела и всей ободочной кишки. Гистопатологию оценивали вслепую на наличие отека, воспаления, нарушения железы, эрозии, толщину слизистой оболочке и гиперплазию для получения суммарного показателя. также определяли наличие инфильтратов воспалительных клеток и количество и диаметр лимфоидных агрегатов.

[558] Анализ Luminex проводили в Центре мониторинга иммунитета человека в

Стэнфордском университете. Наборы Mouse 38 plex приобрели у eBiosciences/Affymetrix и использовали в соответствии с рекомендациями производителя с модификациями, как описано в данном документе. В 96-луночный планшет добавляли шарики и промывали в промывочной машине Biotek ELx405. Образцы добавляли на планшет, содержащий смешанные шарики, связанные с антителами, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C при встряхивании. Этапы инкубации при холодной и комнатной температуре проводили на орбитальном шейкере по 500-600 об/мин. После инкубации в течение ночи, планшеты промывали в промывочной машине Biotek ELx405, а затем добавлялии биотинилированные дентифицирующие антитела в течение 75 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали, как описано выше, и добавляли стрептавидин-PE. После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре проводили промывание, как описано выше, и в лунки добавляли буфер для считывания. Каждый образец измеряли в двух повторениях. Планшеты считывали с использованием прибора Luminex 200 с нижней границей 50 гранул на образец на цитокин. Во все лунки добавляли специальные контрольные шарики производства Radix Biosolutions.

[559] РНК выделили из околодистальных сегментов ободочной кишки (между 1-2 см от прямой кишки) у мышей с вызванным оксазолоном воспалением и получавших лечение. чистоту РНК подтверждали с помощью соотношений показателей поглощения при 260/280 равных 1,9-2,15 и 260/230 >1,7. Образцы РНК подвергли обратной транскрипции в кДнК с использованием набора RNeasy Mini (Qiagen, #74106) и набора iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, # 1708891BUN). Анализ RT-PCR IL-1Ra, IL-1β и GAPDH мыши проводили с техническими повторами с использованием Applied Biosystems PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, #A25777). Последовательности праймеров приведены в Таблице 43. Экспрессию транскрипта нормализовали по экспрессии внутреннего контроля, GAPDH, и кратные изменения рассчитали с использованием метода ΔΔ-CT.

Таблица 43 - Последовательности праймеров RT- PCR

название праймера	Последовательность	SEQ ID NO:
ms IL-1Ra-F	GCTCATTGCTGGGTACTTACAA	SEQ ID NO: 14
ms IL-1Ra-R	CCAGACTTGGCACAAGACAGG	SEQ ID NO: 15
ms IL-1β-F	CACAGCAGCACATCAACAAG	SEQ ID NO: 16
ms IL-1β-R	GTGCTCATGTCCTCATCCTG	SEQ ID NO: 17
ms GAPDH-F	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	SEQ ID NO: 18
ms GAPDH-R	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	SEQ ID NO: 19

[560] Цитокины плазмы количественно определяли с использованием набора V-plex Proinflammatory Panel 1 Mouse. Количество IL-1Ra в плазме определяли с помощью сэндвич-иммуноанализа с использованием пары антител из набора Mouse IL-1Ra/IL-1F3 DuoSet ELISA (R&D Systems #DY480), меченного стрептавидином SULFO-TAG (MSD

#R32AD-1), комплекта планшетов Multi-Array 96, планшета SECTOR MSD #L15XA-3 и буфера T считывания (4x) (MSD #R92TC-2). Образцы считывали с помощью планшетного ридера QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Discovery, Rockville, MD).

[561] Набор Human IL-10 Base (MSD #K151AOA-4) использовали для измерения rhIL-10 в плазме. Пара захватывающего и идентифицирующего антител против IL-10 человека в этом иммуноанализе не реагировали с мышиным IL-10, но реагировали с человеческим IL-10. Планшет MSD Small Spot IL-10 инкубировали с разбавителем 41 (25 мкл/лунку) в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании перед использованием. Контроль и образцы разбавляли в 2 раза объединенной плазмой мыши с CD-1 (BioIVT, custom order), а стандарты калибровки также получали в мышиной плазме. Добавляли стандарты, разбавленные образцы и контроль (25 мкл/лунку), и планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании. Планшет промывали 3 раза фосфатно-солевым буфером с Tween-20 (PBST), и на планшет добавляли 25 мкл/лунку антитела 1X SULFO TAG против человеческого IL-10 (приготовленные в разбавителе 45). Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После этапа промывания добавляли 150 мкл/лунку буфера считывания 2X MSD, и планшет считывали в планшетном считывателе MSD Sector Imager 600.

[562] Статистический анализ проводили с использованием Prism 5,0 (данные Invitek) или Prism 7,0 (GraphPad Software, Inc.). Для исследования с оксазолоном данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа или двухфакторного дисперсионного анализа с последующими ретроспективными анализами Бонферрони, Даннетта или Тьюки. Данные DSS анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим ретроспективным анализом Даннетта для параметрических данных или тестом Краскела-Уоллиса с ретроспективным анализом Даннетта для непараметрических данных. P значения $< 0,05$ считались значимыми.

[563] Результаты: Индуцированный оксазолоном колит

[564] Индуцированное оксазолоном воспаление ободочной кишки приводило к выраженному потере массы тела (до 15%) и снижению выживаемости (Фиг. 42 и Фиг. 43). Противовоспалительное средство, 5-ASA, значительно ослабляло индуцированное оксазолоном снижение массы тела через 6 дней после воздействия ($p < 0,05$). Конструкция доставки IL-10 в наивысшей концентрации (1, 3 и 9 мг/кг), давало улучшение тенденции снижения массы тела. Никакого значимого влияния на DAI, отражающего консистенцию кала и положительную скрытую кровь, не обнаружили между группами лечения (Фиг. 44).

[565] Кроме того, оксазолон индуцировал уменьшение длины ободочной кишки и увеличение массы ободочной кишки, что отображается увеличением соотношения массы/длины ободочной кишки (Фиг. 45). Это увеличение улучшали с помощью лечения 5-ASA; однако конструкция доставки IL-10 не оказывала статистически значимого влияния на массу или длину ободочной кишки при любой из изученных доз.

[566] Семь параметров воспаления (воспаление слизистой/подслизистой оболочки, эрозия, нарушение железы, гиперплазия, отек, трансмуральное воспаление, воспаление серозной оболочки) оценивали по шкале от 1 до 4 (1=минимальное, 2=легкое, 3=умеренное, 4=выраженное) для оценки гистопатологии проксимального, среднего и дистального отделов ободочной кишки. На основании суммарного показателя (гистологического показателя) этих семи параметров было обнаружено, что гистопатология была наиболее выражена в дистальном отделе ободочной кишки и наименее в проксимальном отделе ободочной кишки для всех групп лечения (Фиг. 46). Конструкция доставки IL-10, при всех изученных дозах, не вызывала никаких изменений гистологического показателя в проксимальном, среднем или дистальном отделах ободочной кишки по сравнению с контролем при введении носителя.

[567] В дополнение к общим параметрам заболевания эффективность конструкции доставки IL-10 также оценивали путем оценки циркулирующих концентраций 38 факторов роста, хемокинов и цитокинов (Фиг. 47A-47LL). Обработка оксазолоном индуцировала повышение концентрации в плазме гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (GCSF, также известного как колониестимулирующий фактор 3 или CSF3; Фиг. 47A) и тенденцию к увеличению хемоаттрактанта макрофагов MIP1α (Фиг. 47L) и факторов роста, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMCSF; Фиг. 47B) и макрофагального колониестимулирующего фактора (MCSF; Фиг. 47C), которые, соответственно, мобилизуют высвобождение и дифференцировку нейтрофилов и макрофагов. Профилактическая предварительная обработка положительным контролем, 5-ASA, или конструкцией доставки IL-10 ослабляла индуцированное оксазолоном увеличение GCSF/CSF3. MSCF также снижался при самой высокой дозе конструкции доставки IL-10. Тенденция к снижению также наблюдалась для MIP1α (Фиг. 47L). Изменения уровней LPS-индуцируемого хемокина CXC (LIX, Фиг. 47I), фактора ингибирования лейкемии (LIF, Фиг. 47E) и IP10 (CXCL10, Фиг. 47H), индуцированные Oxa, были смягчены за счет лечения конструкцией доставки IL-10.

[568] Помимо воздействия на клетки врожденного иммунитета, цитокины также регулируют функции эффекторных Т-клеток. В соответствии с противовоспалительным эффектом предварительная лечение конструкциями доставки IL-10 (доза 9,0 мг/кг) предотвращала выработку IL-12 и IL-17, ключевых эффекторов клеток Th1 и Th17, соответственно. Лечение конструкцией доставки IL-10 приводило к снижению концентраций IL-3 (доза 9,0 мг/кг; Фиг. 47S), IL-4 (9,0 мг/кг; Фиг. 47T), IL-28 (3,0 и 9,0 мг/кг; Фиг. 47EE) и IL-31 (0,3 мг/кг; Фиг. 47FF) до уровней, близких к исходным. Концентрации IL-13 (Фиг. 47Y) и IL-15 (Фиг. 47Z) в плазме выявили тенденцию к снижению, опосредованному конструкцией доставки IL-10, по сравнению с контрольным носителем. Помимо провоспалительных цитокинов, оксазолон (только обработка носителем) показал тенденцию к увеличению секреции эндогенного IL-10 (Фиг. 47JJ) и иммуносупрессивного цитокина TGF-β (Фиг. 47LL). Этот очевидный ответ на воспаление

согласуется с наблюдаемым увеличением TGF-β в ткани толстой кишки при UC. Лечение конструкцией доставки IL-10 (3,0 мг/кг) снижало уровень TGF-β по сравнению с носителем и улучшало эту тенденцию к увеличению секреции эндогенного IL-10. Концентрация многих проанализированных цитокинов в плазме после обработки оксазолоном существенно не индуцировалась. Более того, когда наблюдалось индуцированное оксазолоном увеличение, 5-ASA не восстанавливала эффективно экспрессию цитокина до исходного уровня (перед лечением) по многим тестируемым параметрам.

[569] Концентрации системного цитокина у мышей, у которых с помощью оксазолона индуцировали колит, и профилактическое лечение конструкцией доставки IL-10 дополнительно оценивали с использованием провоспалительной панели MSD 10-plex. IFN-γ и IL-5 в плазме были снижены у получавших носитель мышей с индуцированным оксазолоном колитом по сравнению с контролем без обработки, но не было значимых различий между этиит группами относительно других измеренных цитокинов (Фиг. 48A-48J). Тенденция к увеличению экспрессии IL-1β и IL-6 наблюдалась в ответ на оксазолоное воздействие. Однако этот ответ не ослаблялся при введении положительного контроля, 5-ASA или конструкции доставки IL-10. Из-за отсутствия существенной воспалительной реакции, вызванной оксазолоном, эффект лечения конструкцией доставки IL-10 было нелегко расшифровать; однако никаких существенных различий между обработкой носителем и конструкцией доставки IL-10 не было обнаружено ни для одного из проанализированных цитокинов.

[570] эффективность конструкции доставки IL-10 в системном кровотоке и ткани толстой кишки оценивали путем анализа экспрессии IL-1Ra, антагониста IL-1β, действие которого усиливается IL-10. Уровни циркулирующего IL-1Ra существенно не изменились после оксазолонового воздействия или лечения 5-ASA или конструкцией доставки IL-10 (Фиг. 49A), вероятно, из-за изменчивости данных и низкой статистической достоверности. Однако лечение конструкцией доставки IL-10 вызывало дозозависимую тенденцию к повышению уровня IL-1Ra. В почти дистальной ткани толстой кишки лечение конструкцией доставки IL-10 в самой высокой дозе 9 мг/кг выявила тенденцию к усиленной экспрессии мРНК IL-1Ra (Фиг. 49B). Этот результат также отражался увеличением отношения IL-1Ra/IL-1β (Фиг. 49D).

[571] Результаты: колит, индуцированный декстрансульфатом натрия (DSS).

[572] В этом примере исследована способность конструкции доставки IL-10 подавлять многоочаговый колит от легкой до умеренной степени, вызванный декстрансульфатом натрия (DSS), характеризующийся воспалением, отеком и некрозом слизистой оболочки, при представлении этого агента, связывающего жирные кислоты со средней длиной цепи, в питьевой воде. Мышам вводили носитель перорально один раз в день в течение 10 дней (в качестве отрицательного контроля) или конструкцию доставки IL-10 SEQ ID NO: 5 (0,3-30 мг/кг) для индукции вызванного DSS колита (Фиг. 50A). Мышей, получавших ежедневно 75 мг/кг циклоспорина A (CsA), использовали в качестве

положительного контроля для модели, а не в качестве терапевтического сравнения. Конструкция доставки SEQ ID NO: 5 значительно уменьшала потерю веса, вызванную DSS, во время прижизненной части исследования (Фиг. 50B). Воздействие DSS приводило к потере массы тела на ~10% в группе, получавшей носитель (или на ~17% по сравнению с группой, не получавшей лечение, которая прибавила в весе) (Фиг. 50C). Лечение CsA частично ослабляло индуцированную DSS потерю массы тела ($p<0,05$), как это наблюдалось с конструкцией доставки IL-10, при самой высокой тестируемой дозе (30 мг/кг). Ни в одной из групп лечения не было летальных исходов. Индивидуальные баллы по потере веса, консистенции кала и скрытой крови в кале (оценка 0-3) также суммировались для получения DAI (диапазон 0-9). Относительно суммарного балла 3,8 для группы, получавшей носитель на 7 день (и 0 для группы, не получавшей лечение), баллы для групп, получавших конструкцию доставки IL-10, варьировались от 4,0 до 4,3 без корреляции с дозой и, таким образом, не подтверждают улучшение индекса активности заболевания (DAI) за счет конструкции доставки IL-10 (оценки не были доступны на 10 день) (Фиг. 51). Значительное уменьшение длины ободочной кишки при двух верхних дозах конструкции доставки IL-10 (10 и 30 мг/кг; $p<0,05$ по сравнению с носителем) указывает на наличие терапевтических эффектов, зависящих от конструкции доставки IL-10 (Фиг. 52).

[573] Гистологию ободочной кишки оценивали на основании воспаления, нарушения железы, эрозии и гиперплазии (максимум 5 баллов по каждому), и они суммировались в итоговой оценке. Все четыре параметра были значительно увеличены после воздействия DSS в среднем и дистальном отделах ободочной кишки ($p <0,05$ по сравнению с отсутствием лечения). Лечение CsA уменьшало суммарную оценку четырех измеренных параметров, но лечение конструкцией доставки IL-10 не выявило каких-либо значительных улучшений (Фиг. 53). Также были количественно определены пять дополнительных параметров (отек, нейтрофильная инфильтрация, толщина слизистой оболочки, лимфоидное агрегаты и размер лимфоидных агрегатов). В соответствии с распространением заболевания от дистального отдела к проксимальному отделу ободочной кишки гистопатология была наиболее серьезной в дистальном отделе ободочной кишки и незначительной в проксимальном отделе ободочной кишки при лечении носителем по нескольким параметрам. По сравнению с носителем лечение конструкцией доставки IL-10 (30 мг/кг) значительно уменьшала ширину отека (Фиг. 54), толщину слизистой оболочки (Фиг. 55) и гиперплазию (Фиг. 56) в среднем отделе. CsA не продемонстрировал каких-либо явных терапевтических эффектов после воздействия DSS, за исключением улучшения количества нейтрофилов ($p<0,05$ по сравнению с носителем). Таким образом, эти гистологические результаты указывают на умеренную степень местной эффективности препарата.

[574] Конструкция доставки IL-10 была обнаружена в различных концентрациях в кровотоке через 4 часа после последней дозы в исследовании DSS. Уровни rhIL-10 (выявляемые с помощью захватывающего антитела против rhIL-10) в диапазоне от 10 до

300 раз превышали фоновые концентрации при лечении носителем у животных, получавших конструкцию доставки IL-10 в дозах 0,3 и 3 мг/кг. (Фиг. 57A); однако этот эффект теряется при более высоких дозировках конструкции доставки IL-10. Кроме того, при низких дозах конструкции доставки IL-10 более высокие концентрации rhIL-10, чем у конструкции доставки IL-10 (определяемые с помощью захватывающего антитела против cholix), указывают на присутствие продуктов расщепления конструкции доставки IL-10, которые будут соответствовать протеазной активности, преобладающей в среде ЖКТ. Профилактическое лечение конструкцией доставки IL-10, по-видимому, не влияло на концентрации IL-1Ra в плазме при любой тестируемой дозе (Фиг. 57B).

[575] Обсуждение

[576] В этих исследованиях оценивали эффективность конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) для предотвращения развития воспалительного колита в моделях оксазолона и DSS. В обоих исследованиях наблюдались тенденции к улучшению ряда прижизненных параметров и параметров патологоанатомического вскрытия. Уменьшение длины ободочной кишки при двух самых высоких дозах конструкции доставки IL-10 (10 и 30 мг/кг) после воздействия DSS предоставило доказательства терапевтических эффектов, зависящих от конструкции доставки IL-10. В исследовании DSS не было летальных исходов, в то время как после обработки оксазолоном выживаемость снизилась на 30%, что свидетельствует о том, что протокол оксазолона индуцировал гораздо более тяжелую модель колита.

[577] Примечательной особенностью модели DSS было то, что гистопатология была более согласованной между биологическими повторами; внутригрупповая вариабельность оказалась сниженной в модели DSS по сравнению с моделью оксазолона. В модели DSS конструкция доставки IL-10 в самой высокой дозе (30 мг/кг) эффективно уменьшала три гистологических параметра, а именно ширину отека, толщину слизистой оболочки и гиперплазию в среднем, но не в дистальном отделе ободочной кишки.

[578] В представленном исследовании зависимости от дозы оксазолона эффективность была продемонстрирована изменениями концентраций циркулирующих цитокинов, опосредованными конструкцией доставки IL-10. Концентрация GCSF (или CSF3) в плазме повышалась в ответ на оксазолоновое воздействие, и этот ответ смягчался профилактическим предварительным лечением 5-ASA или конструкцией доставки IL-10. Предварительное лечение конструкцией доставки IL-10 (доза 9,0 мг/кг) также предотвращало выработку IL-12 и IL-17, ключевых эффекторов клеток Th1 и Th17. Кроме того, конструкция доставки IL-10 приводила к снижению концентраций MCSF (доза 9,0 мг/кг), IL-3 (9,0 мг/кг), IL-4 (9,0 мг/кг), IL-28 (3,0 мг/кг и 9,0 мг/кг) и IL-31 (0,3 мг/кг) до уровня, близкого к базовому (без лечения). Концентрация многих анализируемых цитокинов в плазме существенно не менялась после обработки оксазолоном. Когда имело место индуцированное оксазолоном увеличение, положительный контроль 5-ASA не возвращал эффективно экспрессию цитокина к исходным уровням по многим тестируемым параметрам. Таким образом, в отсутствие надежного ослабления

воспалительных цитокинов 5-ASA пригодность этого средства в качестве контрольного лечения может быть поставлена под сомнение. Кроме того, этой модели воспаления, вызванного оксазолоном, может быть недостаточно для запуска значительного системного цитокинового ответа у этих мышей.

[579] Лечение конструкцией доставки IL-10 в самой высокой дозе 9 мг/кг выявило тенденцию к усиленной экспрессии мРНК IL-1Ra и тенденцию к увеличению отношения IL-1Ra/IL-1β в ткани толстой кишки. Предыдущие клинические данные показали, что соотношение IL-1Ra/IL-1β обратно коррелирует с тяжестью IBD и что IL-10 может восстанавливать соотношение IL-1Ra/IL-1β. Эти результаты свидетельствуют об эффективности лечения конструкцией доставки IL-10 в этой модели.

[580] Заключение

[581] В заключение, в контексте воспалительного колита, индуцированного как оксазолоном, так и DSS, данные, представленные в этом отчете, указывают на то, что лечение конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) продемонстрировало терапевтическую эффективность, измеренную по улучшению параметров воспаления in vivo. В исследовании оксазолона циркулирующие концентрации IL-12, IL-17 и IL-28 снижались при лечении конструкцией доставки IL-10, что сопровождалось тенденцией к увеличению соотношения IL-1Ra/IL-1β. в ткани толстой кишки.

[582] Пример 16 - Пероральное введение однократной дозы конструкции доставки IL-10 у Macaca fascicularis

[583] Примат, не являющийся человеком (NHP), Macaca fascicularis, был выбран в качестве модельной системы для тестирования оценки доклинической эффективности, фармакологической активности и фармакокинетики конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Из-за значительного генетического сходства между людьми и NHP, такими как Macaca fascicularis, NHP обычно представляет собой более подходящую модель для человека, чем мышь, поскольку NHP более точно имитируют биологию и иммунологию человека. В этом исследовании использовали добавление 10 мг кофеина к капсулам конструкции доставки IL-10 для исследования открывания капсул.

[584] Цели данного исследования заключались в том, чтобы: (1) оценить влияние однократного введения на нескольких уровнях (1, 4, 20,5 и 82 мг) с помощью пероральной капсулы на фармакокинетический профиль конструкции доставки IL-10 (по измерению по общему IL-10 и установленному биомаркеру IL-1Ra) у Macaca fascicularis; (2) оценить ответ провоспалительных цитокинов IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 и TNFα на однократную пероральную дозу на нескольких уровнях (1, 4, 20,5 и 82 мг) конструкции доставки IL-10 в виде капсулы у Macaca fascicularis; и (3) исследовать действие капсул путем мониторинга уровня включенного в вышеупомянутые пероральные капсулы кофеина в плазме у получавших препарат Macaca fascicularis.

[585] Методы

[586] Конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) и кофеин наполняли по массе в капсулы Capsugel V-Cap из гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC) размера 1 для

перорального введения. Затем капсулы последовательно покрывали тремя слоями полимеров в устройстве для нанесения покрытий методом распыления. Первый и третий слой представляли собой тонкие покрытия из HPMC, первый для герметизации складки в месте соединения оболочек капсул, а третий для сведения к минимуму прилипания капсул друг к другу. Второй слой покрытия состоял из смеси 50:50 эудрагит® (Evonik Industries AG) кишечнорастворимых акриловых полимеров FS 30 D и L 30 D-55, предназначенных для растворения и открытия капсулы при pH 6,5. Краткое изложение описанных тестовых изделий и соответствующих им номеров партий представлено в Таблице 44.

Таблица 44 - Краткая информация о тестируемых изделиях

название	Описание
Капсула конструкции доставки IL-10 1 мг	Капсула размера 1, покрытая кишечнорастворимым покрытием, содержащая 1 мг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) + 10 мг кофеина
Капсула конструкции доставки IL-10 20,5 мг	Капсула размера 1, покрытая кишечнорастворимым покрытием, содержащая 20,5 мг конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) + 10 мг кофеина

[587] Планшет MSD Small Spot IL-10 перед использованием 3 раза промывали PBST. Стандарты готовили в разбавителе 2 (MSD Кат № R51BB), а образцы разбавляли в 2 раза в разбавителе 2. Стандарты и разбавленные образцы добавляли в планшет для анализа, и планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании. Планшет 3 раза промывали PBST и 1X SULFO TAG против huIL-10. Перед инкубацией в планшет добавляли антитело в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После этапа промывки в лунки планшета добавляли 2X буфер считывания MSD, и планшет считывали в устройстве для считывания планшетов MSD Sector Imager 600. Нижний предел обнаружения каждого аналита определен как 2,5 стандартного отклонения выше фона.

[588] Цель анализа IL-1Ra заключалась в измерении эндогенного IL-1Ra в плазме NHP. Пара антител в этом сэндвич-иммуноанализе реагировала с IL-1Ra, как человеческим, так и NHP. Образцы количественно определяли с использованием стандартной кривой по 8 точкам, полученной из калибратора человеческого IL-1Ra (в диапазоне от 5,5 до 4021 пг/мл плюс 0 пг/мл). Биотинилированное захватывающее антитело против IL-1Ra NHP добавляли в планшет MSD Small Spot Streptavidin и инкубировали в течение часа при комнатной температуре при встряхивании. Контроли, представляющие низкую (16 мг/мл), среднюю (160 мг/мл) и высокую концентрацию (3245 пг/мл), готовили в объединенной плазме, стандарты (смесь калибратора 9) готовили в разбавителе 43 (MSD Кат № R50AG), и образцы разбавляли в 10 раз в разбавителе 43. Стандарты, контроли и разведенные образцы добавляли в планшет для анализа, и планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании. Планшет 3 раза промывали PBST, и на планшет добавляли антитело 1X SULFO TAG против IL-1Ra.

Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После этапа промывки в лунки планшета добавляли 2X буфер считывания MSD, и планшет считывали с помощью планшет-ридера MSD Sector Imager 600. Нижний предел обнаружения каждого аналита определен как 2,5 стандартного отклонения выше фона.

[589] Для количественного определения уровней кофеина в плазме использовали систему обнаружения LC-MC/MC. Аликвоту матрицы объемом 25 мкл обогащали 25 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта кофеин-триметIL-$^{13}C_3$ с концентрацией 2,00 мкг/мл. Аналиты выделяли с помощью поддерживаемой жидкостной экстракции (SLE). Часть элюата переносили и выпаривали в струе азота приблизительно при 45°C, а оставшийся остаток восстанавливали 500 мкл воды/ацетонитрила (95:5, о/о). Конечный экстракт анализировали с помощью HPLC с детектированием MC/MC с использованием электрораспыления с положительными ионами и обращенно-фазовой хроматографии. Концентрацию кофеина определяли с использованием аналогичных калибровочных контролей.

[590] Панель цитокинов (IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6 и IL-8) оценивали с использованием мультиплексного набора, доступного от MSD. Анализы в этой панели представляли собой сэндвич-иммуноанализы. Планшет MSD был предварительно покрыт захватывающими антителами в независимых и предварительно определенных точках, и образцы количественно оценивали с помощью стандартной кривой по 8 точкам, полученной с использованием смеси цитокинов (смесь для калибратора провоспалительной панели 1 (человеческая)) от MSD. Стандарты включали 0 пг/мл и следующие диапазоны концентраций: IFNγ (0,37-1500 пг/мл), IL-1β (0,14-589 пг/мл), IL-2 (0,36-1490 пг/мл), IL-6 (0,18-721 пг/мл) и IL-8 (0,14-553 пг/мл).

[591] Планшет MSD (предварительно покрытый захватывающими антителами) перед использованием 3 раза промывали PBST. Стандарты были приготовлены в разбавителе 2 (MSD Кат. No R51BB), а тестовые образцы разбавлены в 2 раза разбавителем 2. Стандарты и разбавленные образцы добавляли в планшет для анализа, и планшет инкубирован в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании. Планшет 3 раза промывали PBST, и в планшет добавляли смесь идентифицирующих антител 1X SULFO TAG. Планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании. После этапа промывки в лунки планшета добавляли 2X буфер для читывания MSD, и планшет считывали с помощью планшет-ридера MSD Sector Imager 600. Нижний предел обнаружения каждого аналита был определен как 2,5 стандартного отклонения выше фона.

[592] Целью иммуноанализа TNFα было количественное определение концентрации NHP TNFα в плазме. Пара антител в этом иммуноанализе реагировала как с человеческим, так и с NHP TNFα. Образцы количественно определяли с использованием стандартной кривой по 8 точкам, полученной из калибратора TNFα человека, концентрация которого находится в диапазоне от 5,6 до 4052 пг/мл и включает 0 пг/мл.

[593] В планшет MSD Small Spot Streptavidin добавляли биотинилированное

захватывающее антитело против NHP TNFα и инкубировали в течение часа при комнатной температуре при встряхивании. Контроли были приготовлены в объединенной плазме, стандарты в разбавителе 43 (MSD Кат № R50AG), а образцы для испытаний разводили в 2 раза в разбавителе 43. Стандарты, контроли и разведенные образцы добавляли в планшет для анализа, и планшет инкубирован в течение 2 часов при комнатной температуры при встряхивании. Планшет 3 раза промывали PBST, и добавляли антитело 1X SULFO TAG против huTNFα. Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После этапа промывки в лунки планшета добавляли 2X буфер для читывания MSD, и планшет считывали с помощью планшет-ридера MSD Sector Imager 600. Нижний предел обнаружения каждого аналита был определен как 2,5 стандартного отклонения выше фона.

[594] Образцы плазмы анализировали на содержание общего IL-10, IL-1Ra, кофеина и панели провоспалительных цитокинов. Анализ LLOQ: общий IL-10=0,3 пг/мл; IL-1Ra=78 пг/мл; и кофеин=25 нг/мл. Концентрация IL-10 в плазме может относиться к концентрации в плазме как природного IL-10, так и IL-10, присоединенного к носителю (например, IL-10 в конструкции доставки IL-10, описанной в настоящем документе).

[595] Компания Valley Biosystems (West Sacramento, CA) проводила введение конструкции доставки IL-10 в нескольких фиксированных дозах у взрослых самцов Macaca fascicularis, подвергшихся лечению. Взрослых NHP перорально лечили капсулами, содержащими фиксированную дозу конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) и 10 мг кофеина (1, 4, 20,5 и 82 мг). Группы лечения описаны в Таблице 45.

Таблица 45 - Краткая информация по группам доз

Группа	N	Путь	Тестируемое изделие	SEQ ID NO: 5 Доза	Доза на животное	Доза Кофеина
A	6 в группе	Пероральное введение	Конструкция доставки IL-10+10 мг кофеина	20,5 мг	Одна капсула 20,5 мг	10 мг
B	6 в группе	Пероральное введение	Конструкция доставки IL-10+10 мг кофеина	82 мг	Четыре капсулы 20,5 мг	40 мг
C	6 в группе	Пероральное введение	Конструкция доставки IL-10+10 мг кофеина	1 мг	Одна капсула 1 мг	10 мг
D	6 в группе	Пероральное введение	Конструкция доставки IL-10+10 мг кофеина	4 мг	Четыре капсулы 1 мг	40 мг

[596] Животных не кормили до взятия образцов крови через 3 часа, после чего им

давали пищу. Для введения препарата животных фиксировали вручную, а между челюстями помещали прикусной блок. Пистолет для таблеток, содержащий дозирующую капсулу, вставляли в заднюю часть ротовой полости, и капсулу высвобождали. Вводили до 4 капсул последовательно, и давали небольшое количество воды, чтобы стимулировать проглатывание. После подтверждения введения препарата прикусной блок удаляли, и освобождали голову.

[597] Образцы крови каждого животного собирали в пробирки с K_2EDTA до введения дозы и через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 24 часа после введения дозы. После взятия образцов через 2 часа животных возвращали в домашние клетки. После физического ограничения путем прямой венозной пункции с использованием головной, бедренной или подкожной вены брали образцы крови, которые преобразовывали в плазму и хранили в замороженном виде при -60°C до отправки.

[598] Результаты

[599] Профили зависимости концентрации общего IL-10 в плазме от времени для всех групп введения препарата представлены На Фиг. 58. После перорального введения конструкции доставки IL-10 в виде капсул в дозе 82 мг (4 капсулы по 20,5 мг) концентрация в плазме общего IL-10 достигала Cmax 1,34 пг/мл при Tmax 2 часа после введения дозы. Введение дозы 20,5 мг (1 капсула по 20,5 мг) конструкции доставки IL-10 также приводило к Tmax через 2 часа после введения дозы со значительно более низкой Cmax (0,45 пг/мл), чем при дозе 82 мг. Tmax для доз 1 мг (1 капсула по 1 мг) и 4 мг (4 капсулы по 1 мг) наступало позже, чем для более высоких доз (4 часа и 3 часа соответственно), и, что примечательно, Cmax для дозы 1 мг была выше, чем у дозы 4 мг (0,39 против 0,27 пг/мл, соответственно). Через 6 часов после введения концентрация общего IL-10 в плазме вернулась к исходному уровню.

[600] Профили зависимости концентрации IL-1Ra в плазме от времени для всех групп введения препарата представлены На Фиг. 59. После перорального введения 82 мг конструкции доставки IL-10 концентрация IL-1Ra NHP в плазме достигала Cmax 26367 пг/мл через 3 часа после введения дозы. Для Cmax при более низких уровнях дозы (1, 4 и 20,5 мг) зависимости «доза-эффект» не наблюдалось. Для всех групп введения препарата концентрация IL-1Ra в плазме возвращалась к исходным уровням через 24 часа после введения дозы.

[601] Концентрация кофеина в NHP в плазме после однократного приема капсул с конструкциями доставки IL-10/кофеином, как указано в Таблице 45, представлена На Фиг. 60. Следует отметить, что животные в группах введения препарата 1 мг (1 капсула x 1 мг) и 20,5 мг (1 капсула x 20,5 мг) получали по 1 дозе 10 мг кофеина, в то время как каждое животное, получавшее дозу 4 мг (4 капсулы). x капсулы по 1 мг) и 82 мг (4 капсулы по 20,5 мг), получало 4 дозы по 10 мг кофеина. Это объясняет значительно более высокую Cmax кофеина, наблюдаемую в группах дозировок 4 и 82 мг (6117 нг/мл и 3793 нг/мл, соответственно), чем в группах дозировок 1 и 20,5 мг (1352 нг/мл и 800 нг/мл, соответственно). Абсорбция кофеина наблюдалась через 2-3 часа после приема

(свидетельствуя об открытии капсул), а Tmax для всех доз составляла 4 часа после приема.

[602] Введение капсул с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) не было связано с какой-либо последовательной тенденцией уровней в плазме IFNγ (Фиг. 61A), IL-1β (Фиг. 61B), IL-2 (Фиг. 61C), IL-8 (Фиг. 61D) или IL-6 (Фиг. 61E), хотя высокая вариабельность и заметное влияние высвобождениеов на средние значения для отдельных моментов времени наблюдались для IFNγ, IL-2, IL-6 и IL-8 в плазме. Аналогичное количественное определение TNFα не показало индукции, поскольку сигналы для всех образцов были ниже предела обнаружения (данные не показаны).

[603] Кроме того, уровни IL-10, IL-1Ra и IFN-γ в плазме оценивали после введения капсул конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) и сравнивали с внутривенным введением конструкции доставки IL-10. (SEQ ID NO:5) (Фиг. 104A-104C). Пероральная доставка конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO:5) приматам, не являющимся человеком, посредством капсул с кишечнорастворимым покрытием повышала уровень IL-1Ra без значительной индукции IFN-γ.

[604] Обсуждение и выводы

[605] Системная концентрация конструкции доставки IL-10 (измеряемая по общему IL-10) значительно превышала исходные уровни при всех уровнях доз (1, 4, 20,5 и 82 мг) и возвращалась к исходным уровням в течение шести часов после введения дозы. По-видимому, не было четкой зависимости от дозы для общего воздействия IL-10, хотя самая высокая доза конструкции доставки IL-10 (82 мг) приводила к самой высокой Cmax. IL-1Ra индуцировался введением конструкции доставки IL-10 во всех группах введения препарата без четкой зависимости от дозы, хотя, что касается общего IL-10, самая высокая доза конструкции доставки IL-10 (82 мг) приводила к самой высокой Cmax.

[606] Концентрацию кофеина в плазме использовали в качестве маркера открытия капсулы и эффективности. Абсорбция кофеина наблюдалась через 2-3 часа после приема (свидетельство открытия капсул), а Tmax для всех доз составляла 4 часа после приема.

[607] Введение капсул с конструкцией доставки IL-10 не связано с какой-либо последовательной тенденцией уровней IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6 или IL-8 в плазме.

[608] Пример 17 - нацеливание на клетки в собственной пластинке

[609] Взрослых самцов крыс Wistar (возраст 7-8 недель) со средним весом приблизительно 250 г использовали для проведения исследований in vivo по изучению нацеливания конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на клетки в собственной пластинке. Крыс анестезировали с помошью ингаляции изофлурана и усыпляли с помошью ингаляции CO_2.

[610] эксперименты начинали с разреза брюшной полости длиной приблизительно 4 см для доступа к средней части тонкой кишки. После выполнения разреза 50 мкл приготовленного раствора конструкции доставки IL-10 (обычно приблизительно 1 мг/мл) вводили в просвет кишечника в область, лишенную пищевых продуктов, через иглу калибра 27 с помощью шприца объемом 1 мл. Брыжейку, прилегающую к месту

инъекции, помечали маркером, и кишку возвращали в брюшную полость, разрез закрывали зажимами.

[611] В определенное время инъецированный кишечник извлекали, хирургически изолировали и промывали изотоническим PBS при 4°C. Промытые, вырезанные образцы фиксировали (4% параформальдегида в PBS) в течение ночи при 4°C перед обезвоживанием через градуированные серии растворов этанол/вода и инкубированием в течение ночи в хлороформе.

[612] Обезвоженные ткани погружали в воск, делали срезы и помещали на предметные стекла из полилизина и обрабатывали для извлечения антигена с использованием цитрата натрия. После этого срезы пермеабилизировали 0,2% Triton-X100 в PBS перед трехкратным промыванием в PBS и блокированием 2% BSA+2% сывороткой животного, чтобы образовались вторичные антитела. Первичные антитела разводили в 1% BSA, 0,1% Triton-X100 в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C в увлажненном воздухе. Флуоресцентные вторичные антитела разводили в 1% BSA, 0,1% Triton-X100 в PBS и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре перед обработкой для конфокальной микроскопии. Иногда для биохимических исследований брали участок кишечника размером приблизительно 1 см в месте инъекции.

[613] Белки определенных типов клеток исследовали с помощью иммунофлуоресценции с использованием конфокальной микроскопии. Компоненты конструкции доставки IL-10 (носитель, также обозначаемый здесь как «cholix» и IL-10) сопровождались раздельными введениями либо поликлонального антитела (pAb), либо моноклонального антитела (mAb) к IL-10, либо pAb или mAb к домену-носителю, чтобы сделать возможной совместную локализацию с доступными pAb или mAb (Таблица 46).

Таблица 46 - Краткая информация о pAb и mAb

Мишень	pAb/ mAb	Вид-объект реактивности	Хозяин	Разбавления для IHC (P)	Меченые Клетки	Кат. №
носитель	pAb		Кролик	1/500		
IL-10	pAb	Человек	Коза	1/25		Ab10775
CD11c					Дендритной клетки	
CD19	mAb	Мышь	Мышь		B клетки	Ab25177
CD34	mAb	Мышь, Человек	Мышь	1/500	эндотелия	Ab187282
CD3	mAb	Крыса	Мышь		T-клетки	Ab185763

[614] Конструкции доставки IL-10 показали небольшую совместную локализацию или отсутствие совместной локализации с LAMP1-позитивными лизосомами в энтероцитах, но действительно скапливались в клетках собственной пластинки, что согласуется с их окончательным потреблением, когда этот белок был направлен на лизосомы (Фиг. 62). Был выполнен 1-минутный импульс, после чего было проведено

исследование динамики времени, которое подтвердило, что через 15 минут большое количество конструкции доставки IL-10 достигло собственной пластинки и проникло в клетки, являющиеся мишенями для компонента-носителя этой конструкции.

[615] Антиген CD11c пометил редкий набор клеток (например, дендритных клеток) в собственной пластинке тощей кишки крысы. Конструкция доставки IL-10 не локализовалась совместно с антигеном CD11c в какой-либо поразительной степени (Фиг. 63). Интересно, что везикулы вблизи апикальной поверхности энтероцитов совместно метятся для CD11c и IL-10, указывая на взаимодействие между белком-носителем и везикулярным компартментом, в котором находится этот антиген.

[616] Конструкция доставки IL-10 не была совместно локализована с несколькими CD19-позитивными клетками (например, B-лимфоцитами) в собственной пластинке (Фиг. 64).

[617] Конструкция доставки IL-10 не была совместно локализована с несколькими CD34-позитивными клетками (например, эндотелием) в собственной пластинке (Фиг. 65).

[618] Конструкция доставки IL-10 продемонстрировала поразительную совместную локализацию с антигеном CD3, что свидетельствует о значительном нацеливании белка-носителя на Т-лимфоциты в собственной пластинке (Фиг. 66). Кроме того, клетки, совместимые с внутриэпителиальными лимфоцитами, также были местом совместной локализации.

[619] Клетки в собственной пластинке тонкой кишки мыши показали некоторые из тех же результатов нацеливания, что наблюдались для крысы. Осложнением этих исследований, однако, является способность человеческого IL-10 распознаваться рецептором мышиного IL-10, что в некоторых случаях приводит к двум возможным результатам для клеток.

[620] В заключение, носитель в конструкции доставки IL-10, используемой для облегчения трансцитоза человеческого IL-10 через энтероциты, по-видимому, обеспечивает доступ к выбранной популяции клеток в собственной пластинке. Судьба носителя в этих клетках-мишенях, по-видимому, пересекается с LAMP1-позитивным компартментом, который, скорее всего, является лизосомой, указывая на его очевидную локальную деструкцию в собственной пластинке. Т-лимфоциты, по-видимому, представляют собой самый крупный тип клеток, присутствующих в собственной пластинке, на которые нацелен носитель, используемый в конструкции доставки IL-10.

[621] Пример 18 - Сравнение таблеток и капсул

[622] Чтобы оценить высвобождение препарата из капсул с конструкциями доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) и сравнить эффективность с эффективностью таблеток, капсулы с конструкциями доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) получали с различными условиями покрытия, от покрытия только HPMC до эудрагитного покрытия с разным приращением веса.

[623] Капсулы только с покрытием HPMC показали значительно более высокую чистоту и концентрацию димеров конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) по

сравнению с капсулами с кишечнорастворимым покрытием. Хотя, как и ожидалось, наличие покрытия эудрагита являлось причиной отсроченного высвобождения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), воздействие на чистоту высвобождаемых димера и количества активных препаратов контрастирует с результатами, полученными для таблеток, покрытых HPMC, в тех же условиях растворения (Фиг. 68).

Исследовали растворение капсул HPMC 1 размера, содержащих 20 мг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) и покрытых различными количествами (от приблизительно 10 мг до приблизительно 35 мг) эудрагит® L30D55 и эудрагит® FS30D с массовым соотношением 50:50. Покрытие эудрагит замедляло высвобождение конструкции доставки IL-10 из капсулы, но оказывало негативное влияние на чистоту димера конструкции доставки IL-10 (% димера) (Фиг. 68). Растворение измеряли на устройстве растворения 4 типа, в проточном режиме, в буфере растворения pH 7,0 при 37°C. Испытание растворения in vitro, которое используется для этих определений, является одним из нескольких стандартных в данной области, особенно для таблеток с пролонгированным высвобождением, см., например, USP <711> Dissolution or Ph. Eur. 2.9.3. Тестирование конструкции доставки IL-10 проводят в устройстве USP 4 (в проточной ячейке, открытый режим, в буфере растворения pH 7,0 при 37°C). Индивидуальные таблетки помещают в устройство, а отбор образцов проводят в указанное время (например, 10, 20, 30 и 60 мин). Отбор образцов проводят путем сбора потока через раствор из труб, ведущих в сливной сосуд. Раствор образцов содержат во флаконах на льду до анализа SEC HPLC. В каждый момент времени определяют концентрацию конструкции доставки IL-10 в образце жидкости (например с подтверждением методом HPLC), тем самым обеспечивая расчет количества, которое высвобождалось из таблетки.

[624] Напротив, для таблеток, покрытие эудрагитом замедляло высвобождение конструкции доставки IL-10 из таблетки, не влияя на чистоту димера конструкции доставки IL-10 (% димера) (Фиг. 69). Таблетки имели композицию таблеток F3, с массой конструкции доставки IL-10 6 мг, с покрытием распылением HPMC, а затем имели массовое соотношение покрытия 50:50 эудрагит® L30D55: эудрагит® FS30D. Были рассмотрены две разных массы эудрагита (8 мг и 20 мг). Растворение измеряли на устройстве 4 типа, в проточном режиме в буфере растворения pH 7,0 при 37°C.

[625] Количество высвобождаемых конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) рассчитывали для таблеток и капсул с различным количеством покрытия (Фиг. 70). Сопутствующие примеси (агрегаты HMW и мономер LMW) количественно определяли с помощью SEC. Суммирование активных (димеров) и примесей давало общее количество конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), связанных с материалами, высвобожденными из лекарственной формы. Полученные результаты далее показали разницу эффективности между таблетками и капсулами в отношении конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[626] В целом, таблетки с покрытием показали сопоставимое высвобождение

димера конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) с таблетками без покрытия. Общее количество веществ, связанных с конструкциями доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), высвобождаемых из таблеток, обычно близко к количеству конструкций доставки IL-10 в таблетке, хотя при более высоких уровнях покрытия наблюдалась некоторая потеря белка. Кроме того, относительная чистота димера конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) при рассмотрении для всех материалов по ходу исследования растворения составляла приблизительно 50% от общего высвобожденного материала для всех таблеток. Капсулы с эудрагитовым покрытием показали относительно низкую долю и величину высвобождения димера конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), а большая часть белка идентифицирована, как агрегаты HMW. Общий высвобожденный белок был также уменьшен, предположительно в результате нерастворимых видов, образующихся при продолжении агрегации.

[627] В этой модели также можно определить степень неактивных компонентов, таких как высокомолекулярные агрегаты и мономер. В группе растворения таблеток, показанной с левой стороны Фиг. 70, таблетку без покрытия использовали в качестве эталона, а композиция покрытия варьировалась от 50:50 (Fs к L30D) до 80:20 (Fs к L30D) при возрастании повышенной массы покрытия 8 мг, 13 мг и 20 мг.

[628] Улучшенные характеристики таблеток относительно капсул могут быть результатом формы API в каждой композиции, природы процесса растворения и/или относительного количества эудрагита.

[629] Масса покрытия таблеток с кишечнорастворимым покрытием может быть значительно меньше, чем капсул, из-за меньшей площади поверхности для данной массы API (спресованная таблетка по сравнению с заполнением порошка в капсулу), а также геометрии поверхности таблетки без соединения между крышкой капсулы и корпусом, что облегчает достижение однородного покрытия таблетки для данной массы. В таблетках можно использовать меньшую толщину покрытия. Таким образом, из-за меньшей площади поверхности и/или меньшей толщины в таблетках может быть меньше полимера (например эудрагита) на количество конструкции доставки IL-10 относительно капсулы.

[630] Кроме того, характер растворения капсулы может быть вредным для высвобождения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Инкапсулированная конструкция доставки IL-10 может относительно свободно вытесняться в порошке из корпуса капсулы. При первоначальном доступе жидкости через растворяющуюся капсулу может смачиваться существенное количество белка (например все). Такое быстрое смачивание может привести к агрегации или иным образом нарушить структуру димера. Напротив, в таблетке конструкция доставки IL-10 может быть смешана и спрессована в нерастворимую матрицу, которая не сразу смачивается всей исходной контактной жидкостью, но распадается и растворяется в течение более длительного периода по мере растворения капсулы. Это может снизить склонность к агрегации во время растворения таблеток и повышать вероятность сохранения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в форме активной димера.

[631] Пример 19 - Сравнение таблеток с покрытием и таблеток без покрытия в устройстве для растворения 4 типа

[632] Предположительно, более низкая чистота димера конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), наблюдаемая при растворении таблеток с покрытием относительно таблеток без покрытия, может отражать одновременное присутствие в растворе растворенных полимеров эудрагита и конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), поскольку ранее было показано, что эта комбинация, является причиной потерм димера конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Однако это может не отражать ситуацию in vivo для растворения таблеток, поскольку материал для покрытия может иметь более ограниченный контакт с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в ЖКТ после перорального введения. Вместо этого, поскольку таблетка движется вдоль кишечника, материал покрытия может постепенно удаляться с сердцевины таблеток до полного высвобождения препарата, отделяя тем самым материалы покрытия от белка.

[633] Для лучшего прогнозирования высвобождения лекарственного средства в ЖКТ осуществляли протекание in vitro по методу с устройством растворения USP 4 типа (Фиг. 98). По сравнению с устройством 2 типа (растворение, проводимое в камере перемешивания без активного потока) устройство 4 типа может работать в «открытом режиме», в результате чего осуществляют постоянный приток среды растворения для поддержания условий многократных поглощений (то есть без локального накопления белка или компонентов таблетки).

[634] Таблетки с конструкциями доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) с покрытием и без покрытия оценивали путем растворения in vitro с использованием устройства 4 типа в открытом режиме (сквозного потока) (Фиг. 69). Как и ожидалось, высвобождение конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) задерживалось в зависимости от увеличения массы покрытия, но на профиль высвобождения (содержание димера) не влияло покрытие, показывая сопоставимую норму чистоты и деградации димера для каждой таблетки (Фиг. 69).

[635] Таблетки с покрытием также показали отложенное высвобождение, но содержание димера конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) было существенно снижено по сравнению с таблетками без покрытия, предположительно из-за несовместимости конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) и эудрагитных полимеров. Ожидается, что устройство 4 типа обеспечивает среду, которая является более типичной для поведения таблетки с конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) с покрытием в ЖКТ, и, таким образом, должно лучше имитировать эффективность in vivo.

[636] Также как мониторинг чистоты димера конструкций доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), во время растворения 4 типа получали количество препарата, высвобождаемого в каждый момент времени, (Фиг. 98). Каждая таблетка показала аналогичную продолжительность высвобождения препарата, при этом увеличение количества покрытия задерживает растворение лекарственного средства. Эти данные подтвердили, что после начала распада таблеток процесс высвобождения проходил аналогичным образом, причем

сердцевина таблетки с покрытием подвергается такому же процессу поверхностной гидратации и дезинтеграции после удаления материала покрытия независимо от толщины покрытия. Таким образом, признак отсроченного высвобождения, обеспечиваемый кишечнорастворимым покрытием, показал небольшое, если вообще какое-либо влияние на качество лекарственного средства в сердцевине таблетки.

[637] Второй набор таблеток, покрытых другой композицией эудрагита, продемонстрировал аналогичные характеристики растворения (Фиг. 99), что дополнительно подтверждает тот факт, что в этих условиях в устройстве 4 типа высвобождение конструкции для доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) не подвергалось значительному влиянию покрытия.

[638] Пример 20 - HPMC-AS покрытие таблеток

[639] Также оценивали альтернативы покрытиям эудрагита. AQOAT® (Shin-Etsu) ацетат сукцинат гипромеллозы (HPMCAS) был выбран из-за его сходных свойств, чувствительных к pH, и из-за характеристики слабой ионной структуры. Эти характеристики контрастируют с сильной ионной структурой эудрагита и могут привести к лучшей совместимости со структурной целостностью конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), во время процессов покрытия таблетки с лекарственным средством и высвобождения лекарственного средства. Был проведен предварительный скрининг совместимости. Эудрагит L30D-55 и FS 30D сравнивали с продуктами AQOAT® AS-HF и AS-MF, которые, как сообщается, становятся растворимыми при pH 6,8 и pH 6,0, соответственно. в Таблице 47 показана чистота димера конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO:5), инкубированной с различными покрывающими средствами в PBS, измеренная по содержанию димера. Инкубация с AS-HF и AS-MF показала небольшой распад или отсутствие распада конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), что свидетельствует о значительном улучшении совместимости лекарственных средств с такими производными как HPMC-AS.

Таблица 47 - методом SEC анализировали совместимость материалов покрытия с конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO:5); инкубацию 2 ч с белком конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO:5) в PBS, целостность структуры.

Компонент	Димер	Мономер	HMW
Конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO:5)	88,1	8,8	3,2
эудрагит FS30D	45,8	12,2	42,0
эудрагит L30D55	12,6	45,2	42,1
HPMCAS-HF	86,2	11,5	2,3
HPMCAS-MF	88,3	8,7	3,0

[640] Таблетки конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), покрытые AS-HF и AS-MF в соотношении 50:50, оценивали путем растворения на устройстве 4 типа (Фиг. 100, Фиг. 101). Было обнаружено, что начальная чистота димера высвобождаемого материала практически идентична чистоте лекарственного вещества (лиофилизированная

конструкция доставки IL-10), что указывает на то, что покрытие HPMCAS оказывает незначительное влияние на чистоту димера конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Задержка высвобождения коррелирует с толщиной покрытия таблетки, показывая сравнимую скорость высвобождения после первоначальной задержки и сходную со скоростью высвобождения таблеток без покрытия, что также указывает на отсутствие негативного воздействия материалов покрытия во время распада таблетки.

[641] Таблетки, покрытые HPMC-AS, продемонстрировали по существу эквивалентные или улучшенные профили высвобождения по сравнению с таблетками с конструкциями доставки IL-10, покрытыми эудрагитом (SEQ ID NO: 5), что характеризовалось чистотой лекарственного средства, скоростью деградации и воздействием лекарственного средства (AUC концентрации димера) in vitro. Это было дополнительно проиллюстрировано тестированием на растворение на устройстве 2 типа (Фиг. 102, Фиг. 103). По сравнению с испытаниями в устройстве для растворения 4 типа влияние несовместимости между покрытием и конструкцией доставки IL-10 в такой обстановке стало более заметным. Фактическое высвобождение in vivo, вероятно, будет более похоже на условия, используемые в устройстве для растворения 4 типа. Тем не менее, в обоих случаях покрытия HPMC-AS продемонстрировали более выгодные профили стабильности лекарственного средства по сравнению с покрытиями эудрагита.

[642] Чистоту димера и концентрацию высвобождаемой конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) наносили на график в зависимости от времени растворения. На устройстве для растворения 2 типа таблетки с увеличенной массой покрытия коррелировали с более длительной задержкой высвобождения. Концентрация лекарственного средства достигала максимальной кумулятивной концентрации через 20-30 минут после первоначального распада, что коррелирует с тем, что наблюдалось при растворении на устройстве 4 типа, когда распад завершался в аналогичный интервал времени после первоначального нарушения покрытия.

[643] Таким образом, материалы покрытия HPMCAS продемонстрировали превосходную химическую совместимость с димерной конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) по сравнению с эудрагитами. Таблетки с конструкцией доставки IL-10, покрытые HPMCAS (SEQ ID NO: 5), продемонстрировали по существу эквивалентные или улучшенные профили высвобождения с точки зрения чистоты димера и воздействия в двух обычно используемых моделях растворения in vitro. Двухстадийное растворение на проточной модели подтвердило, что покрытие чувствительно к pH, поскольку оно было стабильным при более низком pH и становилось лабильным при высоком pH для высвобождения лекарственного средства. Было обнаружено, что покрытие HPMCAS обеспечивает защиту конструкции доставки IL-10 при низком pH. Было обнаружено, что защита лекарственного средства посредством покрытия при низком pH эффективна, поскольку воздействие на лекарственное средство в тесте на растворение остается неизменным при обработке кислотой или без нее.

[644] Пример 21. Оценка фармакокинетики и фармакодинамики конструкции

доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) при введении через ободочную кишку с помощью ректороманоскопии у приматов, отличных от человека

[645] Это не-GLP исследование было проведено для изучения PK и PD у самцов яванских макаков (n=3/группа), которым вводили однократную дозу 1, 3 или 10 мг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) посредством введения через толстую кишку с помощью ректороманоскопии. Раствор конструкции доставки IL-10 (в концентрациях 0,1, 0,3 и 1,0 мг/мл для групп с низкой, средней и высокой дозой соответственно) вводили ректальным путем с помощью ректороманоскопа и шприца, соединенного с распылительной насадкой с углом поворота 360°. Серийные образцы биопсии собирали с помощью ректороманоскопии (до введения дозы, через 0,25, 0,5, 0,75, 8 и 24-28 часов после введения дозы). Серийные образцы плазмы от 0 минут до введения дозы до 24-28 часов после введения дозы собирали для анализа конструкции доставки IL-10.

[646] Концентрация в плазме общего IL-10 и конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5)

[647] Воздействие, определенное по общей концентрации IL-10, в результате однократной дозы конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), доставленной непосредственно в ободочную кишку с помощью ректороманоскопа, было обнаружено в плазме в течение 15 минут после введения (Фиг. 71A). Воздействие общего IL-10 увеличивалось с увеличением дозы, и tmax достигалось в течение одного часа после доставки во всех трех дозовых группах (1, 3 и 10 мг) (Фиг. 71A). В дополнение к общему анализу IL-10 концентрацию конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) определяли с помощью захватывающего антитела против cholix386 в сочетании с идентифицирующим антителом против человеческого IL-10. Концентрация конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) (Фиг. 71B) была в 10 раз ниже, чем у IL-10 в дозах 3 мг и 10 мг (Фиг. 71A). Дозозависимый ответ в конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) не был выявлен между группами. Более низкие концентрации конструкции доставки IL-10 в плазме (SEQ ID NO: 5) по сравнению с общей концентрацией IL-10 означают, что циркулирующая конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) может состоять из расщепленных или иным образом обработанных версий конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), в которой домен cholix386 (SEQ ID NO: 4) больше не был конъюгирован с rhIL-10.

[648] Концентрация IL-1Ra в плазме после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5)

[649] Индукция концентрации IL-1Ra в плазме наблюдалась при всех трех дозах (1, 3 и 10 мг). IL-1Ra был обнаружен в более высоких концентрациях в ответ на дозы 3 и 10 мг по сравнению с дозой 1 мг (Фиг. 71C); однако была обнаружена высокая внутригрупповая вариабельность и не наблюдалось четкого дозозависимого ответа. Отсутствие дозозависимого эффекта при более высоких концентрациях конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) свидетельствует о том, что индукция IL-10 IL-1Ra была насыщена при дозе 10 мг. Общий IL-10 достиг пика приблизительно через 0,5-1 ч (Фиг. 71A), а максимальная концентрация IL-1Ra в плазме последовала через 3-4 ч (Фиг. 71C).

Несмотря на значительные различия в воздействии и выработке IL-1Ra между животными, относительная кинетика общего IL-10 и выявление IL-1Ra позволяет предположить, что индукция IL-1Ra может быть опосредована конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5).

[650] Концентрация провоспалительных цитокинов в плазме после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5)

[651] Введение конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в ободочную кишку не приводило к увеличению системных концентраций провоспалительных цитокинов IFN-γ, IL-1β, IL-2 или IL-8, но IL-6 умеренно индуцировался в группах 3 и 10 мг (Фиг. 72).

[652] Воздействие, оцениваемое по общей концентрации IL-10, от однократной дозы конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), доставленной непосредственно в ободочную кишку с помощью ректороманоскопа, было обнаружено в ткани толстой кишки (Фиг. 105C) и системном кровотоке (Фиг. 105A). Воздействие также оценивали по концентрации IL-1Ra в системном кровотоке (Фиг. 105B). В ткани было обнаружено дозозависимое увеличение общего IL-10, которое достигло пика в первый момент времени отбора образцов, равной 15 минутам. В дополнение к общему анализу IL-10 определяли концентрацию конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в ткани толстой кишки. Концентрации конструкции доставки тканевого IL-10 (SEQ ID NO: 5) не выявили четкой зависимости от дозы среди групп (Фиг. 105D). Концентрация конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) повышалась через 15 минут после доз 1 и 10 мг с высокой вариабельностью, обнаруженной внутри групп.

[653] Концентрация IL-1Ra в ткани толстой кишки после введения конструкции доставки IL-10 через толстую кишку (SEQ ID NO: 5)

[654] Концентрацию IL-1Ra оценивали в ткани толстой кишки NHP после доставки конструкции доставки IL-10 через толстую кишку (SEQ ID NO: 5) в дозах 1, 3 и 10 мг. Высокие концентрации эндогенного IL-1Ra были обнаружены в лизатах ткани толстой кишки на исходном уровне, и концентрация IL-1Ra не увеличивалась в дальнейшем в ответ на конструкцию доставки IL-10 (Фиг. 73).

[655] Фосфорилирование STAT3 в ткани после введения конструкции доставки IL-10 через толстую кишку (SEQ ID NO: 5)

[656] Фосфорилирование STAT3 является ранним последующим событием после активации рецептора IL-10. Фосфорилирование STAT3 исследовали в образцах ткани толстой кишки в несколько моментов времени (15, 30 и 45 минут, 8 часов и 24 часа) после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Более высокие отношения pSTAT3/STAT3 в ткани толстой кишки, свидетельствующие об активации STAT3 в толстой кишке, наблюдались после лечения конструкцией доставки IL-10 при всех испытанных дозах (Фиг. 74).

[657] Анализ концентраций провоспалительных цитокинов в лизатах тканей толстой кишки после внутрикишечного введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5)

[658] Индукции провоспалительных цитокинов в ткани толстой кишки не наблюдалось; однако имелись данные об увеличении концентрации IL-6 в плазме при лечении конструкцией доставки IL-10 (Фиг. 75).

[659] Биопсию толстой кишки в каждый момент времени ткани анализировали на локальную концентрацию конструкции доставки IL-10, общий IL-10, IL-1Ra, растворимые цитокины, активацию STAT3 и экспрессию генов после введения конструкции доставки IL-10. Лечение конструкцией доставки IL-10 активировало ряд противовоспалительных генов, особенно включая CD163, miR24-2 и NOX1, которые играют роль в дифференцировке или функции толерогенных макрофагов M2. Кроме того, STC1, MTNR1A и VNN2 кодируют белки, которые подавляют сигнальный путь NFkβ, путь, посредством которого регулируются ключевые провоспалительные цитокины. Лечение конструкцией доставки IL-10 снижало экспрессию фермента CYP1A1, метаболизирующего лекарственное средство; однако 12-часовое голодание перед лечением могло повлиять на экспрессию CYP1A1 (Фиг. 76). Введение конструкции доставки IL-10 снижало количество провоспалительных генов, включая MHCII и PLA2G2D, которые экспрессируются дендритными клетками и макрофагами. Это согласуется со способностью IL-10 подавлять активацию или дифференцировку этих клеток в сторону провоспалительного иммунного фенотипа. Кроме того, конструкция доставки IL-10 подавляла CCL20 и CCL13, хемоаттрактанты, которые привлекают макрофаги и клетки врожденного иммунитета, соответственно (Фиг. 77). При лечении конструкцией доставки IL-10 также активировался ряд провоспалительных генов, включая матриксные металлопротеиназы: MMP1, MMP3 и MMP19 (Фиг. 78). Важно отметить, что в соответствии с регуляторной функцией IL-10, конструкция доставки IL-10 также повышала ингибитор матриксных металлопротеиназ, TIMP1, а также другие гены восстановления тканей (Фиг. 79) и антимикробные гены (Фиг. 80).

[660] Пример 22. Оценка влияния конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в мышиной модели язвенного колита

[661] Это исследование было проведено для изучения эффективности перорального лечения конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в мышиной модели язвенного колита, индуцированного оксазолоном. Индуцированный оксазолоном колит у мышей представляет собой животную модель UC со сходством гистопатологических характеристик и распределения воспаления, описанных при язвенном колите человека, и может использоваться для скрининга потенциальных терапевтических агентов.

[662] Здоровых молодых самок мышей SJL/J предварительно сенсибилизировали 200 мкл 3% (м/о) раствора оксазолона (4-этоксиметилен-2-фенил-2-оксазолин-5-она) в 100% этаноле, применяемого местно. Через пять дней после предварительной сенсибилизации мышам интраректально вводили 150 мкл 1% оксазолона в 40% этаноле. Мышей контрольной группы предварительно сенсибилизировали 100% этанолом на -5 день с последующим интраректальным введением 150 мкл 40% этанола (без оксазолона). Мышам вводили перорально через желудочный зонд один раз в день (q.d.) конструкцию

доставки IL-10, 5-ASA (100 мг/кг, 15 мышей) или носитель с -5 дня до +6 дня, всего 12 доз. Конструкцию доставки IL-10 предоставляли в четырех различных дозах: 9 мг/кг, 3 мк/кг, 1 мг/кг и 0,3 мг/кг. В каждой группе лечения было 15 мышей, 10 мышей в группе, получавшей носитель, и 5 мышей в контрольной группе, не подвергавшейся лечению.

[663] Образцы крови собирали в микропробирки (BD 365974), содержащие EDTA, и центрифугировали при 500 RCF при комнатной температуре (RT) в течение 10 минут. Собирали супернатанты, переносили в чистую пробирку и повторно центрифугировали при 13000 RCF RT в течение 10 минут. Образцы плазмы разделяли на две аликвоты размером 80-100 мкл и хранили при -80°C. Тощую кишку и подвздошную кишку у каждой выжившей мыши удаляли и очищали от всего фекального содержимого с помощью холодного PBS, и приблизительно 1 см каждого среза подвергали мгновенной заморозке. Толстую кишку (минус слепую кишку) у каждой из выживших мышей удаляли и очищали от всех фекалий с помощью холодного PBS. Регистрировали длину и массу толстой кишки. Образцы вырезали из толстой кишки в разных точках по длине толстой кишки (область 1 проксимально, область 2 посередине, область 3 между областями 2 и 4 и область 4 дистально) и сохраняли в 10% нейтральном формалиновом буфере в течение 24 часов, а затем переносили в 70% EtOH. Эти образцы разрезали и окрашивали гематоксилином и эозином или иммунной флуоресценцией. Участок 3 той же толстой кишки подвергали мгновенной заморозке.

[664] Лечение конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) приводило к улучшению гистопатологии толстой кишки. На Фиг. 81A показано окрашивание гематоксилином и эозином необработанной толстой кишки, а На Фиг. 81B показан срез толстой кишки мыши, которую обрабатывали оксазолоном, чтобы вызвать болезненное состояние, но в фазе лечения вводили носитель. Гистопатология толстой кишки улучшена На Фиг. 81C, на которой показан срез репрезентативной мыши, индуцированной оксазолоном, которой вводили конструкцию доставки IL-10 (8,5 мг/кг).

[665] Лечение пероральной конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) снижало экспрессию маркеров воспаления IL-4 (Фиг. 82A), IL-6 (Фиг. 82B), IL-1β (Фиг. 82C), IL-17A (Фиг. 82D), IL-10 (Фиг. 82E), MIP1α (Фиг. 82F) и GCSF/CSF3 (Фиг. 82G). Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки.

[666] Лечение пероральной конструкцией доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) индуцировало активацию тканевых и циркулирующих биомаркеров. На Фиг. 84 показано, что системная экспрессия IL-1Ra увеличивалась дозозависимым образом при лечении конструкцией доставки IL-10 (дозы показаны на оси x в мг/кг). Лечение 9 мг/кг конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) повышало экспрессию IL-1Ra в толстой кишке по сравнению с носителем (Фиг. 85A), снижало экспрессию IL-1β в толстой кишке по сравнению с носителем (Фиг. 85B) и увеличивало отношение IL-1Ra к IL-1β приблизительно в 2,5 раза (Фиг. 85C). Лечение конструкцией доставки IL-10 увеличивало отношение фосфорилированного STAT3 (pSTAT3) к общему количеству STAT3

приблизительно в 2 раза в ткани тонкой кишки и приблизительно в 3 раза в ткани толстой кишки (Фиг. 86).

[667] Пример 23. Оценка влияния конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на STAT3 в ткани толстой кишки у мышей без воспаления.

[668] Для оценки влияния пероральной конструкции доставки IL-10 на STAT3 в невоспаленной ткани толстой кишки мышам вводили носитель, конструкцию доставки IL-10 (1 мг/кг) или рекомбинантный человеческий IL-10 (rhIL-10, 0,9 мг/кг, эквимолярную дозу по сравнению с дозой конструкции доставки IL-10. Общий STAT3 и фосфорилированный STAT3 (pSTAT3) анализировали с помощью ELISA MSD. На Фиг. 83A показано, что лечение конструкцией доставки IL-10 приводило к приблизительно 50% увеличению отношения pSTAT3 к общему количеству STAT3, в то время как лечение rhIL-10 существенно не изменило отношение pSTAT3 к общему количеству STAT3.

[669] Для оценки влияния конструкции пероральной доставки IL-10 на IL-1Ra в невоспаленной ткани толстой кишки мышам вводили носитель, конструкцию доставки IL-10 (10 мг/кг) или рекомбинантный человеческий IL-10 (rhIL-10, 3 мг/кг, эквимолярную дозу по отношению к дозе конструкции доставки IL-10). Системный IL-1Ra анализировали с помощью ELISA MSD. На Фиг. 83B показано, что уровень системного IL-1Ra увеличился приблизительно в 3 раза у мышей, получавших конструкцию доставки IL-10, в то время как лечение rhIL-10 не приводило к значительному увеличению системных уровней IL-1Ra.

[670] Пример 24. Оценка влияния конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) на иммунный гомеостаз и заживление ран у приматов, отличных от человека.

[671] Для оценки влияния конструкции доставки IL-10 на провоспалительные и противовоспалительные маркеры, конструкцию доставки IL-10 доставляли самцам обезьян Macaca fascicularis (от приблизительно 5 до приблизительно 8 кг) посредством ректороманоскопии толстой кишки с помощью распылительной насадки. Конструкцию доставки IL-10 вводили в дозах 1 мг, 3 мг и 10 мг, приготовленных в альбумине. Лечение конструкцией доставки IL-10 снижало экспрессию провоспалительных маркеров (Фиг. 87), повышало экспрессию противовоспалительных маркеров (Фиг. 88) и повышало экспрессию биомаркеров, связанных с восстановлением тканей и заживлением ран (Фиг. 89).

[672] Пример 25 - Оценка фармакокинетики и фармакодинамики конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) у приматов, отличных от человека

[673] Для сравнения различных путей доставки конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) перорально вводили обезьянам Macaca fasciularis в дозе 1 мг (N=6) или 5 мг (N=6), подкожно в дозе 0,2 мг/кг (N=3) или внутривенно по 0,05 мг/кг (N=3). Для перорального введения конструкцию доставки IL-10 готовили в виде капсул размера 0 с кишечнорастворимым покрытием. Для внутривенного или подкожного введения ее готовили в виде жидкости в лиофилизированной композиции DS. Пероральное введение конструкции доставки IL-10 приводило к минимальным системным уровням IL-10 по

сравнению с подкожным или внутривенным введением (Фиг. 90А). Системные уровни IL-1Ra показаны На Фиг. 90Б. Пероральное введение конструкции доставки IL-10 увеличивало соотношение IL-1Ra/IL-10 приблизительно до 15000:1 при дозе 1 мг и более 20000:1 при дозе 3 мг, в то время как минимальный эффект наблюдался как при подкожном, так и при внутривенном введении (Фиг. 91).

[674] Пример 26 - Оценка поверхностно-активных веществ

[675] Исследовали влияние поверхностно-активных веществ на димеризацию конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) до и после воздействия сдвигового напряжения. В частности, к растворам, содержащим конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO:5), добавляли различные поверхностно-активные вещества, и полученные растворы тестировали перед тем, как подвергнуть воздействию сдвигового напряжения, и после непрерывного вихревого перемешивания со скоростью 800 об/мин в течение 4 часов. Рассматривали следующие поверхностно-активные вещества: (1) контроль (1X PBS, без поверхностно-активного вещества), (2) полисорбат 80 (PS80), 0,1% в 1X PBS, (3) полисорбат 20 (PS20), 0,1% в 1X PBS и полоксамер. 188 (F68), 0,3% в 1X PBS.

[676] После вихревого перемешивания раствор визуально осматривали. Образец без поверхностно-активного вещества был слегка мутным, в то время как образцы с поверхностно-активным веществом после вихревого перемешивания были прозрачными. Мутность (340-360 нм) раствора оценивали после вихревого перемешивания. Без поверхностно-активного вещества поглощение увеличивалось в диапазоне 340-360 нм (Фиг. 92), и увеличение поглощения также наблюдалось при использовании 0,1% PS20.

[677] Проводили SEC-HPLC лекарственных форм конструкции доставки IL-10 до (Фиг. 93) и после (Фиг. 94) вихревого перемешивания (Таблица 48). Эти результаты не показали существенных изменений до и после вихревого перемешивания для всех образцов конструкции доставки IL-10. Однако полисорбат 80 показал увеличение агрегатов и мономеров HMW (конструкции доставки IL-10) перед вихревого перемешивания, что указывает на некоторое дестабилизирующее влияние на конструкцию доставки IL-10. Кроме того, полисорбат 20 показал наибольшее количество мономера перед вихревым перемешиванием, что указывает на некоторую диссоциацию конструкции доставки IL-10. В заключение следует отметить, что поверхностно-активное вещество F68 (полоксамер 188) в концентрации 0,3%, по-видимому, стабилизировало конструкцию доставки IL-10 в 1X PBS при сдвиговом напряжении.

Таблица 48 - Процентное содержание конструкции доставки IL-10 в формах мономера, димера и агрегата (HMW) при оценке с помощью SEC-HPLC перед и после вихревого перемешивания

SEC(%)	Перед вихревым перемешиванием				После вихревого перемешивания			
	контроль	0,3% F68	0,1% PS80	0,1% PS20	контроль	0,3% F68	0,1% PS80	0,1% PS20
HMW	0,57	0,49	3,47	0,9	0,82	0,81	3,43	0,94

Димер	93,6	94	87,3	82,5	92,5	93,5	86,6	82,9
Мономер	5,81	5,5	9,2	16,65	6,73	5,66	10	16,17

[678] Пример 27 - Оценка pSTAT3 in vivo

[679] Проводили исследования на мышах in vivo, в которых биологическую активность человеческого IL-10 после трансцитоза оценивали по его способности стимулировать мышиный рецептор IL-10 и повышать фосфорилирование STAT3 (pSTAT3) в клетках собственной пластинки. Эти исследования показали, что конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) (а не только IL-10 без молекулы-носителя) избирательно транспортируется через эпителиальные клетки и способна повышать фосфорилирование STAT3 в клетках собственной пластинки после транспортировки через эпителиальные клетки. Кроме того, воздействие конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) увеличивалось в тканях кишечника, а системное воздействие сводилось к минимуму.

[680] Внутрипросветная инъекция конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) повышала фосфорилирование STAT3 в клетках собственной пластинки. Тканевую локализацию rhIL-10 и pSTAT3 выявляли с помощью иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии приблизительно через 10 минут после внутрипросветной инъекции конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в тощую кишку мышей Balb/C (Фиг. 107). Большое количество rhIL-10 (SEQ ID NO: 5) проникало через энтероциты. Кроме того, имелась популяция лимфоцитоподобных клеток на базолатеральной поверхности энтероцитов и внутри собственной пластинки, которые были pSTAT3-положительными. Увеличение фосфорилирования pSTAT3 с течением времени показано На Фиг. 108.

[681] Транспортировка конструкции доставки IL-10 через эпителий кишечника была подтверждена на различных мышиных моделях, как показано с помощью конфокальной микроскопии (Фиг. 109).

[682] Весь кишечник мышей выделяли и обрабатывали по методу «швейцарского рулета», и локализацию pSTAT3 определяли с помощью иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии (Фиг. 110). Активность IL-10 была продемонстрирована по всей длине кишечника (во всех сегментах кишечника, включая толстую кишку) после перорального введения путем обнаружения фосфорилирования STAT3 вдоль собственной пластинки, что свидетельствует об активации иммунологического сигнального пути.

[683] Пример 28 - Внутрипросветные инъекции SEQ ID NO: 5 в модели воспалительного заболевания кишечника с переносом Т-клеток

[684] Это исследование было проведено для изучения способности белка-носителя транспортировать rhIL-10 из просвета кишечника в подслизистую область в воспаленной ткани кишечника. Была использована модель переноса Т-лимфоцитов (Т-клеток), поскольку она является хорошо зарекомендовавшей себя моделью индуцированного хронического колита у мышей и представляет многие важные иммунологические признаки, наблюдаемые у пациентов с IBD. Девяти мышам BALB/c и двенадцати мышам SCID, включая девять с колитоподобной моделью воспаления, вводили 20 мкл

тестируемого препарата посредством внутрипросветной инъекции в дистальный отдел подвздошной кишки и проксимальный, средний и дистальный отделы толстой кишки. 159 пмоль конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) вводили здоровым мышам BALB/c и мышам SCID с индуцированным колитом, 159 пмоль rhIL-10 вводили здоровым мышам BALB/c и мышам SCID с индуцированным колитом, и носитель PBS вводили здоровым мышам BALB/c, а также здоровым мышам и мышам SCID с индуцированным колитом (n=3/группа). В каждой группе две мыши были умерщвлены через 10 минут после внутрипросветных инъекций, а одна - через 40 минут после внутрипросветных инъекций. Собирали кишечную ткань и сыворотку. Собранную ткань фиксировали, заливали, делали срезы и окрашивали H&E для гистологической оценки воспалительного статуса. Анализ ELISA для измерения rhIL 10 проводили на лизатах, приготовленных из кишечной ткани и сыворотки (Фиг. 106A-106D).

[685] Гистопатологическая оценка ткани подтвердила воспаление у всех мышей с трансплантированными Т-клетками SCID на всех уровнях толстой кишки.

[686] Измерение rhIL 10 с помощью ELISA в момент времени после 10-минутного воздействия было значительно выше у мышей, которым инъецировали конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), по сравнению с мышами, которым инъецировали только rhIL 10 (Фиг. 106A-106B). Кроме того, конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) транспортируется в воспаленные ткани более эффективно, чем в невоспаленные ткани. В нормальных тканях кишечника поглощение конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) было в два-пять раз выше по сравнению с мышами, которым инъецировали только rhIL 10. В воспаленной ткани уровни rhIL-10, измеренные после инъекции конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), были приблизительно в 10 раз выше, чем уровни, измеренные после введения только rhIL-10 (Фиг. 106B). Рекомбинантный человеческий IL-10, обнаруженный после введения конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), обнаруживался через 40 минут после воздействия в большинстве тканей, но оказался более стабильным в здоровой ткани по сравнению с воспаленной тканью (Фиг. 106C-106D).

[687] Конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), но не введение rhIL 10, приводило к умеренно высокому уровню rhIL 10, обнаруженному в сыворотке здоровых животных в зависимости от времени. У воспаленных животных минимальные количества rhIL-10 были обнаружены в сыворотке как при конструкциях доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5), так и при внутрипросветных инъекциях rhIL-10, что указывает на некоторую легкую неспецифическую утечку в воспаленных тканях кишечника.

[688] Различие в системном воздействии на здоровых мышей по сравнению с больными мышами может быть связано с кишечным «эффектом поглощения», который описывает более высокое количество инфильтрированных иммунных клеток в болезненном состоянии, на которые может быть нацелена конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5). Многочисленные инфильтрирующие лейкоциты, наблюдаемые в гистопатологии в слизистой оболочке кишечника и подслизистой оболочке, ограничивают

конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5)/rhIL 10 собственной пластинкой, в то же время ограничивая системное воздействие. Введение конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) приводило к усиленному кишечному поглощению rhIL 10 в тканях толстой кишки, что свидетельствует о том, что cholix386 облегчает трансцитоз rhIL 10 через эпителий.

[689] Пример 29 - Фаза 1a клинического исследования

[690] Конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) была разработана для оценки безопасности и переносимости, фармакокинетики и фармакодинамики возрастающих однократных пероральных доз конструкции доставки IL-10 у здоровых мужчин (часть A). В части B исследования были собраны ранние данные о безопасности и переносимости, фармакокинетике, фармакодинамике и раннем клиническом ответе после многократных возрастающих доз конструкции доставки IL-10 у пациентов с язвенным колитом (UC) (часть B).

[691] Основная цель состояла в том, чтобы оценить безопасность и переносимость однократных и многократных возрастающих доз конструкции доставки IL-10 у здоровых взрослых добровольцев и пациентов с активным UC. Другими целями исследования были оценка: фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) конструкции доставки IL-10, оценка частоты появления противолекарственных антител против конструкции доставки IL-10, оценка потенциальных PD биомаркеров конструкции доставки IL-10 в плазме и ткани (только часть B), для оценки доставки конструкции доставки IL-10 в ткань толстой кишки на основе ответа на PD и для оценки клинической активности конструкции доставки IL-10 после двух недель лечения у больных с активным UC.

[692] Дизайн исследования фазы 1a

[693] Часть A состояла из повышения однократной возрастающей дозы (SAD) у здоровых добровольцев мужского пола. Было осуществлено шесть когорт, состоящих из перорально вводимых однократных возрастающих доз. Для каждого уровня дозы было включено 6 субъектов, рандомизированных 2:4 для получения однократной дозы плацебо или конструкции доставки IL-10 в 1 день. Выбранные дозы составляли 1 мг, 3 мг, 10 мг, 30 мг, 60 мг и 120 мг.

[694] Предварительные данные фазы 1a

[695] Результаты Части A подтверждают, что конструкция доставки IL-10 безопасна и хорошо переносима. В общей сложности возникло 3 нежелательных явления: 1 из 12 пациентов, получавших плацебо, и 2 из 24 пациентов с активной конструкцией доставки IL-10. Все явления были легкими, самоизлечивающимися нежелательными явлениями. Результаты фармакокинетического анализа для всех доз (1-120 мг) подтвердили, что конструкция доставки IL-10 избирательна в отношении кишечника, поскольку в крови не было обнаружено лекарственного средства.

[696] Доклинические модели идентифицировали периферическую выработку IL-1Ra как маркер взаимодействия IL-10 с IL-10R в лимфоцитах слизистой оболочки. Чтобы определить, активно ли транспортируется конструкция доставки IL-10 через выстилку эпителиальных клеток в собственную пластинку и способна ли она взаимодействовать с

лимфоцитами, оценивали уровни индукции IL-1Ra.

[697] Результаты подтвердили, что конструкция доставки IL-10 способна индуцировать экспрессию IL-1Ra (Фиг. 111). Потеря иммуномодулирующей активности (индукция IL-1Ra) при 60 и 120 мг согласуется с биологией IL10.

[698] Пример 30 - Фаза 1b клинического исследования

[699] Были собраны данные о безопасности, переносимости, фармакокинетике, фармакодинамике и начальном клиническом ответе после многократного возрастания дозы (MAD) конструкции доставки IL-10 у взрослых пациентов с активным UC в течение 14 дней лечения. Лиофилизированную композицию конструкции доставки IL-10 и вспомогательных средств (глицин, сахарозу, полоксамер 188 и фосфат калия) добавляли в капсулы из HPMC размера 0 для приготовления трех разных партий с дозировкой 1 мг, 5 мг и 20 мг. На каждую капсулу наносили покрытие с весовым соотношением 50:50 эудрагит® L30D55: эудрагит® FS30D толщиной от 14,8 до 16,0 мг/см2 и массой приблизительно 76 мг. Капсулы плацебо получали из пустых капсул с аналогичным покрытием.

[700] Дизайн фазы 1b исследования

[701] Как показано На Фиг. 112, фаза 1b исследования состояла из эскалации MAD у взрослых пациентов с активным UC. В общей сложности четыре когорты получали дозы 1 мг, 3 мг, 10 мг или 30 мг конструкции доставки IL-10, рандомизированные 3:1 для получения конструкции доставки IL-10 или плацебо, вводившихся один раз в день в течение четырнадцати дней. Цель исследования заключалась в оценке безопасности конструкции доставки IL-10 и любых изменений активности UC с помощью эндоскопии, гистологии, биомаркеров и образцов сыворотки. Образцы кала и биопсии толстой кишки получали на исходном уровне и на 14 день лечения для оценки фекального кальпротектина, а также гистологического исследования на основе слепого центрального считывания в системе оценки Geboes. Фекальный кальпротектин является объективным маркером клинического ответа в исследованиях UC, а система оценки Geboes является мерой гистологического ответа. Система оценки Geboes в этом примере использовала гистологическую систему оценки 0-22, в которой более высокие баллы представляют более тяжелое заболевание.

[702] Предварительные данные фазы 1b показали, что пероральная конструкция доставки IL-10 хорошо переносится.

[703] Результаты исследования фазы 1b показали, что конструкция пероральной доставки IL-10 хорошо переносилась пациентами с UC. В Таблице 49 показано, что всего наблюдалось 23 TEAE, в том числе три у четырех пациентов, получавших плацебо, и 20 у 12 активных пациентов, получавших конструкцию доставки IL-10. Нежелательные явления в исследовании фазы 1b включали назофарингит и нежелательные явления, связанные с основными симптомами UC, такими как боль в животе, диарея и тошнота. Все нежелательные явления были самоизлечивающимися и легкой или средней степени тяжести, при этом не было нежелательных явлений, потребовавших досрочного

прекращения лечения. Важно отметить, что, в отличие от системно доставляемого IL-10 в предыдущих исследованиях, не наблюдалось нежелательных явлений, связанных с лечением, таких как анемия или тромбоцитопения.

Таблица 49 - нежелательные явления, возникающие при лечении (TEAE), наблюдаемые между активными субъектами и плацебо

	1 мг (n=3)	3 мг (n=3)	10 мг (n=3)	30 мг (n=3)	Все Активные (n=12)	Плацебо (n=4)
# TEAS (% ч)	2 (67%)	7 (67%)	5 (67%)	6 (67%)	20 (67%)	3 (50%)

[704] Предварительные результаты клинического ответа

[705] Фекальный кальпротектин (FCP) является клиническим маркером активности заболевания у пациентов с UC. Значения FCP выше 150 мкг/г коррелируют с активным воспалением. Как видно На Фиг. 113, введение 1 мг и 3 мг конструкции доставки IL-10 приводило к среднему снижению FCP с поправкой на плацебо на 44% и 27% уже через 14 дней приема. Предыдущие клинические исследования системной доставки IL-10 показали снижение активности при более высоких дозах, что также наблюдается при дозах 10 мг и 30 мг конструкции доставки IL-10.

[706] С-реактивный белок (CRP) является биомаркером системного воспаления. При дозах 1 и 3 мг более выраженное снижение уровней CRP наблюдалось у пациентов с UC с исходным уровнем CRP выше 5 мг/л по сравнению с плацебо (Фиг. 114). По своей структуре конструкция доставки IL-10 представляет собой GI-селективный белок и не была обнаружена в системном кровотоке. Тем не менее, снижение уровня CRP предполагает, что лечение пациентов с язвенным колитом с помощью конструкции пероральной доставки IL-10, селективной к желудочно-кишечному тракту, приводило к местной кишечной, а также системной иммуномодулирующей активности, что помогает лечить признаки периферического воспаления.

[707] Система гистологической оценки Geboes представляет собой систему, которая включает инфильтрацию иммунных клеток (лимфоцитов и нейтрофилов) в собственную пластинку и эпителий, а также структуру и разрушение крипт, и наличие изъязвлений и эрозий. При добавлении каждого компонента общая оценка может колебаться от 0 (норма) до 22 (сильное воспаление и разрушение тканей). Для оценки активности конструкции доставки IL-10 в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта биопсию толстой кишки получали в начале исследования, а затем через 14 дней после введения дозы, и баллы Geboes оценивал патологоанатом методом слепого центрального считывания желудочно-кишечного тракта. Конструкция доставки IL-10 снижала количество баллов по шкале Geboes у 60% (6/10) пациентов с активной конструкцией доставки IL-10 по сравнению с 0% (2/10) пациентов, получавших плацебо (Фиг. 115).

[708] На Фиг. 116 показаны гистологические изображения пациента с UC до

введения дозы и после лечения в фазе 1b исследования, которому вводили 10 мг конструкции доставки IL-10, причем показатель Geboes улучшился с 15 до 3 баллов при использовании 22-балльной шкалы, где более высокие баллы указывают на более тяжелую активность заболевания. Изображение до введения дозы показало, что у пациента с UC было разрушение крипт и воспалительный клеточный инфильтрат в толстой кишке на исходном уровне, которые исчезли на изображении после лечения через 14 дней лечения конструкцией доставки IL-10.

[709] Пример 31: Сравнение очистки конструкции доставки IL-10 с сульфитолизом и без него

[710] Конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) очищали от телец включения с использованием процесса, включающего стадию сульфолиза, как описано На Фиг. 2A, или аналогичного процесса, описанного На Фиг. 2B, но который не включал стадии сульфитолиза и фильтрации с тангенциальным потоком между стадиями осветления и рефолдинга. Рефолдинг в обоих процессах проводили при 4°C. Раствор для рефолдинга, используемый в обоих процессах, содержал 1 мМ восстановленного глутатиона, 0,5 мМ окисленного глутатиона, 1 М аргинин-HCl, 250 мМ сахарозы, 100 мМ Трис, pH 8,5 при 4°C, и 2 мМ EDTA. Содержание димера конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) характеризовали с помощью SEC-HPLC после стадии ультрафильтрации/диафильтрации после рефолдинга, но перед AEX-хроматографией с использованием TSKgel SW3000 4 мкм, 4,6/300 от Tosoh Biosciences (Таблица 50) и дополнительно охарактеризованы после хроматографии AEX с помощью хроматограммы Capto Q ImpRes® (GE) (Таблицы 51-52).

Таблица 50 - Процент конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в различных формах (агрегаты, димеры и мономеры с высокой молекулярной массой)

Тип Процесса*	Агрегат %	Димер %	Мономер %
Сульфитолиз SIB (TFF-2 в течение 20 ч at RT)	68	17	8
Без сульфитолиза SIB (2x UF/DF при 4°C)	36	27	22
Без сульфитолиза SIB (2x UF/DF в течение 66 ч RT)	57	22	11

* в скобках приведено описание этапа TFF между рефолдингом и хроматографией AEX

Таблица 51 - Выход конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) после Хроматографии Capto Q

Тип процесса	Груз Capto Q (мг)	Концентрация UFDF (мг/мл)	Объем пула Capto Q (мл)	Выход Capto Q	Чистота димера (%)
Сульфитолиз SIB (97 мл Capto Q)	1680	1,85	270	151	74

Без сульфитолиза SIB (97 мл Capto Q)	1680	1,68	270	262	84

Таблица 52 - Извлечение димера конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) после Хроматографии Capto Q

Тип процесса	Содержание Димера в Грузе Capto Q (%)	Извлечение общего белка Capto Q (%)	Извлечение димера Capto Q (%)	Чистота димера (%)
Сульфитолиз SIB (среднее из 3)	20	17	55	82-83
Сульфитолиз SIB (97 мл Capto Q)	16,5	9	54,5	74
Без сульфитолиза SIB (97 мл Capto Q)	25	15,6	62,4	84

[711] Пример 32: Сравнение очистки конструкции доставки IL-10 с сульфитолизом и без него

[712] Этот пример демонстрирует трансцитоз in vivo конструкции доставки, состоящей из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, в интактных поляризованных эпителиальных клетках кишечника крыс Wistar. Данные демонстрируют, что конструкция доставки быстро и эффективно переносит груз IL-10 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника в собственную пластинку.

[713] Трансцитоз in vivo тестировали с использованием самцов крыс Wistar. Самцов крыс Wistar содержали по 3-5 в клетке с 12/12-часовым циклом свет/темнота, и они весили приблизительно 225-275 г (приблизительно 6-8 недель) на момент введения в исследование. Эксперименты проводились во время световой фазы с использованием протокола без извлечения, в котором использована непрерывная анестезия изофлураном. Был проведен срединный разрез брюшной полости длиной 4-5 см, обнажающий средние отделы тощей кишки. Исходные растворы с концентрацией 3,86×10-5 М конструкции доставки готовили в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS), при этом 50 мкл (на 250 г крысы) вводили путем внутрипросветной инъекции (ILI) с использованием иглы 29-го калибра. Затем брыжейку места инъекции помечали перманентным маркером. По окончании исследования участок размером 3-5 мм, который захватывал отмеченный сегмент кишечника, выделяли и обрабатывали для микроскопической оценки. Эксперименты in vivo проводили в соответствии с Законом Великобритании о животных (научные процедуры) от 1986 г., Директивой Совета Европейского сообщества от 1986 г. (86/609/EEC).

[714] Результаты активности трансцитоза конструкции доставки с SEQ ID NO: 5

показаны На Фиг. 117A-117C. Данные показывают микроскопические изображения, демонстрирующие перенос груза IL-10 через поляризованные эпителиальные клетки кишечника у крыс Wistar в различные моменты времени после люминального введения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 5, в тощую кишку крысы. Конструкция доставки (SEQ ID NO: 5) содержала носитель cholix с SEQ ID NO: 4 (и дополнительно включающий N-концевой метионин), связанный с грузом IL-10, содержащим аминокислоту, указанную в SEQ ID NO: 2, посредством спейсера, содержащего аминокислоту, указанную в SEQ ID NO: 6. Зеленая флуоресценция указывает на присутствие IL-10 (путем окрашивания антителом против IL-10). Синяя флуоресценция указывает на окрашивание DAPI, которым метят ДнК, а красная флуоресценция указывает на присутствие CK-8 (цитокератин-8), с которым может совместно локализоваться носитель происхождения из cholix (например, в надъядерной области эпителиальной клетки) во время трансцитоза. Белые стрелки № 1 выделяют апикальную мембрану эпителиальных клеток, а белые стрелки № 2 выделяют базальную мембрану эпителиальных клеток.

[715] На Фиг. 117A представлена степень трансцитоза IL-10 через одну минуту после люминального введения конструкции доставки с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 5, в тощей кишке крысы. Данные показывают, что транспортировка груза IL-10 из апикального в базальный участок и в собственную пластинку происходила уже через 1 минуту после применения конструкции доставки. Белая стрелка № 3 указывает на присутствие IL-10 в собственной пластинке.

[716] На Фиг. 117B представлена степень трансцитоза IL-10 через пять минут после люминального введения конструкции доставки с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, в тощей кишке крысы. Данные показывают повышенное количество транспортируемого груза IL-10, которое присутствовало в собственной пластинке (см., например, белые стрелки № 3) через 5 минут после люминального введения конструкции доставки.

[717] На Фиг. 117C представлена степень трансцитоза IL-10 через десять минут после люминального введения конструкции доставки с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, в тощей кишке крысы. Данные показывают еще большее количество транспортируемого груза IL-10, которое присутствовало в собственной пластинке (см., например, белые стрелки № 3) через 10 минут после люминального введения конструкции доставки.

[718] Эти данные демонстрируют, что носитель cholix с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4 (и дополнительно содержащей N-концевой метионин), способен быстро и эффективно транспортировать груз IL-10 (SEQ ID NO: 2) через интактные поляризованные эпителиальные клетки кишечника in vivo, о чем свидетельствует присутствие груза IL-10 в собственной пластинке уже через 1 минуту после люминального введения конструкции доставки (SEQ ID NO: 5). В ходе этого эксперимента в собственной пластинке было обнаружено возрастающее количество

транспортируемого IL-10.

[719] Пример 33: элементы конструкции доставки SEQ ID NO: 5 функционально активны in vitro

[720] Этот пример обеспечивает функциональную оценку способности носителя, полученного из cholix (SEQ ID NO: 4), транспортировать груз IL-10 (SEQ ID NO: 2) через кишечный эпителий, что было проверено с использованием поляризованных конфлюэнтных монослоев клеток тонкого кишечника человека, культивируемых на полупроницаемых мембранах in vitro (Фиг. 118). Несмотря на гораздо большую молекулярную массу, конструкция доставки (SEQ ID NO: 5) транспортируется через эти монослои в большей степени, чем рекомбинантный человеческий IL-10 (rhIL-10), демонстрируя, что носитель SEQ ID NO: 5, полученный из cholix, сохраняет свою способность подвергаться апикально-базальному (A→B) трансцитозу. Затем конструкцию доставки (SEQ ID NO: 5) тестировали in vitro, чтобы убедиться, что элемент IL-10 слитого белка является биологически активным. Линию клеток остеосаркомы U2OS, сконструированная для экспрессии двух рецепторов, участвующих в передаче сигнала IL-10 (IL-10RA и IL-10RB), и демонстрирующая люминесцентное событие в результате индуцированной лигандом димеризации рецептора, использовали для тестирования возрастающих доз конструкции доставки, только носителя, полученного из cholix, и только rhIL-10. Конструкция доставки имела 971,4 пМ EC50 по сравнению с 91,53 пМ для rhIL-10 (Фиг. 119), в то время как носитель, полученный из cholix, сам по себе не индуцировал димеризацию IL-10R. Для оценки последующей активности способность конструкции доставки, rhIL-10 или носителя, полученного из cholix, индуцировать фосфорилирование передачи сигнала и активатора фактора транскрипции 3 (STAT3) исследовали с использованием клеток мышиного макрофага J774.2. Конструкция доставки SEQ ID NO: 5 продемонстрировала 263,6 пМ EC50 по сравнению с 40,98 пМ для коммерческого препарата hIL-10 в этом анализе (Фиг. 120). Примечательно, что конструкция доставки имеет уменьшенную амплитуду pSTAT3/общего STAT3 приблизительно на 1,47% по сравнению с hIL-10 на уровне 2,19%. Наконец, предварительная обработка мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) конструкцией доставки SEQ ID NO: 5 приводила к дозозависимому снижению секретируемого фактора некроза опухоли альфа (TNFα, Фиг. 121) и поверхностной экспрессии HLA-DR (Фиг. 122), но не секретируемого IL-6 (Фиг. 123), обычно вызываемому обработкой эндотоксином (липополисахаридом). В совокупности эти данные показывают, что соединение hIL-10 с носителем SEQ ID NO: 4, полученным из cholix, через спейсер последовательности полипептида GS дает химеру, которая сохраняет свойства, необходимые для достижения клеток в собственной пластинке кишечника и для активации сигнальных путей рецептора IL-10 в этом компартменте.

[721] Пример 34: Трансцитоз конструкции доставки SEQ ID NO: 5 in vivo

[722] В этом примере представлена оценка того, может ли конструкция доставки SEQ ID NO: 5 подвергаться эффективному трансцитозу in vivo путем исследования

индукции pSTAT3 с использованием ткани кишечника крысы, выделенной через 40 минут после перорального введения PBS, rhIL-10 или конструкции доставки. Иммунофлуоресцентная микроскопия тканей животных, получавших PBS, не выявила наличия какой-либо иммунореактивности в отношении индукции hIL-10 или pSTAT3 ни в собственной пластинке, ни в эпителии кишечника (Фиг. 124). В некоторых случаях у животных, получавших rhIL-10, наблюдалась индукция pSTAT3 в энтероцитах, но не в клетках собственной пластинки; в ткани не было обнаружено hIL-10 (Фиг. 125). Это наблюдение согласуется с результатами исследований мышей, согласно которым эпителиальные клетки кишечника могут экспрессировать рецепторы IL-10 на своей апикальной поверхности при определенных условиях, связанных с развитием и поддержанием барьерной функции. Ткани, выделенные от животных, получавших конструкцию доставки IL-10 с SEQ ID NO: 5, продемонстрировали значительное количество hIL-10 и большое количество клеток, которые были положительными в отношении pSTAT3, в собственной пластинке (Фиг. 126). Для количественной оценки того, как тестируемые образцы влияли на пути передачи сигнала IL-10 в кишечнике, был проведен анализ изображений: были собраны партии изображений с высокой пропускной способностью, сегментированы по локализации в эпителии и собственной пластинке, а затем по клеточным характеристикам. Полученная картины сегментации позволили создать бинарные карты, которые применяли к данным компонентов, что привело к оценке распределения кишечных ворсинок ядерных клеток pSTAT3+ (Фиг. 127). В тканях, после лечения конструкцией доставки SEQ ID NO: 5, наблюдалась индукция pSTAT3 в клетках как в собственной пластинке, так и в энтероцитах, которая была выше, чем в тканях кишечника, полученных от животных, получавших PBS или rhIL-10.

[723] В этом примере также оценивали, может ли конструкция доставки SEQ ID NO: 5 транспортироваться через воспаленную ткань кишечника. Модель колита на мышах, индуцированного переносом Т-клеток CD4+ CD45RBhigh, использовали в формате ILI, где ~160 пмоль конструкции доставки IL-10 или rhIL-10 вводили в дистальный отдел подвздошной кишки или проксимальные, средние или дистальные отделы толстой кишки в PBS (Фиг. 128). Гистопатологическая микроскопическая оценка тканей кишечника подтвердила воспаление на всех уровнях толстой кишки, но не в подвздошной кишке. Через 10 минут после ILI ткани дистального отдела подвздошной кишки содержали приблизительно в 5 раз более высокие уровни hIL-10 для конструкции доставки SEQ ID NO: 5 по сравнению с обработкой rhIL-10; в воспаленной ткани уровни hIL-10, измеренные после ILI конструкции доставки SEQ ID NO: 5, были приблизительно в 10 раз выше по сравнению с обработкой rhIL-10 (Фиг. 128). Более высокие тканевые уровни hIL-10, наблюдаемые в воспаленной толстой кишке по сравнению с невоспаленным дистальным отделом подвздошной кишки, вероятно, обусловлены различиями в барьерных свойствах этих тканей. Ткани, исследованные через 40 минут после ILI, позволили предположить, что hIL-10, доставленный с помощью конструкции доставки SEQ ID NO: 5, отражал данные, полученные через 10 минут, с более высоким

относительным поглощением, наблюдаемым в невоспаленном дистальном отделе подвздошной кишки (данные не показаны). Важно отметить, что hIL-10 не обнаруживался в системном кровотоке (Фиг. 128).

[724] Были проведены анализы, чтобы гарантировать, что генетическая структура конструкции доставки SEQ ID NO: 5 сохраняет свойства трансцитоза A-B, которые должны быть приданы носителю, полученному из cholix, которые включают рецептор-опосредованное поглощение и везикулярный перенос без нацеливания на путь деградации лизосом в поляризованных энтероцитах. Носитель, полученный из cholix, и элементы hIL-10 слитого белка конструкции доставки SEQ ID NO: 5 оставались вместе во время трансцитоза A-B и внутри собственной пластинки, что позволяло локализовать hIL-10 для точного описания распределения конструкции доставки SEQ ID NO: 5 (Фиг. 129). В то время как везикулы Rab7+ (определяющие поздние эндосомы) присутствовали как в апикальном, так и в базальном везикулярном компартментах энтероцитов, совместная локализация с конструкцией доставки происходила преимущественно в апикальном везикулярном компартменте (Фиг. 130). Везикулы Rab11+, определяющие рециклирующие эндосомы, также наблюдались как в апикальном, так и в базальном компартментах энтероцитов, но, в отличие от Rab7, совместная локализация происходила в основном в базальном везикулярном компартменте (Фиг. 131). Конструкция доставки SEQ ID NO: 5 совместно локализовалась с Rab11 в большей степени по сравнению с Rab7 внутри клеток собственной пластинки (Фиг. 130 и 131).

[725] Белок MAN1 (Lectin, Mannose Binding 1), который находится в промежуточном компартменте эндоплазматического ретикулума-Гольджи (ERGIC) и, как известно, участвует в сортировке или переработке белков и липидов, было показано, что он участвует в трансцитозе cholix. Конструкция доставки SEQ ID NO: 5 также совместно локализовалась с перераспределяющим LMAN1 во время трансцитоза A-B (Фиг. 132): через 1 мин, когда конструкция доставки только входила в люминальную мембрану, LMAN1 локализовался в апикальном компартменте; через 5 мин LMAN1 и некоторое количество интернализированной конструкции доставки SEQ ID NO: 5 присутствовали в надъядерной области, связанной с распределением ERGIC; к 10 мин конструкция доставки SEQ ID NO: 5 и LMAN1 были широко локализованы в базальном компартменте; и к 15 мин степень перераспределения и совместной локализации LMAN1 с конструкцией доставки SEQ ID NO: 5 по всему энтероциту была максимальной. Время перераспределения LMAN1 в базальный компартмент совпадает с присутствием hIL-10, который в конечном итоге обнаруживается в неполяризованных клетках в собственной пластинке, где он не был связан с LMAN1. Это перераспределение LMAN1, связанное с A-B трансцитозом конструкции доставки SEQ ID NO: 5, идентично тому, которое ранее наблюдалось для cholix.

[726] Было показано, что путь трансцитоза A-B, доступный cholix, пересекается с везикулами Rab7+ и LAMP1+; в то время как они являются маркерами как поздних эндосом, так и лизосом, cholix, по-видимому, не перемещается в лизосомоподобные

структуры внутри энтероцитов. Чтобы проверить этот момент для конструкции доставки SEQ ID NO: 5, была проведена совместная локализация LAMP1 и конструкции доставки во времени (Фиг. 133). Ограниченная совместная локализация LAMP1/конструкции доставки наблюдалась в поляризованных энтероцитах через 1 мин после ILI, при этом их распространение не увеличивалось в течение 15-минутного периода времени, необходимого для завершения A-B трансцитоза конструкции доставки. Структуры LAMP1+ в неполяризованных клетках собственной пластинки не обнаруживали совместной локализации с конструкцией доставки SEQ ID NO: 5 через 1 и 5 минут после ILI. Однако наблюдалась обширная совместная локализация конструкции LAMP1/доставки в неполяризованных клетках собственной пластинки через 10 и 15 минут после ILI. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что A-B трансцитоз конструкции доставки SEQ ID NO: 5 завершился в течение 10-15 минут и включал везикулы Rab7+ в апикальном компартменте, везикулы Rab11+ в базальном компартменте, перераспределение LMAN1 и предотвращение лизосомальной судьбы в энтероцитах, подобных к тому, что наблюдалось ранее для A-B трансцитоза cholix. В конечном счете, конструкция доставки доставляется в лизосомоподобные структуры в большой части клеток собственной пластинки, что ограничивает ее системное распространение после A-B трансцитоза.

[727] Пример 35: Макрофаги в собственной пластинке активируются конструкцией доставки SEQ ID NO: 5.

[728] После определения того, что конструкция доставки SEQ ID NO: 5 является биологически активной in vivo, клеточную мишень конструкции доставки исследовали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Демонстрация доставки hIL-10 в собственную пластинку была показана в образцах ткани тощей кишки мыши наряду с индукцией pSTAT3 и мечением иммунных клеток (Фиг. 67). В этот 40-минутный момент времени после перорального введения через желудочный зонд hIL-10 наблюдался в базальной области энтероцитов и в линейных структурах в пределах собственной пластинки, которые соответствовали млечным и/или васкулярным сосудам. Области, прилегающие к обнаруженному hIL-10, продемонстрировали сильную экспрессию pSTAT3 во многих клетках собственной пластинки и, в значительно меньшей степени, в некоторых ядрах поляризованных энтероцитов. Наблюдалась совместная локализация умеренной доли клеток CD3+ в собственной пластинке с pSTAT3: многие клетки CD3+, присутствующие в этом компартменте, не были положительными в отношении pSTAT3, и было много клеток pSTAT3+, которые не были положительными в отношении CD3 (Фиг. 134). Однако, используя специфичный для макрофагов маркер F4/80, авторы наблюдали обширную совместную локализацию с pSTAT3 (Фиг. 135 и 136). Дополнительные примеры мечения F4/80 и pSTAT3 выделены в образцах тканей, полученных из тонкой кишки (Фиг. 137) и толстой кишки (Фиг. 138), полученных после введения мышам через зонд конструкции доставки с SEQ ID NO: 5, которая соответствовала обширной активации IL-10 в популяциях клеток макрофагов в собственной пластинке. Результаты позволяют

предположить, что конструкция доставки SEQ ID NO: 5 в конечном итоге нацелена на CD3+ Т-лимфоциты после трансцитоза A→B, возможно, посредством взаимодействий, управляемых ее элементом-носителем, происходящим из cholix, в то время как макрофаги активно нацеливаются на элемент hIL-10.

[729] Пример 36: Повышение уровня циркулирующего IL-1Ra и системного hIL-10 в ответ на пероральное введение конструкции доставки с SEQ ID NO: 5 у мышей

[730] Воспалительные действия IL-1β модулируются присутствием специфического антагониста рецептора, известного как IL-1Ra. Повышение уровня IL-1Ra в сыворотке может быть вызвано IL-10, что может происходить при отсутствии провоспалительного состояния. Принимая во внимание неопределенность, связанную с тем, сколько и когда биологически активная конструкция доставки высвобождается из желудка для достижения тонкой кишки, а также время ее поглощения и действия в собственной пластинке после перорального введения, авторы исследовали функционирование IL-1Ra у мышей без воспаления в качестве биомаркера действия конструкции доставки IL-10.

[731] Пероральное введение 10 мг/кг конструкции доставки SEQ ID NO: 5 приводило к обнаружению ~50 пМ hIL-10 в системном кровотоке уже через 1 час, с увеличением до ~700 пМ через 4 часа (Фиг. 139). Обнаружение hIL-10 в тканях дистальных отделов тонкой кишки (Фиг. 140) и толстой кишки (Фиг. 141) незначительно превышало исходный уровень через 1 и 2,5 часа, но показало небольшое увеличение с высокой вариабельностью через 4 часа; hIL-10 в лизатах тонкой кишки был приблизительно в 10 раз выше, чем в лизатах толстой кишки. Уровни IL-1Ra в сыворотке значительно повышались через 4 часа (Фиг. 142). Эти результаты продемонстрировали, что начало индукции IL-1Ra происходит через 2,5-4 ч после перорального введения через желудочный зонд, приблизительно в то же время обнаруживаемое повышение уровней hIL-10 в тканях наблюдалось в тканях дистальных отделов тонкой кишки и толстой кишки. Этот результат позволяет предположить, что либо имела место почти немедленная индукция IL-1Ra после поступления конструкции доставки в дистальные отделы тонкой кишки и ткани толстой кишки, либо эта индукция происходила через несколько часов после почти быстрого поглощения конструкции доставки в верхних отделах тонкой кишки после перорального зонда. Чтобы проверить этот вопрос, конструкцию доставки наносили непосредственно на поверхность просвета слизистой оболочки толстой кишки в модели приматов, отличных от человека.

[732] Пример 37: Индукция IL-1Ra после внутрикишечного распыления конструкцией доставки SEQ ID NO: 5 у приматов, отличных от человека (NHP)

[733] Метод местного распыления использовали для введения натощак 1, 3 или 10 мг (общей дозы) конструкции доставки SEQ ID NO: 5 на поверхность просвета слизистой оболочки толстой кишки (проксимальный, средний и дистальный отделы) здоровых отличных от человека приматов (яванских макаков). Это было достигнуто с помощью колоноскопа с соответствующей насадкой-распылителем. Таким образом, можно было бы

получить уточненную информацию о начале и продолжительности индукции IL-1Ra при определенных местных дозах. Уровни циркулирующего IL-1Ra повышались через 2-3 ч после распыления в толстой кишке таким образом, что предполагалось близкое к насыщению этого ответа при самой низкой тестируемой дозе (Фиг. 147). Анализ индукции pSTAT3 в биопсии тканей толстой кишки показал предполагаемый временной ход начала и восстановления до исходного уровня для этого события, который коррелировал с ~15 минутами доставки конструкции SEQ ID NO: 5 для достижения собственной пластинки после люминального применения (Фиг. 148). Обнаруженная изменчивость pSTAT3/общего STAT3 соответствовала проблемам захвата ткани и стабильности в этой модели in vivo. Измерение уровней тканевых конструкций доставки имело схожие проблемы с захватом тканей и стабильностью, показывая низкие и непостоянные количества в собранных образцах тканей (Фиг. 143). Важно отметить, что хотя конструкция доставки SEQ ID NO: 5 могла быть обнаружена в ткани толстой кишки, уровни конструкции доставки в сыворотке были ниже предела обнаружения анализа (Фиг. 145), что согласуется с сохранением этого материала в собственной пластинке кишечника. Поскольку IL-10 может индуцировать клетки для выработки большего количества IL-10, авторы также искали индуцированный IL-10. В течение 15 минут после внутрикишечного распыления конструкции доставки SEQ ID NO: 5 наблюдали дозозависимое и преходящее повышение уровня IL-10 в тканях (Фиг. 144). Уровни IL-10 в сыворотке также повышались дозозависимым образом от количества конструкции доставки, введенной с помощью распыления в толстой кишке (Фиг. 146); эти повышенные уровни в сыворотке, оставаясь в пикомолярном диапазоне, были более устойчивыми, чем наблюдаемые в тканях толстой кишки. Важно отметить, что из-за сходства человеческого и NHP IL-10 показанные значения ELISA могут также включать hIL-10, который каким-то образом отделился от домена-носителя молекулы конструкции доставки. Хотя это нельзя исключать, никакие другие данные не подтверждают это как результат, и представляется вероятным, что большинство, если не все, измеренные тканевые и сывороточные IL-10 представляют собой источник NHP.

[734] Пример 38: Скрининг соли на стабильность димера во время обработки

[735] Скрининг различных солей и концентраций солей проводили для оценки стабильности конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в различных жидких средах. Составы готовили с конструкцией доставки при 20 г/л 10 мМ фосфата натрия при pH 7,0 с солями и концентрациями солей, как указано в Таблице 53. Процент конструкции доставки IL-10, присутствующих в форме димера, мономера и высокомолекулярных агрегатов (HMW Agg), оценивали методом эксклюзионной HPLC, как указано ранее. В Таблице 53 показаны результаты сразу после составления и после 2-дневной инкубации при 25°C. В Таблице 54 показаны результаты для дополнительных концентраций соли в начальный момент времени. Из оцениваемых составов 1X PBS, 150 мМ и 200 мМ NaCl показали наибольшую стабильность. Более высокие концентрации рассматривались для Na2SO4 и NH4SO4 (данные не показаны). Однако было замечено, что конструкция

доставки IL-10 осаждалась во время замены буфера.

Таблица 53 - Процентное содержание димера конструкции доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в различных солевых составах

Лекарственная форма	t°0			25°C, 2 дня		
	HMW Agg	Димер	Мономер	HMW Agg	Димер	Мономер
исходный материал	3,5	88,8	7,7	5,1	86,76	8,2
NaCl 150 мМ.	3,7	91,3	5,0	6,3	83,9	9,8
NaCl 200 мМ.	2,8	91,7	5,4	5,7	84,3	9,97
NaCl 250 мМ.	3,6	91,4	4,97	5,5	84,3	10,1
KCl 50 мМ.	3,5	91,6	4,9	7,0	84,1	8,9
KCl 100 мМ.	3,9	91,5	4,6	7,8	81,5	10,6
KCl 150 мМ.	3,1	91,6	5,3	6,3	83,9	9,8
$MgCl_2$ 25 мМ.	9,6	85,6	4,8	40,8	52,8	6,4
$MgCl_2$ 50 мМ.	8,5	87,2	4,3	31,9	60,5	7,5
$MgCl_2$ 75 мМ.	7,2	86,2	6,6	23,0	67,9	9,0
Na_2SO_4 250 мМ.	3,3	90,9	5,7	5,0	82,5	12,5
Na_2SO_4 500 мМ.	4,2	90,9	4,9	6,7	83,4	9,9
NH_4SO_4 250 мМ.	3,2	89,6	7,1	6,1	79,6	14,3
NH_4SO_4 500 мМ.	3,5	89,7	6,8	8,5	74,1	17,4

Таблица 54 - Процентное содержание димера конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) в различных солевых составах

Буфер	Соль	Концентрация	HMW Agg	Димер	Мономер

исходный материал			3,1	92,3	4,6
10 мМ фосфата натрия	NaCl	150 мМ.	3,3	91,8	4,9
		500 мМ.	2,7	92,0	5,2
		1 М	2,8	91,6	5,6
	Na_2SO_4	25 мМ.	3,1	91,7	5,2
		50 мМ.	2,9	91,9	5,1
		75 мМ.	3,4	91,4	5,2
	NH_4SO_4	25 мМ.	4,1	90,5	5,4
		50 мМ.	2,9	91,9	5,2
		75 мМ.	3,2	91,5	5,3
		100 мМ.	3,2	91,0	5,8

[736] Пример 39: Сравнение различных условий очистки с использованием катионообменных колонок S-650F для конструкции доставки IL-10

[737] Конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) очищали от телец включения с использованием процесса, аналогичного описанному На Фиг. 2B. Рефолдинг проводили при 4°C в растворе для рефолдинга, содержащем 1 мМ восстановленного глутатиона, 0,5 мМ окисленного глутатиона, 1 М аргинин-HCl, 250 мМ сахарозы, 100 мМ Трис, pH 8,5, при 4°C и 2 мМ EDTA. Конструкцию доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) очищали с использованием каждого из трех последовательностей процессов, описанных в Таблицах 55-57. Буфер A для стадии связывания/элюирования CHT в Таблице 56 может также содержать 25 мМ Tris, pH 7,5, 300 мМ NaCl, 5,0 мМ NaPi, 0,5 мМ $CaCl_2$. Используемые колонки описаны в Таблице 58.

[738] Таблица 55: Технологическая последовательность 1

Колонка	Буфер A	Буфер B	Получение Образца	Уравновешивание Колонки	Промывание Колонки	элюирование
Capto Q ImpRes	25 мМ	25 мМ Tris pH	2xUFDF (25 мМ Tris	15% B	15% B	15-40% B, 16 CV

	Tris pH 7,5	7,5, 1 M NaCl	pH 7,5, 150 мМ NaCl)			
S-650F	20 мМ NaPi pH 7,0	20 мМ NaPi pH 7,0, 1 M NaCl	Разбавление 1/1 40 мМ NaPi pH 7,0	20% B	20% B	20-45% B, 10 CV
CHT (FT-режим)	80 мМ NaPi pH 7,0	200 мМ NaPi pH 7,0	Доб. 1 M NaPi pH 7,0 до итоговых 60 мМ (X L x 0,0417)	0% B	100% B	FT-режим

[739] Таблица 56: Технологическая последовательность 2

Колонка	Буфер A	Буфер B	Получение Образца	Уравновешивание Колонки	Промывание Колонки	элюирование
Capto Q ImpRes	25 мМ Tris pH 7,5	25 мМ Tris pH 7,5, 1 M NaCl	2xUFDF (25 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl)	15% B	15% B	15-40% B, 16 CV градиентное элюирование
CHT (Bind/Elute)	25 мМ Tris pH 7,5, 150 мМ NaCl	200 мМ NaPi pH 7,0	нет	0% B	0% B	30% B 2CV Поэтапное элюирование
S-650F	20 мМ NaPi pH 7,0	20 мМ NaPi pH 7,0,	Разведение водой 1:1	20% B	20% B	20-45% B, 10 CV градиентное элюирование

		1 M NaCl				

[740] Таблица 57: Технологическая последовательность 3

Колонка	Буфер A	Буфер B	Получение Образца	Уравновешивание Колонки	Промывание Колонки	элюирование
S-650F	20 мМ NaPi pH 7,0	20 мМ NaPi pH 7,0, 1 M NaCl	2xUFDF (NaPi pH 7,0, 200 мМ)	20% B	20% B	Ступенчатый градиент (45% B), 2-3 CV
Capto Q ImpRes	25 мМ Tris pH 7,5	25 мМ Tris pH 7,5, 1 M NaCl	Разведение 1/2 с 75 мМ Tris pH 7,5	15% B	15% B	15-40% B, 16 CV
CHT (FT-режим)	40 мМ NaPi pH 7,0	200 мМ NaPi pH 7,0	Add 1 M NaPi pH 7,0 до конечный of 60 мМ (X L x 0,064)	0% B	100% B	FT-режим

[741] Таблица 58: колонки

Колонка	DBC	Исходное количество (5 л рефолдинг)	Объем Колонки
Capto Q ImpRes	16 г/л	5 г (20 см ч)	320 мл
S-650F	20 г/л	200 мг (20 см ч)	41 мл
CHT	20 г/л	200 мг (20 см ч)	106 мл

[742] Выход, извлечение и чистоту конструкции доставки IL-10 оценивали после каждой стадии и после каждой технологической последовательности. В Таблице 59 показано сравнение между технологической последовательностью 2 и процессом управления.

[743] Таблица 59: сравнение между технологической последовательностью 2 (PT2) и контролем

название	Процесс	Выход	Чистота	Извлечение
PT2	Capto Q ImpRes CHT этап B/E 80 мМ NaPi S-650F	26 мг	78,5%	1%
Контроль	Capto Q ImpRes CHT градиент B/E	68 мг	78,2	1,5%

[744] Таблица 60: сравнение разных технологических последовательностей

Технологическая последовательность	Хроматография	Чистота	Извлечение	эндотоксин
Контроль*	Capto Q CHT (линейное элюирование)	*85%	-	*8 EU/мг
PT1	Capto Q S-650F CHT (FT режим)	92%	24%	8,9 EU/мг
PT2	Capto Q CHT (Поэтапное элюирование) S-650F	91%	24%	5 EU/мг
PT3	S-650F Capto Q CHT (FT режим)	96%	20%	0,4 EU/мг

* на основании исторических данных

[745] В Таблице 60 представлено сравнение трех различных технологических последовательностей и контрольной технологической последовательности без колонны S-650F. Все три технологические последовательности с очисткой на катионообменной колонке S-650F привели к более высокой чистоте конструкции доставки IL-10. Технологические последовательности 2 и 3 привели к более низким уровням эндотоксина, чем контрольный процесс. Удивительно, что катионообменная смола оказалась пригодной для очистки конструкции доставки IL-10, поскольку катионообменные смолы заряжены

отрицательно и, таким образом, связываются с белками с положительным зарядом. В данном случае конструкция доставки IL-10 имеет расчетную изоэлектрическую точку (pI), равную 5,49, и, таким образом, ожидается, что она будет иметь отрицательный заряд в условиях, традиционно используемых в катионообменной хроматографии. Неожиданно, однако, конструкция доставки IL-10 связалась с катионообменной смолой.

[746] Возможное объяснение связывания конструкции доставки IL-10 со смолой Sulfate-650F заключается в том, что, хотя рассчитанное значение pI для конструкции доставки IL-10 составляет 5,49, каждый домен (cholix и IL-10) сохраняет свои собственные уникальные свойства и имеет локальный pI, который значительно отличается от pI всей конструкции. Например, расчетный pI IL-10 равен 8,1, и в рабочих условиях (например, pH 7) конструкция доставки IL-10 будет иметь положительно заряженный домен IL-10, который связывается с катионообменной смолой.

ПРИМЕР 40: Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое экспериментальное медицинское исследование у взрослых с активным ревматоидным артритом, у которых продемонстрирован неадекватный (частичный) ответ на терапию против TNF.

[747] IL-10 считается главным регулятором врожденной и адаптивной иммунной системы, поскольку он ингибирует не только инфламмасомы, но и многие воспалительные явления, связанные с RA, начиная с активации макрофагов и секреции IL-1, IL-6, TNF-альфа, MMP-1/2 при одновременном снижении системных признаков воспаления и развитии Т-регуляторных клеток.

[748] Пероральная доставка конструкции доставки IL-10 обеспечивает локальную доставку IL-10 в иммунную систему слизистой оболочки ЖКТ, избегая при этом высоких системных уровней лекарственного средства. Обеспечение местной доставки IL-10 в слизистую оболочку ЖКТ также может влиять на системную иммунорегуляцию. Модуляция активности иммунных клеток, когда иммунные клетки проходят через слизистую оболочку ЖКТ, может привести к эффективной системной иммунорегуляции, поскольку эти клетки затем перемещаются по всему телу. Таким образом, направленная доставка IL-10 в иммунную систему слизистой оболочки ЖКТ может вызывать эффективную иммунорегуляцию для лечения, например, субъектов с ревматоидным артритом с повышенной безопасностью.

[749] В этом исследовании оценивают безопасность и переносимость ежедневного перорального приема IL-10 в течение 12 недель с помощью конструкции доставки IL-10 у субъектов с активным ревматоидным артритом, которые продемонстрировали лишь частичный ответ на ингибиторы TNF. В исследовании также оценивают биологическую активность 12-недельного ежедневного перорального лечения конструкцией доставки IL-10 по изменениям показателя активности заболевания 28 (DAS-28) (CRF), упрощенного индекса активности заболевания (SDAI) и индекса клинической активности заболевания. (CDAI). Кроме того, в исследовании изучены фармакокинетические и фармакодинамические эффекты конструкции доставки IL-10 и изучена иммуногенность

конструкции доставки IL-10. В исследовании также оценивается качество жизни (QOL) с помощью опросника оценки состояния здоровья без индекса инвалидизации (HAQ-DI) после 12 недель ежедневного перорального приема IL-10 с помощью конструкции доставки IL-10.

[750] это рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием приблизительно 18 субъектов с активным ревматоидным артритом, у которых был неадекватный (частичный) ответ на терапию против TNF. Субъектов рандомизируют в соотношении 2:1 для получения либо конструкции доставки IL-10, либо плацебо в течение 12 недель. Исследуемая популяция включает взрослых субъектов с активным ревматоидным артритом, у которых был неадекватный (частичный) ответ на терапию против TNF.

[751] Субъектов включают в исследование, если они соответствуют следующим критериям включения. Субъекты в возрасте ≥18 и <75 лет на момент получения информированного согласия. Субъекты имеют диагноз ревматоидный артрит (RA) в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR) 1987 года или 2010 года ACR/Европейской лиги против ревматизма (EULAR). Субъекты получали биологическую терапию против TNF в утвержденных дозах и при введении в течение ≥12 недель, но имели только частичный ответ. Лечение биологическими препаратами в анамнезе должно быть ограничено 1 или 2 препаратами против TNF из числа адалимумаба, инфликсимаба, голимумаба, этанерцепта (включая биоаналоги). У субъектов есть по крайней мере один сустав, показывающий активное заболевание по данным MPT/FOI, и два или более болезненных сустава (из 28 суставов) и 2 или более опухших сустава на этапе скрининга. Субъекты могут продолжать прием стабильных доз против TNF до завершения или до прекращения исследования. Субъекты имеют уровень С-реактивного белка (CRP) ≥0,6 мг/дл (дл) или скорость оседания эритроцитов (ESR) ≥28 миллиметров в час (мм/ч) на этапе скрининга. Субъекты имеют вес ≥30 килограммов (кг) и ≤100 кг. Субъекты должны дать добровольное письменное согласие на участие в этом исследовании. Все субъекты тщательно проинформированы об условиях участия в исследовании, способны понять и должны быть готовы и способны соблюдать все аспекты протокола.

[752] Субъекты исключаются из исследования, если у них есть история болезни, которая может свидетельствовать о повышенном риске или возможных смешанных факторах. Субъектов исключают из исследования, если у них имеется воспалительное относящееся к артриту заболевание, отличное от ревматоидного артрита или синдрома Шегрена, или если у них диагностирован ревматоидный артрит класса IV (в соответствии с пересмотренными критериями классификации общего функционального состояния ACR 1991 г.). Субъекты также исключаются, если они недавно получили препарат иммуноглобулина, препараты крови или живую вакцину. Субъекты исключаются из этого исследования, если у них в анамнезе была тяжелая аллергия (шоковые или анафилактоидные симптомы). Субъекты также исключаются, если у них в анамнезе или в

настоящее время имеется рак или иммунодефицит. Субъекты с инфекционным заболеванием в анамнезе или текущим инфекционным заболеванием также могут быть исключены. Субъекты не должны быть беременными или кормящими и должны дать согласие на использование высокоэффективного метода контрацепции во время и в течение некоторого времени после испытания. Субъекты исключаются из этого исследования, если у них в анамнезе есть какое-либо заболевание или сопутствующее заболевание, которое, по мнению исследователя или вспомогательного исследователя, может поставить под угрозу способность участника безопасно завершить исследование.

Критерии оценки

[753] Субъекты находятся под клиническим наблюдением, включая физические осмотры, гематологию, биохимию, эКГ и анализ мочи. Клиническая эффективность оценивается несколькими различными показателями. Шкала активности заболевания 28 (DAS-28) представляет собой математически рассчитанную непрерывную составную конечную точку с дифференциальным весом, придаваемым каждому из следующих компонентов: количество болезненных суставов (28 суставов), количество опухших суставов (28 суставов), реагент острой фазы и глобальная оценка пациентов с артритом. Упрощенный индекс активности заболевания (SDAI) измеряет количество опухших и болезненных суставов (плечевых, локтевых, лучезапястных, пястно-фаланговых суставов и проксимальных фаланговых суставов кисти), общую оценку активности заболевания и CRP пациентом и врачом. CDAI аналогичен SDAI, но без значения CRP. HAQ-DI оценивает степень трудности, с которой пациент столкнулся за последнюю неделю в восьми сферах повседневной деятельности: одевание и уход за собой, вставание, прием пищи, ходьба, гигиена, дотягивание рук, захват и другие действия. DAS28 (индивидуальная регистрационная форма), SDAI и CDAI оцениваются на исходном уровне, недели 2, 4, 8; и 12; Индекс нетрудоспособности по опроснику для оценки состояния здоровья (HAQ-DI) для оценки изменений физической функции будет оцениваться на исходном уровне и через 4, 8, 12 и 16 недель (через 4 недели после последней дозы).

[754] Уровни в сыворотке конструкции доставки IL-10 и IL-10 оценивают на исходном уровне и в 1 день через 4, 8 и 24 часа после введения дозы и на 2, 4, 8, 12 и 16 неделях.

[755] Оцениваемые фармакодинамические маркеры включают экспрессию моноцитов HLA-DR; IL-1Ra в сыворотке, CRP, амилоид A в сыворотке, VCAM-1, IL-1, IL-6, TNF-альфа, MMP1/2, ESR, EGF и VEGF-альфа: полученные на исходном уровне и в 1 день через 24 часа и на 2, 4, 8, 12 и 16 неделе. Общий/титр уровней конструкции доставки против IL-10 оценивают на 12 и 16 неделе.

[756] Безопасность субъектов будет контролироваться, и субъекты будут исключены из исследования, если у них возникнут нежелательные явления или серьезные нежелательные явления, или клинически значимые лабораторные изменения.

[757] эффективность лечения оценивают как с точки зрения изменения во времени,

так и по завершении терапии и через 4 недели после завершения:

1. DAS-28 (индивидуальная регистрационная форма), SDAI и CDAI;

2. Доля субъектов с DAS-28 менее 2,6;

3. HAQ-DI по сравнению с исходным уровнем; и

4. Изменение реактивов острой фазы воспаления (CRF, ESR).

[758] Изменения конструкции доставки IL-10 и уровней IL-10 в сыворотке по сравнению с исходным уровнем: 1-8 день и 24 часа и на 2, 4, 8 и 12 неделе наносят на график и учитывают. Изменения биомаркеров сравнивают с исходным уровнем для экспрессии моноцитов HLA-DR, сывороточного IL-1Ra, сывороточного амилоида A, VCAM-1, IL-1, IL-6, TNF-альфа, MMP1/2, EGF и VEGF-альфа: исходный уровень и 1 день - в 8 и 24 часа и на 2, 4, 8 и 12 неделе. Частоту появления противолекарственных антител на 12 и 16 неделе сравнивают с исходным уровнем. Положительный результат может быть дополнительным преимуществом в любом из вышеупомянутых параметров при комбинированной терапии по сравнению с одним ингибитором TNF-альфа.

ПРИМЕР 41: экспериментальное медицинское исследование - пациенты с частичным ответом на TNF при язвенном колите

[759] это исследование направлено на оценку эффективности и безопасности конструкции доставки IL-10 у пациентов с активным язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени, у которых имеется частичный ответ на лечение антителами против фактора некроза опухоли α.

[760] В этом исследовании оценивают безопасность и переносимость 12-недельного ежедневного приема IL-10 посредством конструкции пероральной доставки IL-10 у субъектов с язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени, у которых продемонстрирован лишь частичный ответ на ингибиторы моноклональных антител против TNF. В исследовании также оценивается клиническая активность 12-недельного ежедневного приема IL-10 с помощью конструкции пероральной доставки IL-10 по изменениям по модифицированной шкале Мейо, субшкалах MMS и гистопатологии. В этом исследовании изучаются фармакокинетические и фармакодинамические эффекты конструкции доставки IL-10, а также ее иммуногенность.

[761] это открытое исследование с участием приблизительно 12 субъектов с язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени, у которых был неадекватный (частичный) ответ на терапию против TNF. Субъекты получают конструкцию доставки IL-10, соответствующую аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, в течение 12 недель, продолжая получать стабильную дозу терапии против TNF, и наблюдают за безопасностью в течение дополнительных 4 недель.

[762] Исследуемую популяцию составляют взрослые субъекты с активным язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени (4-9 баллов по модифицированной шкале Мейо, исключая GPA, и с эндоскопической вспомогательной шкалой Мейо 2 или 3), у которых был неадекватный (частичный) ответ на терапию моноклональными антителами против TNF.

[763] Потенциальных субъектов оценивают по следующим критериям пригодности. Для включения все пациенты должны предоставить письменное информированное согласие; и быть между 18-75 лет.

[764] Субъекты имеют диагноз язвенного колита в соответствии с рекомендациями Американского колледжа гастроэнтерологии. Субъекты имеют активный UC от умеренной до тяжелой степени на момент скрининга, определяемый как: от 4 до 9 баллов по модифицированной клинической шкале Мейо (MMS) и эндоскопическая подшкала MCS с централизованным считыванием 2 степени или выше, и оценка по подшкале ректального кровотечения MMS 1 балл или выше, и заболевание, распространяющееся на 15 см или более от анального края. Стабильные дозы разрешенных сопутствующих препаратов включают: стабильные пероральные кортикостероиды (то есть $\leq$ 20 мг/день преднизолона, $\leq$ 9 мг/день будесонида) за $\geq$ 2 недель до введения D1; разрешено снижение дозы пероральных кортикостероидов по усмотрению исследователя во время исследования; стабильная пероральная доза 5-аминосалициловой кислоты за $\geq$ 2 недель до введения дозы D1; стабильные дозы пробиотиков за $\geq$ 2 недель до введения D1; и стабильное состояние без диареи за $\geq$ 2 недель до введения дозы D1. Пациенты должны получать терапию против фактора некроза опухоли альфа по поводу язвенного колита и демонстрировать неадекватный (частичный) ответ до введения дозы D1 или не должны были ранее получать терапию против TNF до скрининга; разрешенные средства против TNF включают инфликсимаб (ремикейд), адалимумаб (хумира) и голимумаб (симпони), но исключая этанерцепт.

[765] Пациенты, ранее получавшие лечение циклоспорином или такролимусом, должны прекратить терапию за $\geq$ 4 недель до введения дозы D1. Местные кортикостероиды и местные препараты 5-аминосалициловой кислоты должны быть отменены за $\geq$ 2 недель до введения дозы D1. Прием нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID) должен быть прекращен за $\geq$ 4 недель до введения дозы D1. Тофацитиниб или другие ингибиторы Янус-киназы (JAK) должны быть прекращены за $\geq$ 2 недель до введения дозы D1. Женщины с репродуктивным потенциалом должны иметь отрицательный результат теста на беременность перед включением в исследование. Мужчины и женщины с репродуктивным потенциалом должны быть готовы использовать высокоэффективный метод контрацепции с начала исследования до $\geq$ 3 месяцев после последней дозы исследуемого препарата. Высокоэффективный метод контроля рождаемости определяется как метод, который приводит к низкой частоте неэффективности (менее 1% в год).

[766] Субъекты исключаются из этого исследования, если у них есть любой из следующих критериев исключения, связанных с желудочно-кишечным трактом: неопределенный колит (IBD-U) или подозрение на болезнь Крона, любая колэктомия в анамнезе, наличие илеостомы или колостомы, история или признаки дисплазия слизистой оболочки толстой кишки или синдром короткой кишки.

[767] Субъектов исключают из этого исследования, если они имеют какой-либо из

следующих общих критериев исключения, связанных со здоровьем: беременность или кормление грудью, неспособность соблюдать протокол исследования, по мнению исследователя, дисплазия или злокачественное новообразование в анамнезе в последние 5 лет, за исключением полностью иссеченной базальноклеточной карциномы или плоскоклеточного рака кожи или карциномы in situ шейки матки, цирроз печени или активное злоупотребление алкоголем по мнению исследователя, плохо контролируемый диабет (HbA1c > 8,0%), значительные отклонения на эКГ при скрининге или нарушение функции почек. Субъекты с признаками текущего или предыдущего клинически значимого заболевания, состояния здоровья или результатов медицинского обследования, которые, по мнению исследователя, могут поставить под угрозу безопасность пациента или качество данных, исключаются из этого исследования.

[768] Субъекты находятся под клиническим наблюдением, включая физические осмотры, гематологию, биохимию, эКГ и анализ мочи. Клиническую эффективность оценивают по нескольким разным показателям. Оценивают долю пациентов с клинической ремиссией на 12 неделе. Клиническую ремиссию определяют как дополнительный показатель эндоскопии 0/1, дополнительный показатель ректального кровотечения 0 и дополнительный показатель частоты стула 0 или 1 со снижением по крайней мере на 1 балл по сравнению с исходным уровнем. Клиническая ремиссия также может быть определена как: частота стула =0; стул=0; эндоскопическая оценка 0 или 1 дополнительного показателя частоты стула также может быть как минимум на 1 балл ниже дополнительного показателя частоты стула по сравнению с исходным уровнем (начало исследования) для достижения дополнительного показателя частоты стула=0 или 1.

[769] Оценивают долю пациентов с эндоскопическим ответом. Эндоскопический ответ определяется как балл эндоскопического дополнительного показателя Modified Mayo Clinical Score, равный 0 или 1. Будут оцениваться изменения степени гистологической активности по сравнению с исходным уровнем с использованием системы гистопатологического индекса Geboes или Robarts. Гистологическое исцеление определяется как гистологическая степень=0.

[770] Сывороточные уровни конструкции доставки IL-10 и IL-10 оценивают на исходном уровне и в 1 день, на 2, 4, 8 и 12 неделях.

[771] Оцениваемые фармакодинамические конечные точки включают экспрессию моноцитов HLA-DR; сывороточный IL-1Ra, CRP, ESR, изменения фекального кальпротектина, IL-1, IL-6, TNF-альфа, MMP1/2 и IFNg, полученные в начале исследования, а также в 1 день и на 2, 4, 8, 12 и 16 неделе.

[772] Уровни общего/титра конструкции доставки против IL-10 оценивают на исходном уровне и через 8, 12 и 16 недель. Биопсии толстой кишки на исходном уровне и в конце фазы лечения исследуют с помощью световой микроскопии, иммуногистохимии, проточной цитометрии и генетической информации.

[773] Отслеживают безопасность субъектов, и субъектов исключают из

исследования, если у них возникают нежелательные явления или серьезные нежелательные явления, или клинически значимые лабораторные изменения.

[774] эффективность лечения оценивают как по изменению с течением времени, так и через 4, 8 и 12 недель, а также через 4 недели после завершения:

1. Изменение по модифицированной шкале Мейо;

2. Изменение по подшкале скрытой крови в кале;

3. Изменение по подшкале частоты стула;

4. Изменение по подшкале эндоскопии;

5. Изменение реактивов острой фазы воспаления (CRF, ESR); и

6. Изменение оценки гистопатологии (Geboes или Robarts).

[775] Изменения в конструкции доставки IL-10 и уровнях IL-10 в сыворотке по сравнению с исходным уровнем: 1-8 день и 24 часа, а также 2, 4, 8 и 12 недели нанесены на график и рассмотрены. Изменения биомаркеров по сравнению с исходным уровнем учитывают: экспрессию моноцитов HLA-DR в сыворотке IL-1Ra, IL-1, IL-6, TNF-альфа, MMP1/2, EGF и VEGF-альфа на исходном уровне и в 1 день - на 8 и 24 часа и на 2, 4, 8 и 12 неделе. Частоту появления противолекарственных антител на 12 и 16 неделе сравнивают с исходным уровнем. Конкретные красители будут использоваться для визуализации инфильтрирующих воспалительных клеток и экспрессии HLA-DR в эпителии толстой кишки с помощью иммунохимии и/или проточной цитометрии и генетической информации. Положительный результат может быть дополнительным преимуществом в любом из вышеупомянутых параметров при комбинированной терапии по сравнению с одним ингибитором TNF-альфа.

[776] Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в данном документе, могут быть использованы при практическом применении изобретения. Предполагается, что следующая формула изобретения определяет объем изобретения, и что на охватывает способы и конструкции в пределах объема этой формулы изобретения и их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция доставки, состоящая из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 13.

2. Конструкция доставки по п. 1, при этом конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5.

3. Конструкция доставки по п. 1, при этом конструкция доставки состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 13.

4. Конструкция доставки по любому из пп. 1-3, при этом конструкция доставки является частью гомодимера.

5. Конструкция доставки по любому из пп. 1-4, при этом конструкция доставки находится в композиции, составленной для перорального приема, причем композиция для перорального приема содержит множество конструкций доставки, идентичных конструкции доставки, и при этом по меньшей мере 80% конструкций доставки находятся в форме димера.

6. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту эффективного количества конструкции доставки по любому из пп. 1-5.

7. Способ по п. 6, при этом воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит, проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), целиакию, псориатический артрит или псориаз.

8. Способ по п. 6, при этом воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит.

9. Способ по п. 6, при этом воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона.

10. Способ по п. 6, при этом воспалительное заболевание представляет собой целиакию.

11. Способ рефолдинга конструкции доставки IL-10, причем способ включает:

(i) введение в контакт телец включения, содержащих конструкцию доставки IL-10, с солюбилизирующим раствором, содержащим хаотропное средство, с образованием растворимой конструкции доставки IL-10;

(ii) введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга, содержащим восстановленный глутатион и окисленный глутатион, с образованием подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10; при этом способ не включает введения в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 со средством для сульфитолиза или восстанавливающим средством перед введением в контакт на этапе (ii).

12. Способ по п. 11, при этом конструкция доставки IL-10 содержит носитель.

13. Способ по п. 12, при этом носитель получают из полипептида, секретируемого бактерией.

14. Способ по п. 13, при этом бактерия представляет собой Vibrio cholerae.

15. Способ по п. 14, при этом полипептид, секретируемый Vibrio cholerae, представляет собой полипептид cholix.

16. Способ по любому из пп. 11-15, при этом конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

17. Способ по п. 16, при этом конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

18. Способ по любому из пп. 11-17, при этом раствор для рефолдинга имеет соотношение восстановленного глутатиона и окисленного глутатиона от 0,8:1 до 1,2:1.

19. Способ по любому из пп. 11-18, при этом раствор для рефолдинга содержит от 0,75 мМ до 1,5 мМ восстановленного глутатиона.

20. Способ по любому из пп. 11-19, при этом раствор для рефолдинга содержит от 0,25 мМ до 0,75 мМ окисленного глутатиона.

21. Способ по любому из пп. 11-20, при этом раствор для рефолдинга имеет pH от 7,5 до 8,5.

22. Способ по любому из пп. 11-21, при этом раствор для рефолдинга содержит аргинин, Tris и EDTA.

23. Способ по п. 22, при этом раствор для рефолдинга содержит сахарозу.

24. Способ по любому из пп. 11-21, при этом раствор для рефолдинга содержит аргинин, сахарозу, Tris, EDTA или их комбинации.

25. Способ по п. 22, при этом аргинин присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 900 мМ до 1,1 М.

26. Способ по любому из пп. 22-25, при этом сахароза присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 200 мМ до 300 мМ.

27. Способ по любому из пп. 22-26, при этом Tris присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 75 мМ до 125 мМ.

28. Способ по любому из пп. 22-27, при этом EDTA присутствует в растворе для рефолдинга в концентрации от 1,75 мМ до 2,25 мМ.

29. Способ по любому из пп. 11-28, дополнительно включающий лизис клетки, содержащей тельца включения.

30. Способ по п. 29, при этом клеткой является бактерия.

31. Способ по п. 30, при этом бактерия представляет собой Escherichia coli.

32. Способ по любому из пп. 29-31, при этом лизис включает гомогенизацию при высоком давлении.

33. Способ по любому из пп. 11-32, дополнительно включающий выделение телец включения.

34. Способ по любому из пп. 11-33, при этом хаотропное средство содержит гидрохлорид гуанидина или мочевину.

35. Способ по любому из пп. 11-34, при этом солюбилизирующий раствор дополнительно содержит Tris.

36. Способ по любому из пп. 11-35, при этом введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит по меньшей мере в течение 16 часов.

37. Способ по любому из пп. 11-36, при этом введение в контакт растворимой конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит от 12 часов до 18 часов.

38. Способ по любому из пп. 11-37, при этом введение в контакт конструкции доставки IL-10 с раствором для рефолдинга происходит при температуре от 2°C до 8°C.

39. Способ по любому из пп. 11-38, дополнительно включающий первую стерильную фильтрацию подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10.

40. Способ по п. 39, при этом первая стерильная фильтрация происходит после введения в контакт с раствором для рефолдинга.

41. Способ по п. 40, дополнительно включающий проведение фильтрации с тангенциальным потоком подвергнутой рефолдингу конструкции доставки IL-10.

42. Способ по п. 41, при этом фильтрация с тангенциальным потоком включает в себя диафильтрацию.

43. Способ по п. 42, при этом диафильтрация предусматривает первый диаобъем, второй диаобъем, третий диаобъем и четвертый диаобъем.

44. Способ по п. 43, при этом первый диаобъем и второй диаобъем содержат холодный буфер.

45. Способ по п. 44, при этом третий диаобъем и четвертый диаобъем содержат буфер при комнатной температуре.

46. Способ по п. 44 или 45, при этом холодный буфер и буфер при комнатной температуре содержат Tris и NaCl.

47. Способ обогащения димерами конструкции доставки IL-10 из пула, содержащего конструкции доставки IL-10 в форме димера, в форме мономера и агрегатной форме, причем способ включает:

(i) проведение анионообменной (AEX) хроматографии пула путем связывания димеров конструкции доставки IL-10 с анионообменной колонкой и последующее элюирование димеров конструкции доставки IL-10 из анионообменной колонки, тем самым создавая первое множество фракций, одной из которых является первая фракция, обогащенная конструкциями доставки IL-10 в форме димера; и

(ii) проведение хроматографии с керамическим гидроксиапатитом (CHT) фракции, обогащенной конструкциями доставки IL-10 в форме димера, тем самым создавая второе множество фракций, одной из которых является вторая фракция, дополнительно обогащенная конструкциями доставки IL-10 в форме димера.

48. Способ по п. 47, при этом конструкция доставки IL-10 содержит носитель.

49. Способ по п. 48, при этом носитель получают из полипептида, секретируемого

бактерией.

50. Способ по п. 49, при этом бактерия представляет собой Vibrio cholerae.

51. Способ по п. 50, при этом полипептид, секретируемый Vibrio cholerae, представляет собой полипептид cholix.

52. Способ по любому из пп. 47-51, при этом конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

53. Способ по п. 52, при этом конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

54. Способ по любому из пп. 47-53, дополнительно включающий определение процентного значения конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции первого множества фракций.

55. Способ по п. 54, при этом определение проводят с помощью эксклюзионной хроматографии.

56. Способ по п. 55, при этом эксклюзионная хроматография представляет собой эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC).

57. Способ по п. 47, дополнительно включающий определение процентного значения конструкций доставки IL-10 в форме димера в каждой фракции второго множества фракций.

58. Способ по п. 57, при этом определение проводят с помощью эксклюзионной хроматографии.

59. Способ по п. 58, при этом эксклюзионная хроматография представляет собой эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC).

60. Способ по любому из пп. 47-59, при этом по меньшей мере 75% конструкций доставки IL-10 в первой фракции представляют собой конструкции доставки IL-10 в форме димера.

61. Способ по любому из пп. 47-60, при этом по меньшей мере 80% конструкций доставки IL-10 во второй фракции представляют собой конструкции доставки IL-10 в форме димера.

62. Способ по любому из пп. 47-61, дополнительно включающий проведение фильтрации с тангенциальным потоком второй фракции.

63. Способ по п. 62, при этом фильтрация с тангенциальным потоком включает ультрафильтрацию.

64. Способ по п. 63, дополнительно включающий диафильтрацию.

65. Способ по п. 64, дополнительно включающий проведение стерильной фильтрации второй фракции.

66. Способ по любому из пп. 47-65, при этом способ не включает катионообменную хроматографию.

67. Способ по любому из пп. 47-66, при этом пул содержит подвергнутые

рефолдингу конструкции доставки IL-10, полученные в результате способа по любому из пп. 11-46.

68. Пероральная лекарственная форма, содержащая:

(a) конструкции доставки IL-10;

(b) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств; и

(c) первое покрытие, содержащее два или более сополимера, каждый из которых имеет разный номинальный pH растворения;

при этом пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, чтобы по существу не высвобождать конструкции доставки IL-10 после 1-часового воздействия раствора, имеющего pH 1,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме.

69. Пероральная лекарственная форма по п. 68, при этом раствор, имеющий pH 1,0, представляет собой растворяющую среду, содержащую соляную кислоту.

70. Пероральная лекарственная форма по п. 68 или п. 69, при этом пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 40% конструкции доставки IL-10 через 2 часов воздействия раствора, имеющего pH 7,0, в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме.

71. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-70, при этом по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 25% конструкций доставки IL-10, высвобождаемых через 2 часов воздействия раствора, имеющего pH 7,0, находятся в форме димера.

72. Пероральная лекарственная форма по п. 70 или п. 71, при этом раствор, имеющий pH 7,0, представляет собой цитратно-фосфатный буфер.

73. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-72, при этом конструкция доставки IL-10 содержит носитель.

74. Способ по п. 73, при этом носитель получают из полипептида, секретируемого бактерией.

75. Способ по п. 74, при этом бактерия представляет собой Vibrio cholerae.

76. Способ по п. 75, при этом полипептид, секретируемый Vibrio cholerae, представляет собой полипептид cholix.

77. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 73-76, при этом конструкции доставки IL-10 имеют по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

78. Пероральная лекарственная форма по п. 77, при этом конструкции доставки IL-10 имеют замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

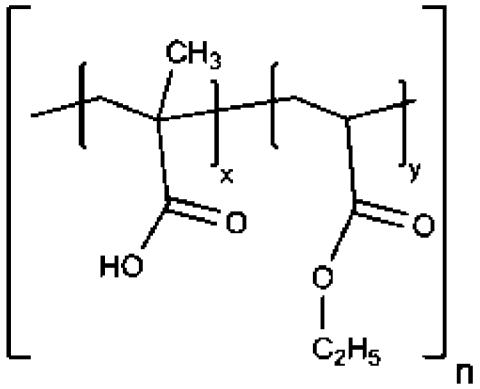
79. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-78, при этом пероральная лекарственная форма находится в капсуле или в таблетке.

80. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-79, при этом первый сополимер имеет по меньшей мере 50% номинальное растворение при pH > 5,5, а второй сополимер имеет по меньшей мере 50% номинальное растворение при pH > 7,0.

81. Пероральная лекарственная форма по п. 80, при этом первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат.

82. Пероральная лекарственная форма по п. 80 или п. 81, при этом первый полимер имеет средневесовую молекулярную массу от 200000 г/моль до 450000 г/моль или от 250000 г/моль до 400000 г/моль или от 280000 г/моль до 370000 г/моль или от 300000 г/моль до 340000 г/моль.

83. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-82, при этом первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице.

84. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-83, при этом соотношение свободных карбоксильных групп и групп сложных эфиров в первом сополимере составляет от 0,8:1 до 1,2:1.

85. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-84, при этом второй сополимер отличается от первого сополимера.

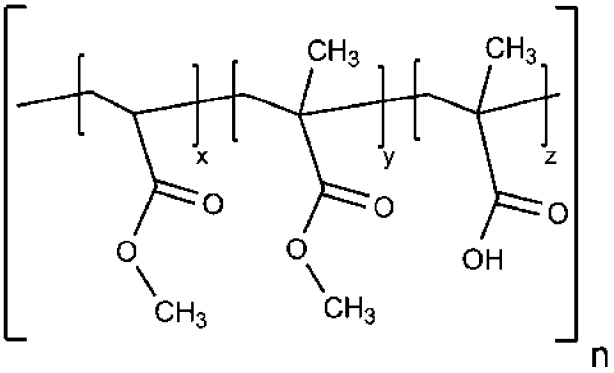
86. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-85, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от 15:85 до 55:45.

87. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-85, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50.

88. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-87, при этом второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат.

89. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-88, при этом второй полимер имеет средневесовую молекулярную массу от 160000 г/моль до 400000 г/моль или от 200000 г/моль до 360000 г/моль или от 240000 г/моль до 320000 г/моль или от 260000 г/моль до 300000 г/моль.

90. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-89, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице.

91. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-90, при этом соотношение свободных карбоксильных групп и групп сложных эфиров во втором сополимере составляет от 0,8:1 до 1,2:1.

92. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 80-91, при этом первое покрытие дополнительно содержит препятствующее слипанию средство, пластификатор, поверхностно-активное вещество или их комбинации.

93. Пероральная лекарственная форма по п. 92, при этом первое покрытие содержит препятствующее слипанию средство, при этом препятствующее слипанию средство содержит моностеарат глицерина.

94. Пероральная лекарственная форма по п. 92 или п. 93, при этом первое покрытие содержит пластификатор, при этом пластификатор представляет собой триэтилцитрат.

95. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 92-94, при этом первое покрытие содержит поверхностно-активное вещество, при этом поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

96. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 92-95, при этом от 5% до 15% (м/м) первого покрытия представляет собой смесь моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80.

97. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-96, при этом первое покрытие имеет толщину, по существу эквивалентную толщине покрытия 60 мг на капсуле 1 размера.

98. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-96, при этом первое покрытие находится вокруг внутренней части в количестве от 0,1 мг/мм^2 до 0,2 мг/мм^2.

99. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-96, при этом первое покрытие имеет массу от 30 мг до 60 мг.

100. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-99, дополнительно содержащее второе покрытие снаружи по отношению к первому покрытию.

101. Пероральная лекарственная форма по п. 100, при этом второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC).

102. Пероральная лекарственная форма по п. 100 или п. 101, дополнительно

содержащая третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи по отношению к конструкциям доставки IL-10 и одному или нескольким фармацевтически приемлемым вспомогательным средствам.

103. Пероральная лекарственная форма по п. 102, при этом третье покрытие содержит HPMC.

104. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-103, при этом конструкции доставки IL-10 имеются в пероральной лекарственной форме в количестве от 1 мг до 20 мг.

105. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-103, при этом конструкции доставки IL-10 имеются в пероральной лекарственной форме в количестве 1 мг, 5 мг или 20 мг.

106. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-105, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество, осмолит, соль и объемообразующее средство.

107. Пероральная лекарственная форма по п. 106, при этом соль представляет собой фосфат калия, объемообразующее средство представляет собой глицин, осмолит представляет собой сахарозу, а поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188.

108. Пероральная лекарственная форма по п. 106 или п. 107, при этом пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение осмолита и конструкции доставки IL-10 от 0,45:1 до 0,55:1, предпочтительно приблизительно 0,5:1.

109. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 106-108, при этом пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение поверхностно-активного вещества и конструкции доставки IL-10 от 0,12:1 до 0,18:1, предпочтительно приблизительно 0,15:1.

110. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 106-109, при этом пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение соли и конструкции доставки IL-10 от 0,05:1 до 0,09:1, предпочтительно приблизительно 0,07:1.

111. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 106-110, при этом пероральная лекарственная форма имеет массовое соотношение объемообразующего средства и конструкции доставки IL-10 от 0,8:1 до 1,2:1, предпочтительно приблизительно 1:1.

112. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-111, при этом пероральная лекарственная форма является твердой.

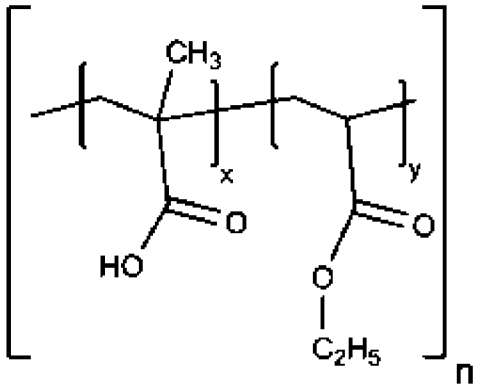
113. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-112, при этом пероральная лекарственная форма находится в форме единичной дозы.

114. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 68-113, при этом пероральная лекарственная форма имеет срок годности по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев.

115. Пероральная лекарственная форма по п. 68, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль калия, глицин, сахарозу или трегалозу и полоксамер, при этом полоксамер имеет средневесовую молекулярную массу от 15000 до 25000 дальтон и содержание полиокситилена от 70% до 90% по массе; и

при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит:

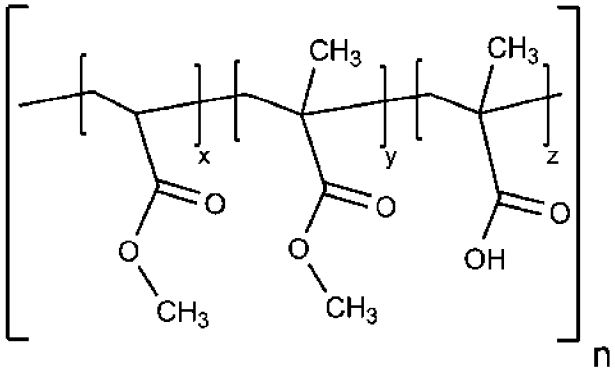
(c) первое покрытие, содержащее первый сополимер, при этом первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице;

и дополнительно содержит второй сополимер, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице;

при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера составляет 30:70; и

при этом первое покрытие дополнительно содержит от 5% до 15% (м/м) смеси моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80;

(d) второе покрытие, содержащее HPMC, расположенную снаружи по отношению к первому покрытию; и

(e) третье покрытие, содержащее HPMC, расположенную внутри по отношению к первому покрытию и снаружи терапевтического груза и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

116. Твердая композиция, содержащая:

конструкции доставки IL-10; и

одно или несколько вспомогательных средств;

при этом каждая из конструкций доставки IL-10 содержит IL-10, соединенный с носителем, который способствует трансцитозу конструкции доставки IL-10 через поляризованную эпителиальную клетку кишечника; и

при этом более 80% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера.

117. Твердая композиция по п. 116, при этом твердую композицию лиофилизируют или сушат распылением.

118. Твердая композиция по п. 116 или п. 117, при этом твердая композиция представляет собой таблетку или капсулу.

119. Твердая композиция по любому из пп. 116-118, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество.

120. Твердая композиция по п. 119, при этом поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер.

121. Твердая композиция по п. 120, при этом полоксамер представляет собой полоксамер 188.

122. Твердая композиция по п. 119, при этом поверхностно-активное вещество не содержит полисорбат.

123. Твердая композиция по любому из пп. 116-122, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит.

124. Твердая композиция по п. 123, при этом осмолит представляет собой сахарозу.

125. Твердая композиция по любому из пп. 116-124, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль.

126. Твердая композиция по п. 125, при этом соль представляет собой фосфат калия.

127. Твердая композиция по любому из пп. 116-126, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство.

128. Твердая композиция по п. 127, при этом объемообразующее средство представляет собой глицин.

129. Твердая композиция по любому из пп. 116-128, при этом IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2.

130. Твердая композиция по любому из пп. 116-129, при этом IL-10 соединен с носителем через линкер.

131. Твердая композиция по п. 130, при этом линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

132. Твердая композиция по любому из пп. 116-131, при этом носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

133. Твердая композиция по любому из пп. 116-131, при этом носитель содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

134. Твердая композиция по любому из пп. 116-132, при этом конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

135. Твердая композиция по п. 134, при этом конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

136. Твердая композиция по любому из пп. 116-135, при этом более 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера.

137. Твердая композиция по любому из пп. 116-135, при этом от 85% до 92% конструкций доставки IL-10 находятся в форме димера.

138. Твердая композиция по любому из пп. 116-137, при этом твердая композиция содержит первое покрытие.

139. Твердая композиция по п. 138, при этом первое покрытие содержит первый сополимер и второй сополимер, при этом первое покрытие находится снаружи конструкций доставки IL-10 и одного или нескольких вспомогательных средств.

140. Твердая композиция по п. 139, при этом первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат.

141. Твердая композиция по п. 139 или п. 140, при этом второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат.

142. Твердая композиция по любому из пп. 139-141, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от приблизительно 15:85 до приблизительно 55:45.

143. Твердая композиция по любому из пп. 139-141, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50.

144. Твердая композиция по любому из пп. 138-143, дополнительно содержащее второе покрытие снаружи по отношению к первому покрытию.

145. Твердая композиция по п. 144, при этом второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC).

146. Твердая композиция по любому из пп. 138-145, дополнительно содержит третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи по отношению к конструкциям доставки IL-10 и одному или нескольким вспомогательным средствам.

147. Твердая композиция по п. 146, при этом третье покрытие содержит HPMC.

148. Твердая пероральная лекарственная форма, содержащая:

(a) конструкцию доставки IL-10, содержащую IL-10, соединенный с носителем,

который способствует трансцитозу конструкции доставки IL-10 через поляризованную эпителиальную клетку кишечника; и

(b) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя неионное смазывающее вещество; и

(c) первое покрытие, окружающее конструкцию доставки IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

149. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 148, при этом неионное смазывающее вещество представляет собой бегенат глицерина.

150. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 148 или п. 149, при этом пероральная лекарственная форма не содержит стеарата магния.

151. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-150, при этом пероральная лекарственная форма имеет форму таблетки.

152. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-151, при этом пероральная лекарственная форма выполнена таким образом, что по существу ни одна из конструкций доставки IL-10 не высвобождается из пероральной лекарственной формы после 1-часового воздействия раствора при pH 1,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме.

153. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-152, при этом пероральная лекарственная форма выполнена с возможностью высвобождения по меньшей мере 40% конструкции доставки IL-10 через 2 часов воздействия раствора при pH 7,0 в устройстве для растворения 4 типа в открытом режиме.

154. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-153, при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит первое покрытие, содержащее два или более сополимера, каждый из которых имеет разный номинальный pH растворения.

155. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-154, при этом по меньшей мере 45% конструкции доставки IL-10 находится в форме димера.

156. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-155, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство, разрыхлитель или их комбинации.

157. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 156, при этом объемообразующее средство представляет собой силикатированную микрокристаллическую целлюлозу (SMCC).

158. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 156, при этом разрыхлитель представляет собой кросповидон (сшитый поливинилпирролидон).

159. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-158, при этом конструкция доставки IL-10 имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

160. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 159, при этом конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

161. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-160, при этом пероральную лекарственную форму получают путем прессования конструкции доставки IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

162. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 161, при этом прессование происходит с усилием прессования от приблизительно 2000 фунтов силы (lbf) до приблизительно 3500 lbf.

163. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 148-162, при этом первое покрытие содержит первый сополимер и второй сополимер, при этом первое покрытие находится снаружи конструкций доставки IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

164. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 163, при этом первый сополимер содержит метакриловую кислоту и этилакрилат.

165. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 163 или п. 164, при этом второй сополимер содержит метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат.

166. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 163-165, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет от приблизительно 15:85 до приблизительно 55:45.

167. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 163-165, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50.

168. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 163-167, дополнительно содержащее второе покрытие снаружи по отношению к первому покрытию.

169. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 168, при этом второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC).

170. Твердая пероральная лекарственная форма по любому из пп. 163-169, дополнительно содержащая третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи по отношению к конструкциям доставки IL-10 и одному или нескольким фармацевтически приемлемым вспомогательным средствам.

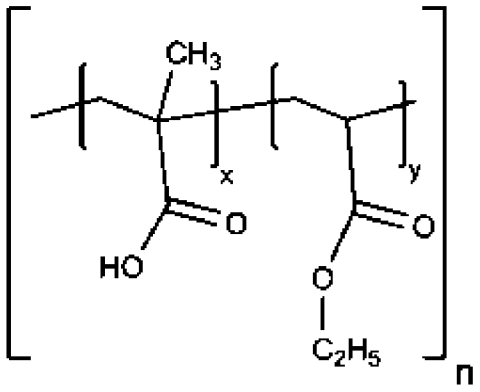
171. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 170, при этом третье покрытие содержит HPMC.

172. Твердая пероральная лекарственная форма по п. 148, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств дополнительно содержат соль калия, глицин, сахарозу или трегалозу и полоксамер, при этом полоксамер имеет средневесовую молекулярную массу от 15000 до 25000 дальтон и содержание полиокситилена от 70% до 90% по массе; и

при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит:

(c) первое покрытие, содержащее первый сополимер, при этом первый сополимер

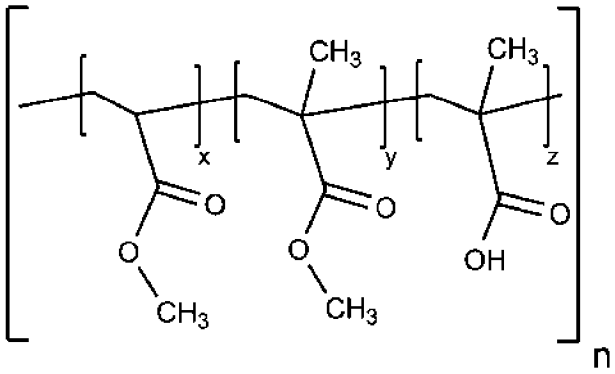
содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице;

и дополнительно содержит второй сополимер, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице;

при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера составляет 30:70; и

при этом первое покрытие дополнительно содержит от 5% до 15% (м/м) смеси моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80;

(d) второе покрытие, содержащее HPMC, расположенную снаружи по отношению к первому покрытию; и

(e) третье покрытие, содержащее HPMC, расположенную внутри по отношению к первому покрытию и снаружи терапевтического груза и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

173. Пероральная лекарственная форма, содержащая: (a) IL-10 и (b) одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение дозы пероральной лекарственной формы индивидууму приводит к иммуномодулирующему ответу, выбранному из группы, состоящей из:

(i) снижения концентрации фекального кальпротектина (FCP) относительно исходного уровня FCP,

(ii) снижения концентрации C-реактивного белка (CRP) относительно исходного

уровня CRP,

(iii) снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes и

(iv) комбинации (i)-(iii).

174. Пероральная лекарственная форма по п. 173, при этом иммуномодулирующий ответ включает снижение FCP относительно исходного уровня FCP.

175. Пероральная лекарственная форма по п. 173 или п. 174, при этом концентрацию FCP определяют из образца кала или биопсии ободочной кишки.

176. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-175, при этом снижение концентрации FCP представляет собой снижение по меньшей мере на 20%, 30%, 40% или 50% относительно исходного уровня FCP.

177. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-176, при этом исходный уровень FCP представляет собой начальную концентрацию FCP у индивидуума перед введением.

178. Пероральная лекарственная форма по п. 177, причем начальная концентрация FCP может быть показателем желудочно-кишечного заболевания индивидуума.

179. Пероральная лекарственная форма по п. 178, причем начальная концентрация FCP составляет более 150 мкг/г.

180. Пероральная лекарственная форма по п. 178 или п. 179, при этом желудочно-кишечное заболевание представляет собой язвенный колит (UC) или болезнь Крона.

181. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 177-180, при этом концентрация FCP снижается по меньшей мере на 50% относительно начальной концентрации FCP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

182. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 174-176, при этом исходный уровень FCP представляет собой скорректированный по плацебо исходный уровень FCP.

183. Пероральная лекарственная форма по п. 182, при этом концентрация FCP снижается по меньшей мере на 20% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня FCP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

184. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 174-183, при этом концентрация FCP снижается до 50 мкг/г или менее.

185. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-184, при этом иммуномодулирующий ответ включает снижение концентрации CRP относительно исходного уровня CRP.

186. Пероральная лекарственная форма по п. 185, при этом концентрация CRP представляет собой системную концентрацию CRP.

187. Пероральная лекарственная форма по п. 185 или п. 186, при этом концентрацию CRP определяют из образца крови.

188. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 185-187, при этом снижение концентрации CRP представляет собой снижение по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% относительно исходного уровня CRP.

189. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 185-188, при этом исходный уровень CRP представляет собой начальную концентрацию CRP у индивидуума перед введением.

190. Пероральная лекарственная форма по п. 189, причем начальная концентрация CRP составляет более 5 мг/л.

191. Пероральная лекарственная форма по п. 189 или п. 190, причем начальная концентрация CRP является показателем желудочно-кишечного заболевания индивидуума.

192. Пероральная лекарственная форма по п. 191, при этом желудочно-кишечное заболевание представляет собой заболевание раздраженного кишечника (IBD).

193. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 189-192, при этом концентрация CRP снижается по меньшей мере на 40% относительно начальной концентрации CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг.

194. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 185-188, при этом исходный уровень CRP представляет собой скорректированный по плацебо исходный уровень CRP.

195. Пероральная лекарственная форма по п. 194, при этом концентрация CRP снижается по меньшей мере на 10% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет приблизительно 3 мг.

196. Пероральная лекарственная форма по п. 194, при этом концентрация CRP снижается по меньшей мере на 40% относительно скорректированного по плацебо исходного уровня CRP, а доза пероральной лекарственной формы составляет приблизительно 1 мг.

197. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 185-196, при этом концентрация CRP снижается до менее 5 мг/л.

198. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-197, при этом иммуномодулирующий ответ включает снижение показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes.

199. Пероральная лекарственная форма по п. 198, при этом исходным уровнем показателя Geboes является исходный показатель Geboes перед введением.

200. Пероральная лекарственная форма по п. 198, при этом исходный уровень показателя Geboes представляет собой скорректированный по плацебо исходный уровень показателя Geboes.

201. Пероральная лекарственная форма по п. 200, при этом показатель Geboes снижается по меньшей мере на 2 единицы относительно скорректированного по плацебо

исходного уровня показателя Geboes, а доза пероральной лекарственной формы составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 30 мг.

202. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-201, при этом менее 5% вводимого IL-10 попадает в кровоток индивидуума.

203. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-202, при этом иммуномодулирующий ответ наблюдается после ежедневного приема дозы пероральной лекарственной формы в течение 14 дней.

204. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-203, при этом доза пероральной лекарственной формы составляет 10 мг или менее.

205. Пероральная лекарственная форма по п. 204, при этом доза пероральной лекарственной формы составляет от 1 мг до 10 мг, от 3 мг до 10 мг или от 1 мг до 3 мг.

206. Пероральная лекарственная форма по п. 204, при этом доза пероральной лекарственной формы составляет 1 мг, 3 мг или 10 мг.

207. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-206, при этом пероральная лекарственная форма представляет собой капсулу.

208. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-207, при этом пероральная лекарственная форма является биоразлагаемой.

209. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-208, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя поверхностно-активное вещество.

210. Пероральная лекарственная форма по п. 209, при этом поверхностно-активным веществом является полоксамер 188.

211. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-210, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя осмолит.

212. Пероральная лекарственная форма по п. 211, при этом осмолит представляет собой сахарозу.

213. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-212, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль.

214. Пероральная лекарственная форма по п. 213, при этом соль представляет собой фосфат калия.

215. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-214, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя объемообразующее средство.

216. Пероральная лекарственная форма по п. 215, при этом объемообразующее средство представляет собой глицин.

217. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-216, при этом пероральная лекарственная форма содержит первое покрытие, при этом первое покрытие находится снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых

вспомогательных средств.

218. Пероральная лекарственная форма по п. 217, при этом первое покрытие содержит первый сополимер, содержащий метакриловую кислоту и этилакрилат, и второй сополимер, содержащий метакриловую кислоту, метилметакрилат и метилакрилат.

219. Пероральная лекарственная форма по п. 218, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет приблизительно от 15:85 до 55:45.

220. Пероральная лекарственная форма по п. 218, при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера в первом покрытии составляет 20:80, 30:70, 40:60 или 50:50.

221. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 217-219, дополнительно содержащее второе покрытие, расположенное внутри по отношению к первому покрытию и снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

222. Пероральная лекарственная форма по п. 221, при этом второе покрытие содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC).

223. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 217-222, дополнительно содержит третье покрытие внутри по отношению к первому покрытию и снаружи IL-10 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

224. Пероральная лекарственная форма по п. 223, при этом третье покрытие содержит HPMC.

225. Пероральная лекарственная форма по любому из пп. 173-224, при этом IL-10 является частью конструкции доставки IL-10, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

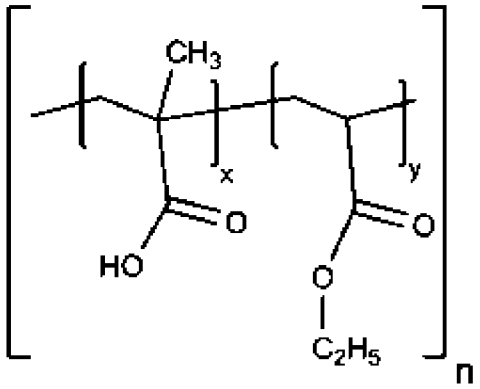
226. Пероральная лекарственная форма по п. 225, при этом конструкция доставки IL-10 содержит носитель.

227. Пероральная лекарственная форма по п. 226, при этом конструкция доставки IL-10 имеет замену V1L в аминокислотной позиции 1 носителя.

228. Пероральная лекарственная форма по п. 173, при этом одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств включают в себя соль калия, глицин, сахарозу или трегалозу и полоксамер, при этом полоксамер имеет средневесовую молекулярную массу от 15000 до 25000 дальтон и содержание полиокситилена от 70% до 90% по массе; и

при этом пероральная лекарственная форма дополнительно содержит:

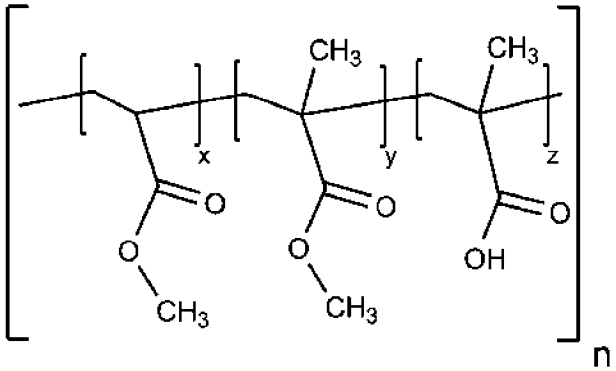
(c) первое покрытие, содержащее первый сополимер, при этом первый сополимер содержит полимер формулы I:



Формула I;

где каждый из x, y и n больше или равен единице;

и дополнительно содержит второй сополимер, при этом второй сополимер содержит полимер формулы II:



Формула II;

где каждый из x, y, z и n больше или равен единице;

при этом соотношение первого сополимера и второго сополимера составляет 30:70; и

при этом первое покрытие дополнительно содержит от 5% до 15% (м/м) смеси моностеарата глицерина, триэтилцитрата и полисорбата 80;

(d) второе покрытие, содержащее HPMC, расположенную снаружи по отношению к первому покрытию; и

(e) третье покрытие, содержащее HPMC, расположенную внутри по отношению к первому покрытию и снаружи терапевтического груза и одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных средств.

229. Способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, при этом введение приводит к иммуномодулирующему ответу, выбранному из группы, состоящей из:

(i) снижения концентрации фекального кальпротектина (FCP) относительно исходного уровня FCP,

(ii) снижения концентрации C-реактивного белка (CRP) относительно исходного

уровня CRP,

(iii) снижения показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes и

(iv) комбинации (i)-(iii).

230. Способ по п. 229, при этом воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, целиакию, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, псориатический артрит или псориаз.

231. Способ по п. 229 или п. 230, при этом пероральная лекарственная форма представляет собой пероральную лекарственную форму по любому из пп. 68-115 или 148-228.

232. Способ модуляции биомаркера у индивидуума с воспалительным заболеванием, причем способ включает введение индивидууму пероральной лекарственной формы, содержащей IL-10 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных средств,

при этом биомаркер выбирают из группы, состоящей из: фекального кальпротектина (FCP), С-реактивного белка (CRP) и их комбинации.

233. Способ по п. 232, при этом введение приводит к снижению концентрации FCP относительно исходного уровня FCP.

234. Способ по п. 232 или п. 233, при этом введение приводит к снижению концентрации CRP относительно исходного уровня CRP.

235. Способ по любому из пп. 232-234, при этом введение дополнительно приводит к снижению показателя Geboes относительно исходного уровня показателя Geboes.

236. Способ по любому из пп. 232-235, дополнительно включающий лечение индивидуума с воспалительным заболеванием.

237. Способ по любому из пп. 232-236, при этом воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей в себя язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), проктит, резервуарный илеит, болезнь Крона, целиакию, рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD), ревматоидный артрит, псориатический артрит или псориаз.

238. Способ по любому из пп. 232-237, при этом пероральная лекарственная форма представляет собой пероральную лекарственную форму по любому из пп. 68-115 или 148-228.

239. Способ лечения воспалительного заболевания у индивидуума, трудно поддающегося лечению или резистентного по меньшей мере к одному противовоспалительному средству, причем способ включает введение индивидууму лекарственной формы, содержащей IL-10.

240. Способ по п. 239, при этом противовоспалительным средством является аминосалицилат.

241. Способ по п. 240, при этом аминосалицилат выбирают из группы, состоящей от 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA; месалазин), 4-аминосалациловой кислоты (4-ASA), балсалазида, олсалазина и сульфасалазина.

242. Способ по любому из пп. 239-241, при этом противовоспалительное средство представляет собой кортикостероид.

243. Способ по п. 242, при этом кортикостероид представляет собой преднизолон.

244. Способ по п. 242 или п. 243, при этом кортикостероид представляет собой вводимый перорально кортикостероид или вводимый внутривенно (IV) кортикостероид.

245. Способ по любому из пп. 239-244, при этом противовоспалительным средством является иммунодепрессант.

246. Способ по п. 245, при этом иммунодепрессант выбирают из группы, состоящей из азатиоприна, 6-меркаптопурина и их комбинации.

247. Способ по любому из пп. 239-246, при этом противовоспалительное средство представляет собой ингибитор TNFα.

248. Способ по п. 247, при этом ингибитор TNFα выбирают из группы, состоящей из адалимумаба, цертолизумаба, этанерцепта, голимумаба и инфликсимаба.

249. Способ по любому из пп. 239-248, при этом по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор янус-киназы (JAK).

250. Способ по п. 249, при этом ингибитор JAK выбирают из группы, состоящей из филготиниба, упадацитиниба, пефицитиниба и тофацитиниба.

251. Способ по любому из пп. 239-250, при этом по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой антагонист рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P).

252. Способ по п. 251, при этом антагонист рецептора S1P выбирают из группы, состоящей из озанимода, амизелимода и этрасимода.

253. Способ по любому из пп. 239-252, при этом по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой блокатор интегрина.

254. Способ по п. 253, при этом блокатор интегрина выбирают из группы, состоящей из этролизумаба, натализумаба, ведолизумаба, абрилумаба и метилкаротеграста.

255. Способ по любому из пп. 239-254, при этом по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор IL-23.

256. Способ по п. 255, при этом ингибитор IL-23 выбирают из группы, состоящей из устекинумаба, мирикизумаба, бразикумаба, гуселкумаба и рисанкизумаба.

257. Способ по любому из пп. 239-256, при этом по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой ингибитор фосфодиэстеразы 4 (PDE4).

258. Способ по п. 257, при этом по меньшей мере один ингибитор PDE4 выбирают из группы, состоящей из апремиласта, циломиласта, рофлумиласта, тетомиласта и ролипрама.

259. Способ по любому из пп. 239-258, при этом по меньшей мере одно противовоспалительное средство представляет собой лаквинимод.

260. Способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает пероральное введение субъекту терапевтического средства IL-10 и введение субъекту иммуносупрессора, отличного от IL-10.

261. Способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает пероральное введение субъекту терапевтического средства IL-10, при этом субъект одновременно получает иммуносупрессор, отличный от IL-10.

262. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, при этом у субъекта наблюдался неадекватный ответ на иммуносупрессор, отличный от IL-10, причем способ включает пероральное введение субъекту терапевтического средства IL-10.

263. Способ по п. 262, Кроме того, включающие введение иммуносупрессора, отличного от IL-10, с терапевтическим средством IL-10.

264. Способ по п. 262, при этом субъект получал лечение иммуносупрессоромом, отличным от IL-10, по меньшей мере в течение 6 недель перед определением неадекватного ответа.

265. Способ по п. 262, при этом субъект получал лечение иммуносупрессоромом, отличным от IL-10, по меньшей мере в течение 12 недель перед определением неадекватного ответа.

266. Способ по п. 262, при этом неадекватный ответ представляет собой частичный ответ.

267. Способ по любому из пп. 260-266, при этом воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: воспалительного заболевания кишечника, псориаза, бляшечного псориаза, гнойного гидраденита, псориатического артрита, ревматоидного артрита, ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бактериального сепсиса, болезни Крона, фикализирующей болезни Крона, язвенного колита средней и тяжелой степени, язвенного колита легкой и средней степени, язвенного колита, коллагенового колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, синдрома Бехчета, неуточненного колита, панкреатита, воспаления печени, резервуарного илеита, проктита, увеита, болезни «трансплантат против хозяина» и повреждения эпителиальных клеток.

268. Способ по любому из пп. 260-267, при этом воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

269. Способ по любому из пп. 260-267, при этом воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из: ревматоидного артрита, язвенного колита и болезни Крона.

270. Способ по любому из пп. 262-266, при этом воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, и у субъекта с неадекватным ответом имеется один или несколько суставов с активным заболеванием.

271. Способ по п. 270, при этом один или несколько суставов с активным заболеванием идентифицируют с помощью флюоресцентной оптической визуализации или магнитно-резонансной томографии.

272. Способ по любому из пп. 270 или 271, при этом у субъекта с неадекватным ответом дополнительно имеется два или более болезненных сустава.

273. Способ по любому из пп. 270-272, при этом у субъекта с неадекватным ответом дополнительно имеется два или более опухающих сустава.

274. Способ по п. 262, при этом воспалительное заболевание представляет собой язвенный колит, и у субъекта с неадекватным ответом имеется язвенный колит от умеренной до тяжелой степени.

275. Способ по п. 274, при этом у субъекта с неадекватным ответом имеется показатель по модифицированной клинической шкале Мэйо (MMS) от приблизительно 4 баллов до приблизительно 9 баллов.

276. Способ по п. 274 или 275, при этом у субъекта с неадекватным ответом имеется централизованно считываемый эндоскопический дополнительный показатель MCS 2 степени или выше.

277. Способ по любому из пп. 274-276, при этом у субъекта с неадекватным ответом имеется дополнительный показатель ректального кровотечения MMS 1 балл или выше.

278. Способ по любому из пп. 274-277, при этом у субъекта с неадекватным ответом болезнь распространяется на 15 см и более от анального края.

279. Способ по любому из пп. 260-278, при этом терапевтическим средством IL-10 является конструкция доставки IL-10.

280. Способ по п. 279, при этом конструкция доставки IL-10 содержит носитель, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4.

281. Способ по п. 279, при этом конструкция доставки IL-10 содержит носитель, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной SEQ ID NO: 4.

282. Способ по п. 279, при этом конструкция доставки IL-10 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

283. Способ по любому из пп. 260-282, при этом иммуносупрессор, отличный от IL-10, представляет собой ингибитор TNF альфа.

284. Способ по п. 283, при этом ингибитор TNF альфа представляет собой моноклональное антитело.

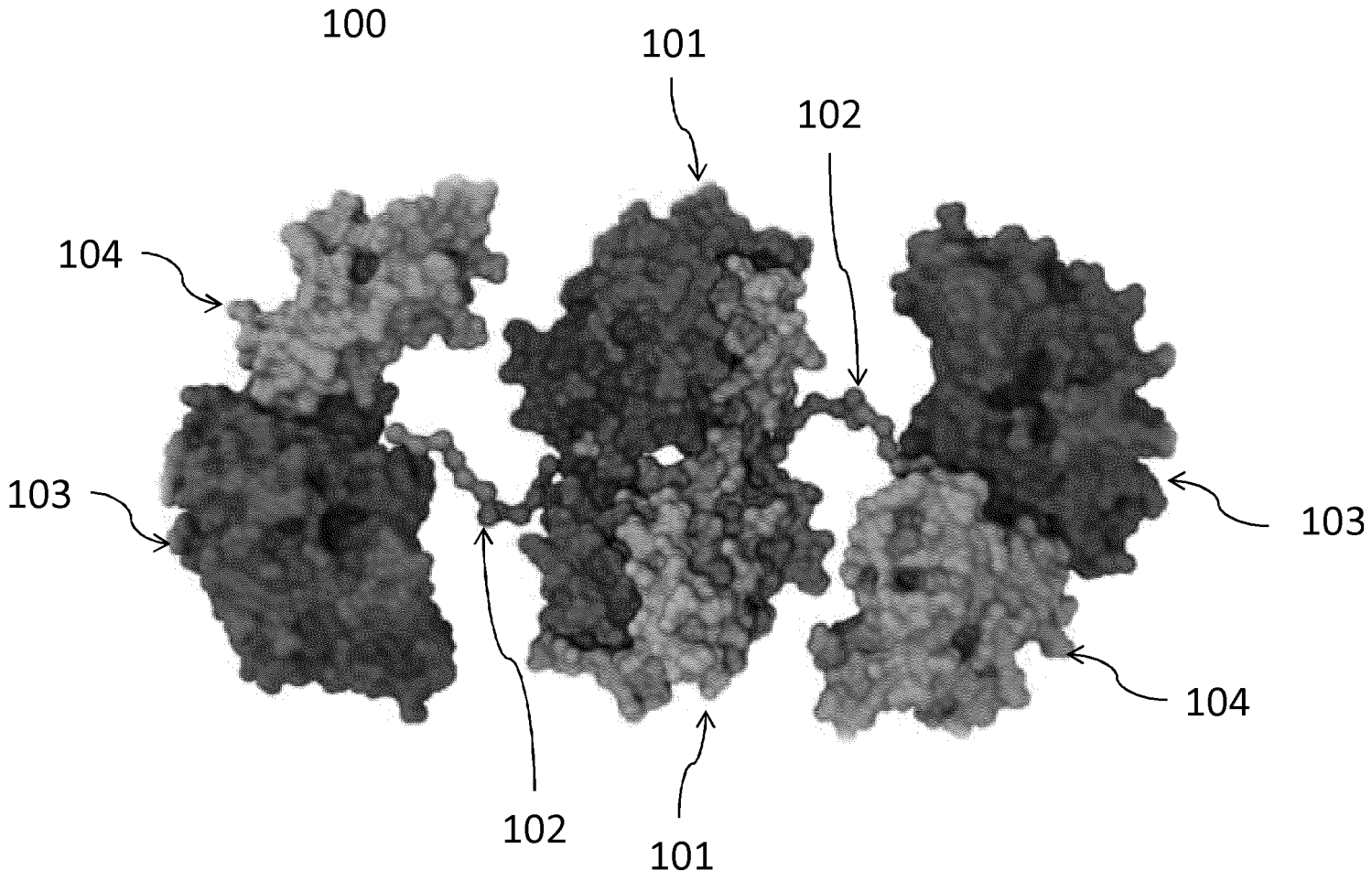
285. Способ по п. 283, при этом ингибитор TNF альфа выбирают из группы, состоящей из инфликсимаба (Remicade), адалимумаба (Humira) и голимумаба (Simponi).

286. Способ по п. 283, при этом ингибитор TNF альфа содержит SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 152.

287. Способ по п. 283, при этом ингибитор TNF альфа содержит SEQ ID NO: 153 и SEQ ID NO: 154.

288. Способ по любому из пп. 260-287, при этом ингибитор TNF альфа не является этанерцептом.

ФИГ.1

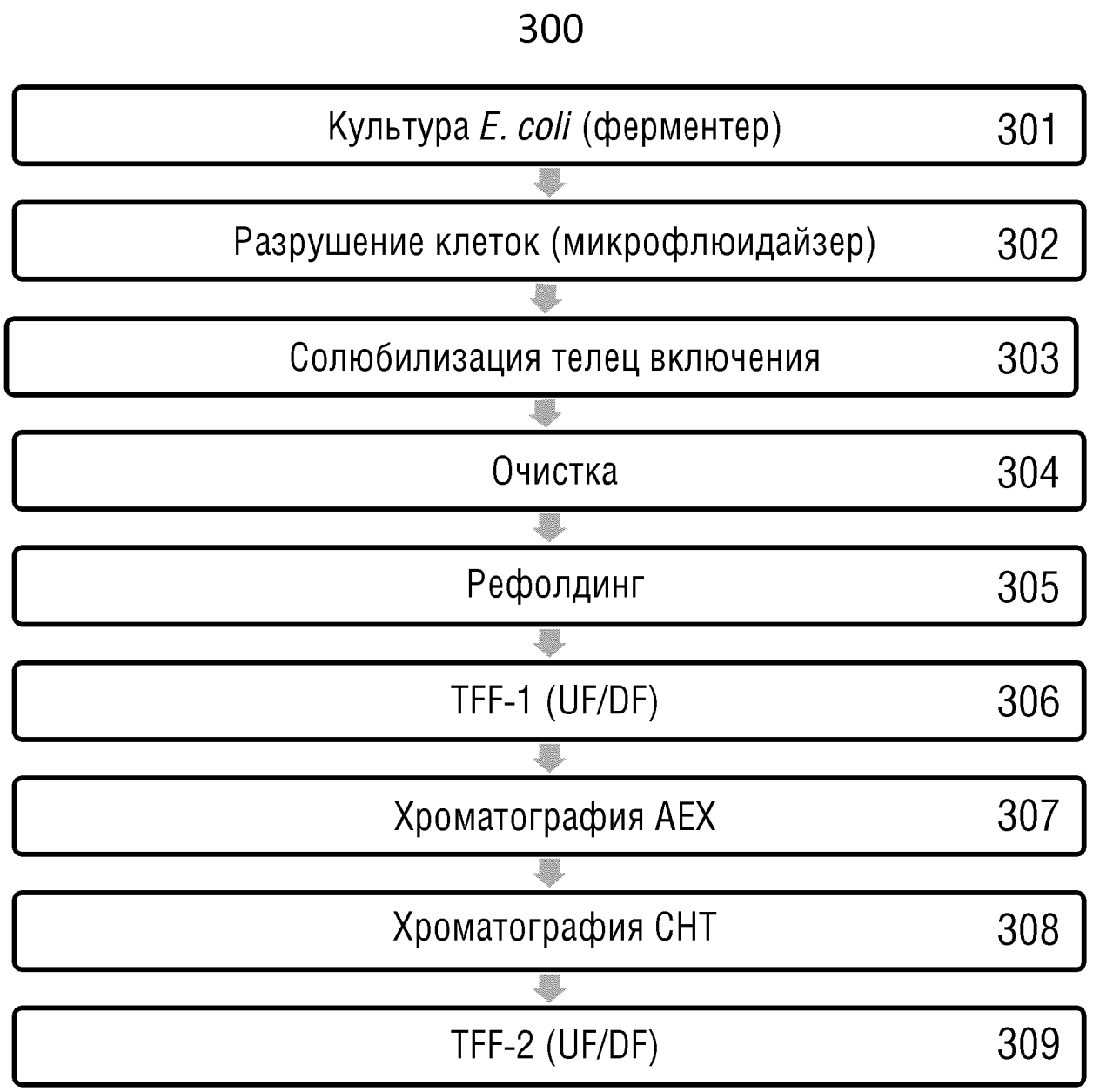


573532

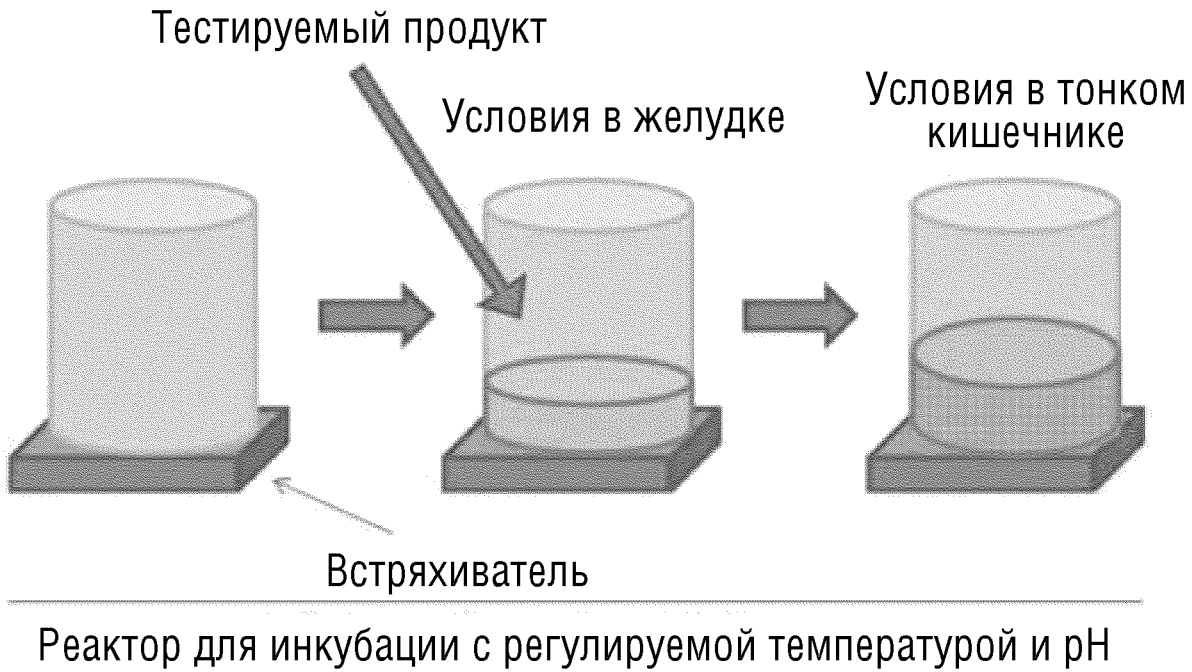
ФИГ.2А


200
Культура *E. coli* (ферментер) 201
Разрушение клеток (микрофлюидайзер) 202
Солюбилизированные тельца включения 203
Сульфитолиз 204
Очистка 205
TFF-1 (UFDF) 206
Рефолдинг 207
TFF-2 (DF) 208
Хроматография Capto Q Impres 209
Хроматография CHT 210
TFF-3 (Конечная лекарств. форма) (UFDF) 211

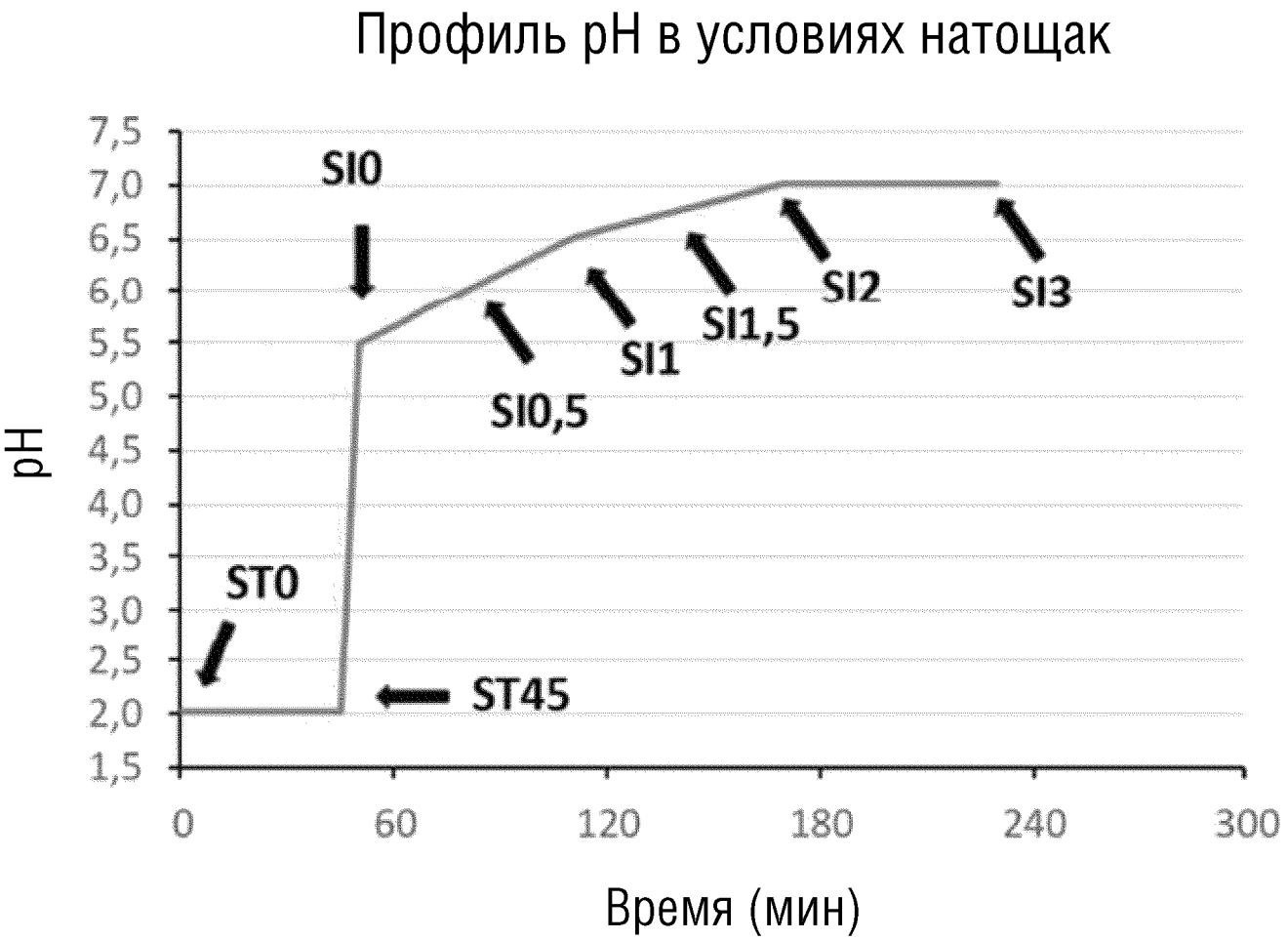
ФИГ.2В


300
Культура *E. coli* (ферментер) 301
Разрушение клеток (микрофлюидайзер) 302
Солюбилизация телец включения 303
Очистка 304
Рефолдинг 305
TFF-1 (UF/DF) 306
Хроматография AEX 307
Хроматография CHT 308
TFF-2 (UF/DF) 309

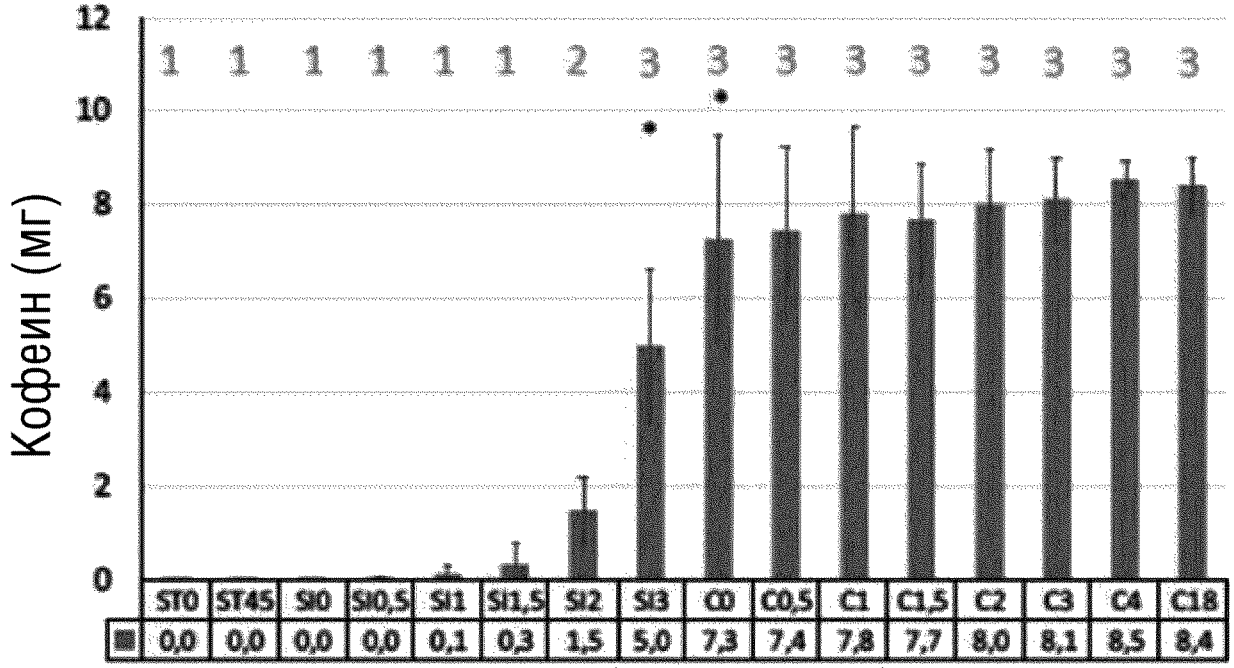
ФИГ.3


Тестируемый продукт
Условия в желудке
Условия в тонком кишечнике
Встряхиватель
Реактор для инкубации с регулируемой температурой и pH

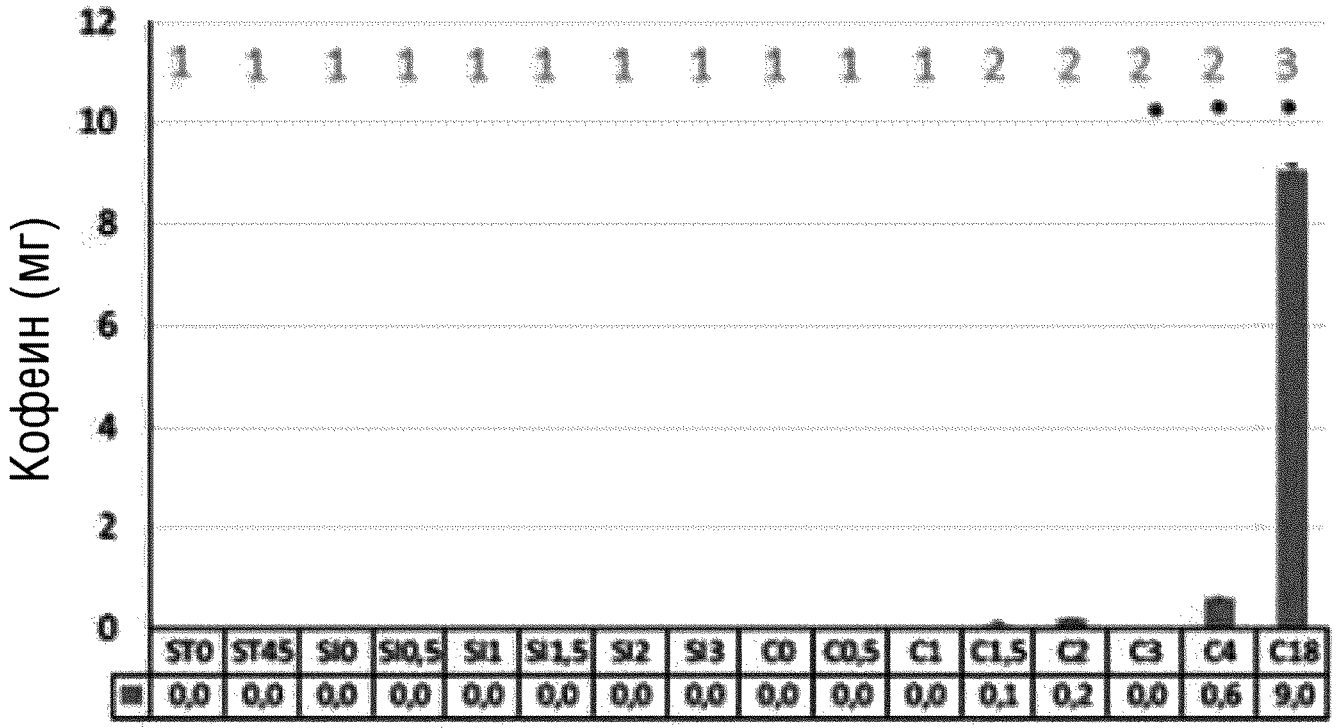
ФИГ.4


Профиль pH в условиях натощак
pH
7,5
7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
SI0
SI0,5
SI1
SI1,5
SI2
SI3
ST0
ST45
0
60
120
180
240
300
Время (мин)

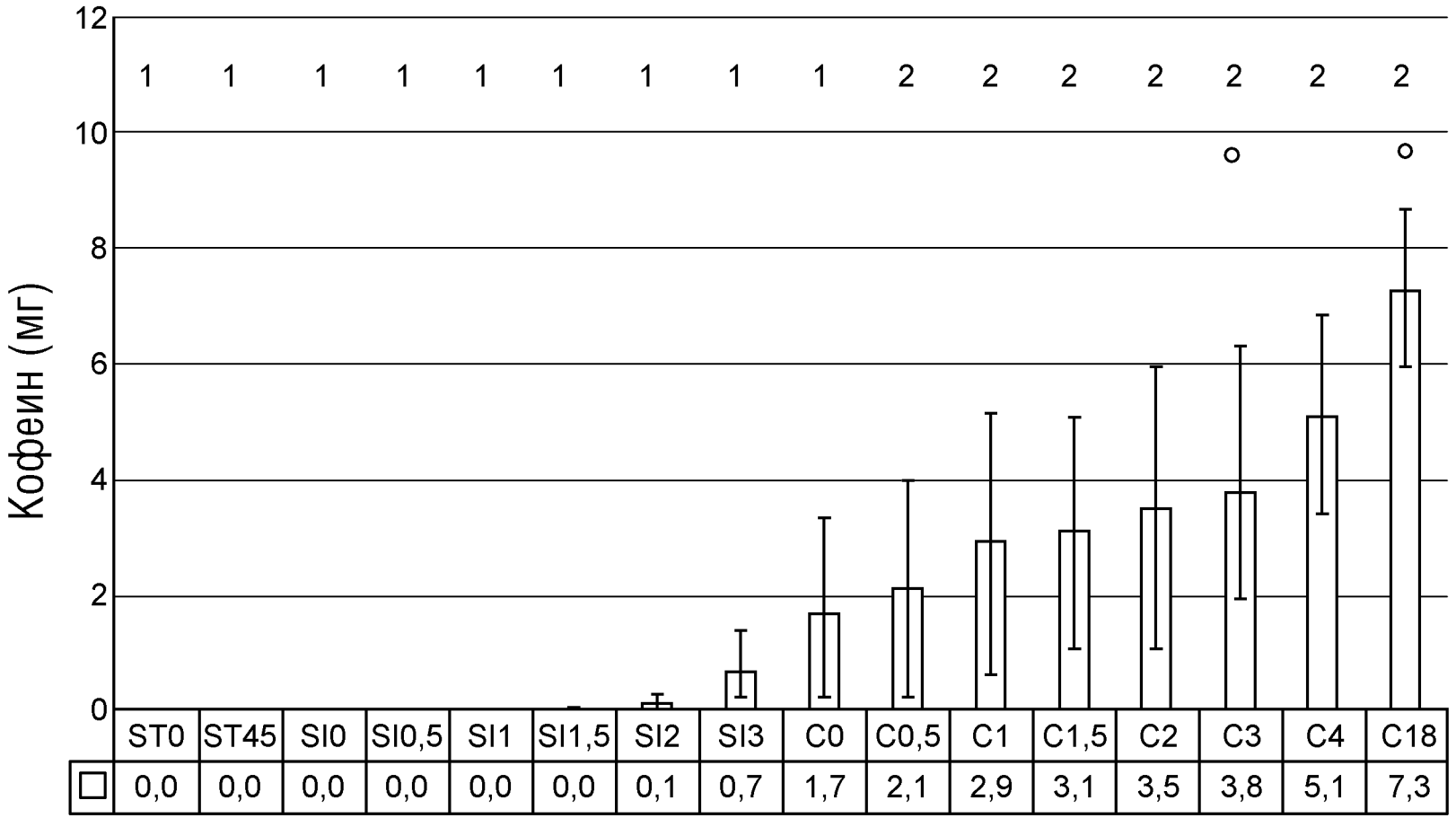
ФИГ.5А


Кофеин (мг)
12
10
8
6
4
2
0
1 1 1 1 1 1 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3
ST0 ST45 SI0 SI0,5 SI1 SI1,5 SI2 SI3 C0 C0,5 C1 C1,5 C2 C3 C4 C18
0,0 0,0 0,0 0,0 0,1 0,3 1,5 5,0 7,3 7,4 7,8 7,7 8,0 8,1 8,5 8,4

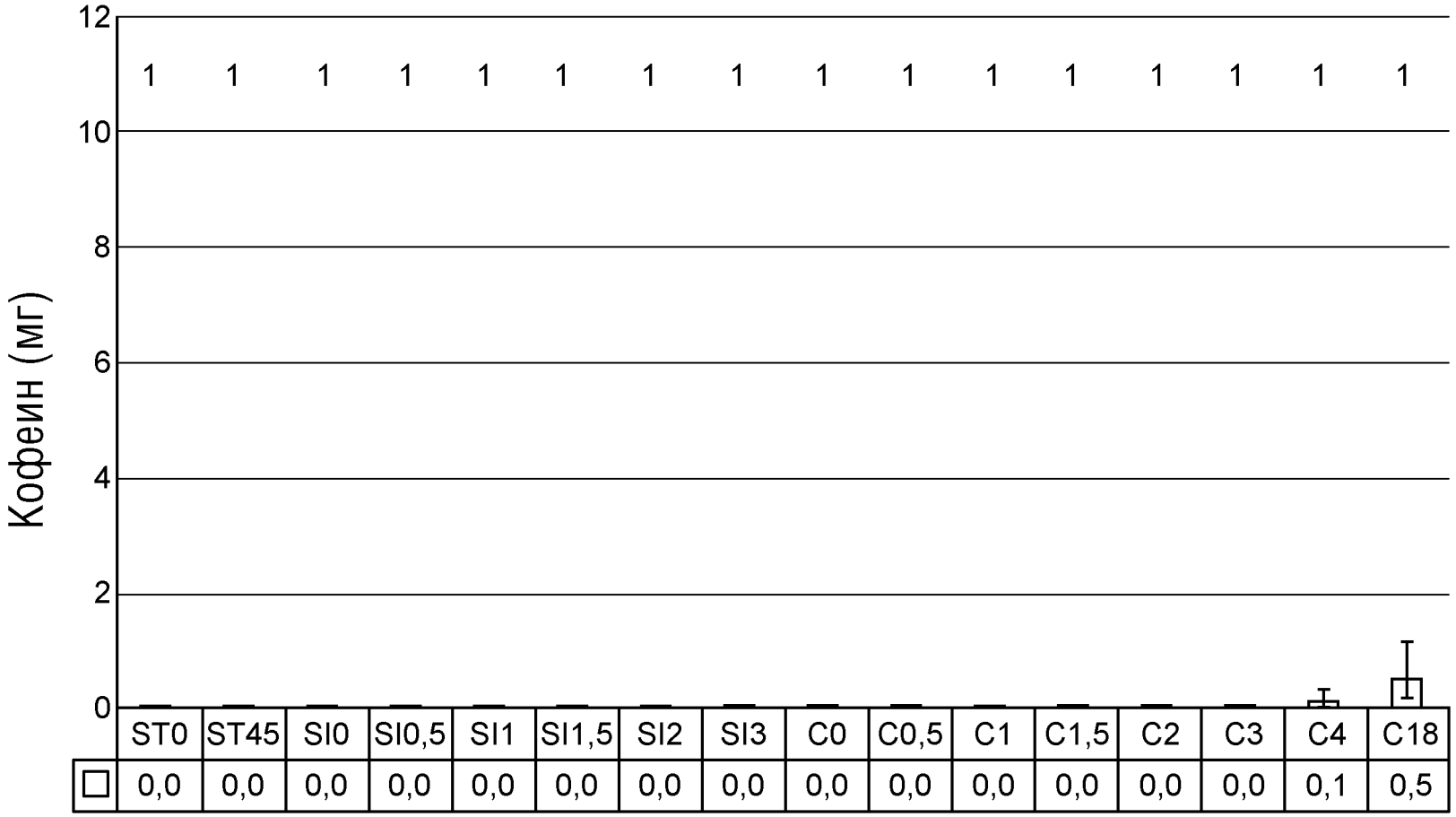
ФИГ.5В


Кофеин (мг)
12
10
8
6
4
2
0
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 3
ST0 ST45 SI0 SI0,5 SI1 SI1,5 SI2 SI3 C0 C0,5 C1 C1,5 C2 C3 C4 C18
0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,1 0,2 0,0 0,6 9,0

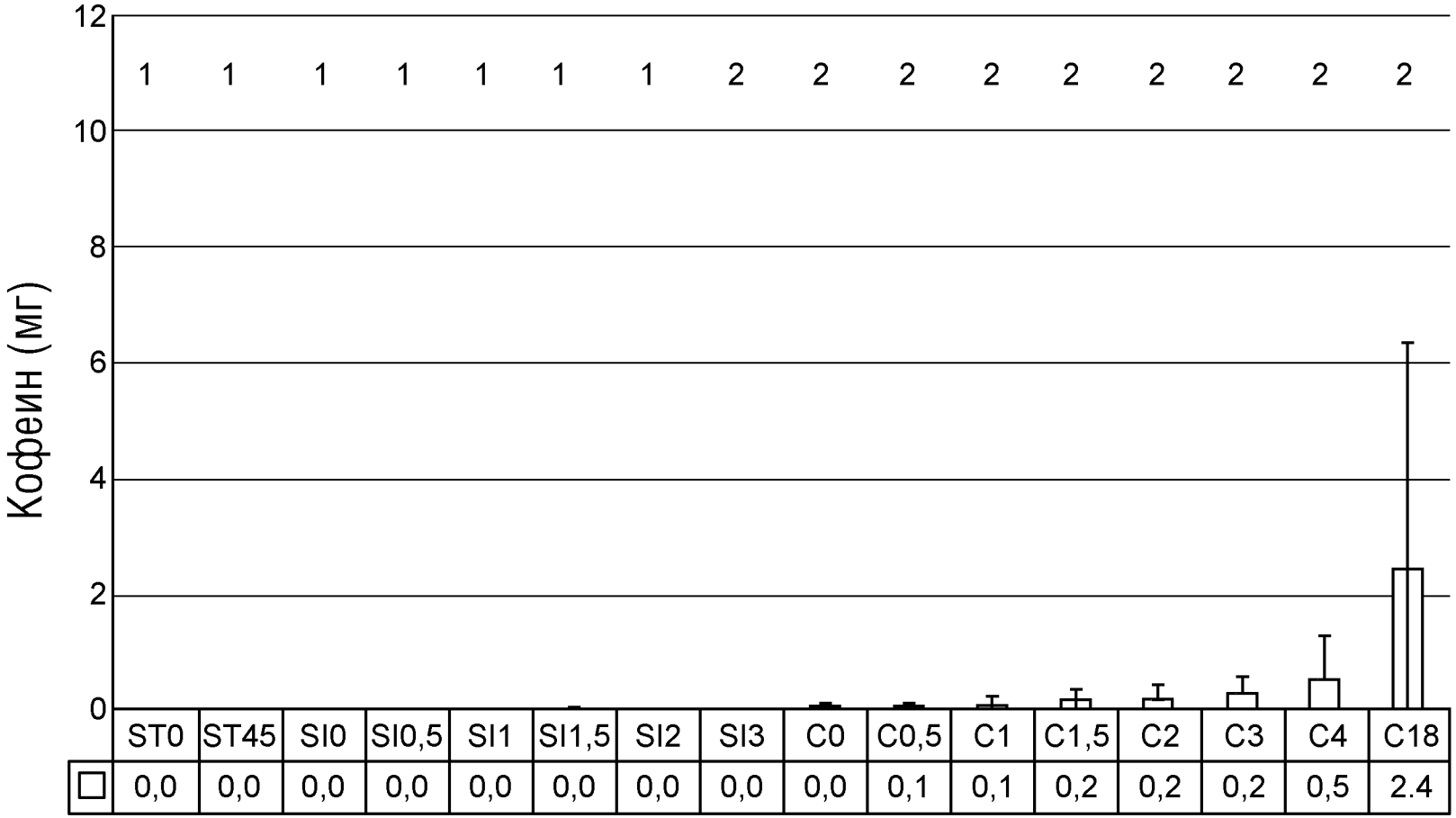
ФИГ.5С


Кофеин (мг)
12
10
8
6
4
2
0
1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2
ST0 ST45 SI0 SI0,5 SI1 SI1,5 SI2 SI3 C0 C0,5 C1 C1,5 C2 C3 C4 C18
0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,1 0,7 1,7 2,1 2,9 3,1 3,5 3,8 5,1 7,3

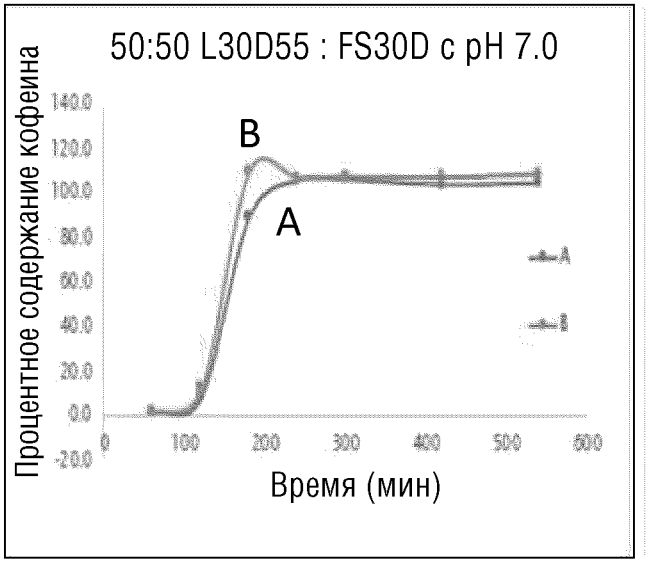
ФИГ.5D


Кофеин (мг)
12
10
8
6
4
2
0
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
ST0 ST45 SI0 SI0,5 SI1 SI1,5 SI2 SI3 C0 C0,5 C1 C1,5 C2 C3 C4 C18
0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,1 0,5

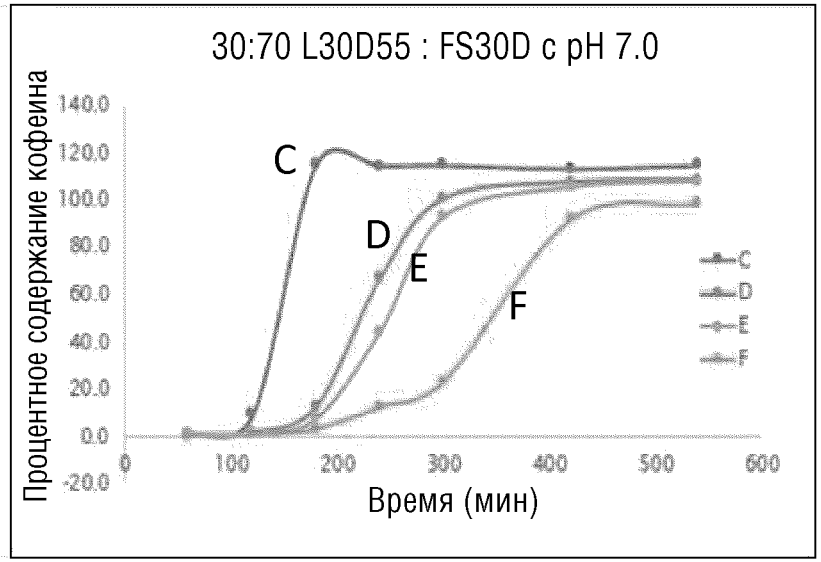
ФИГ.5E


Кофеин (мг)
12
10
8
6
4
2
0
1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ST0 ST45 SI0 SI0,5 SI1 SI1,5 SI2 SI3 C0 C0,5 C1 C1,5 C2 C3 C4 C18
0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,1 0,1 0,2 0,2 0,2 0,5 2.4

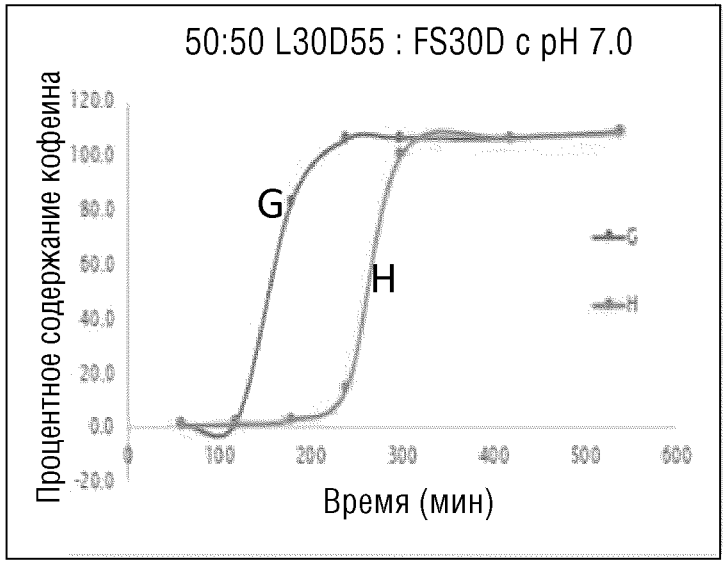
ФИГ.6А



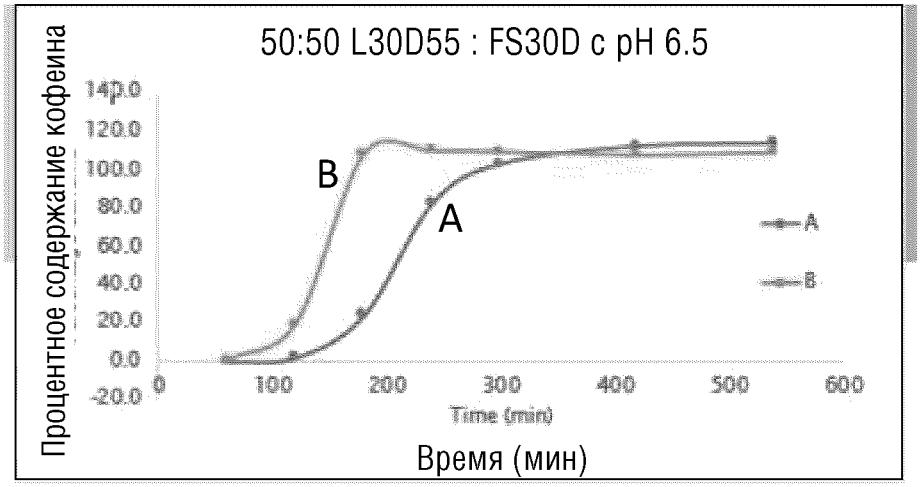
ФИГ.6В



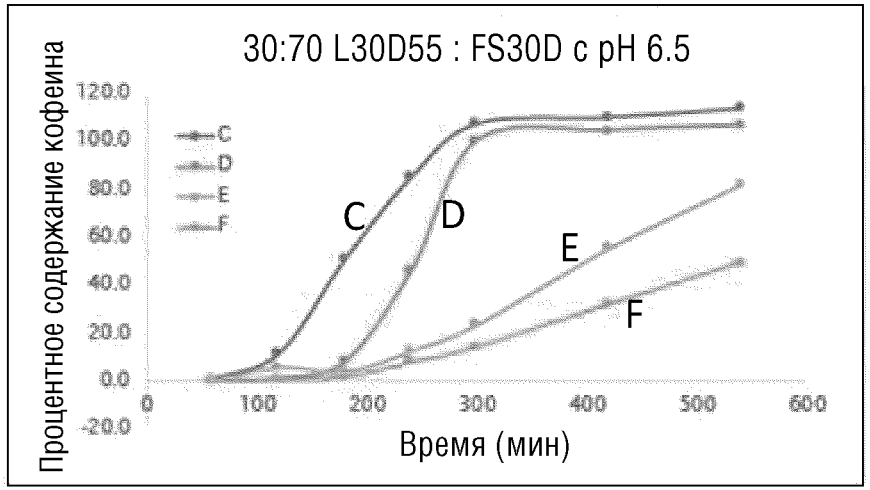
ФИГ.6С



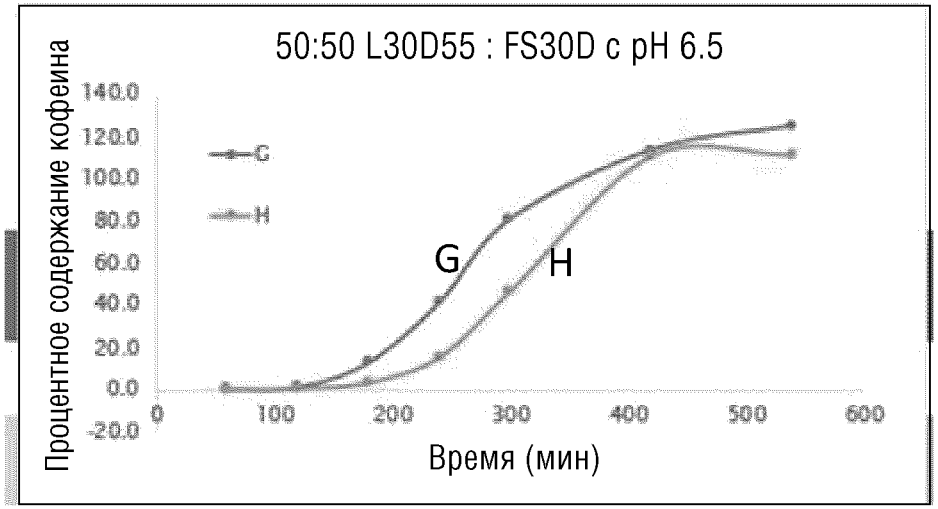
ФИГ.7A



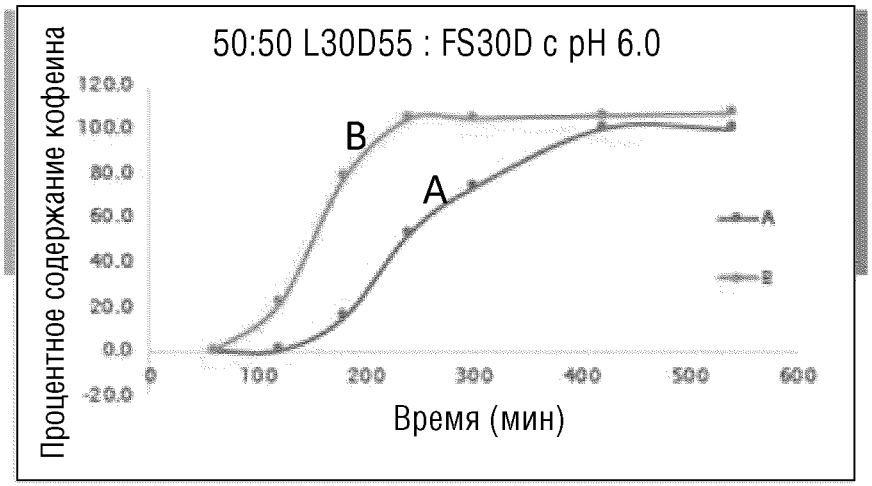
ФИГ.7B



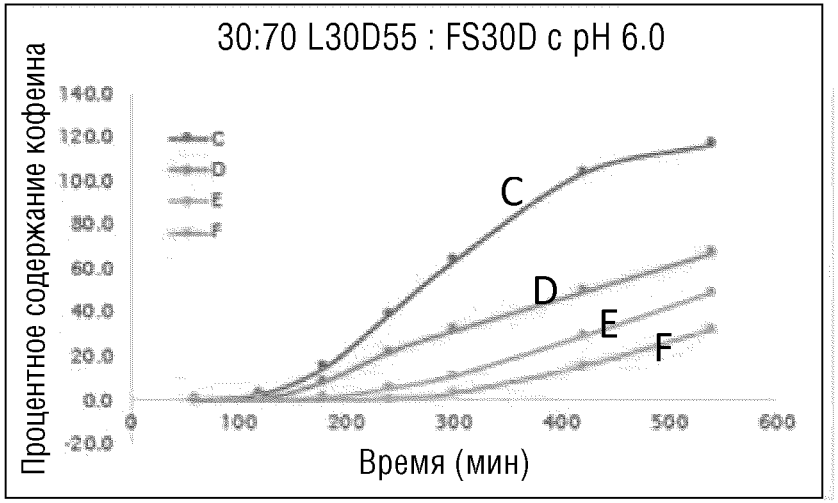
ФИГ.7C



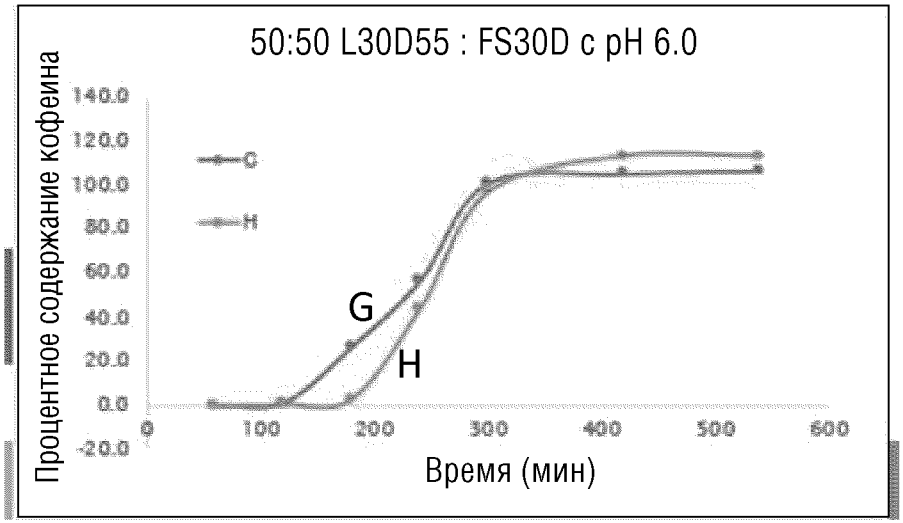
ФИГ.8А



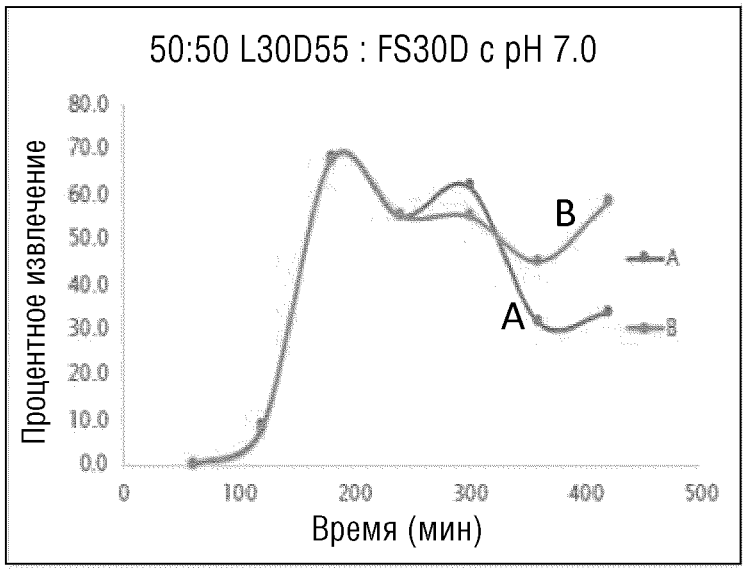
ФИГ.8В



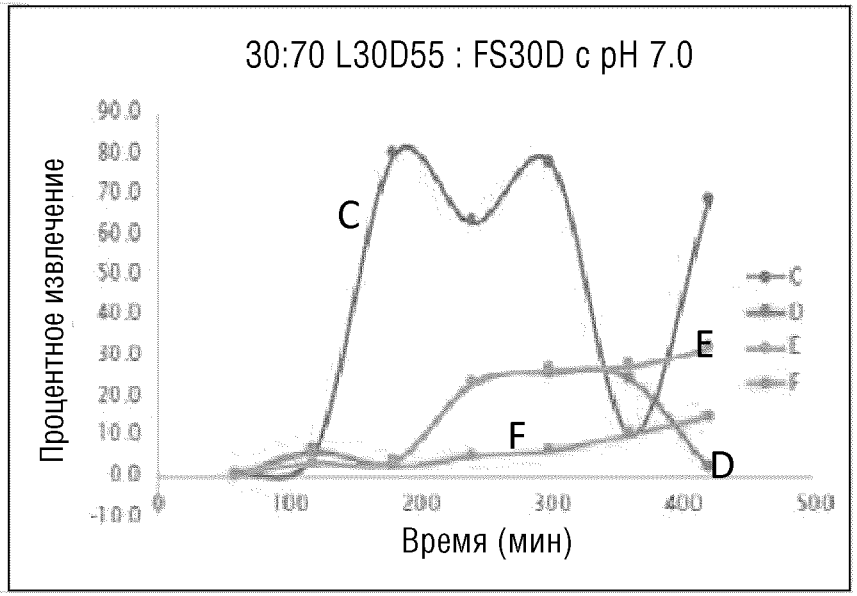
ФИГ.8С



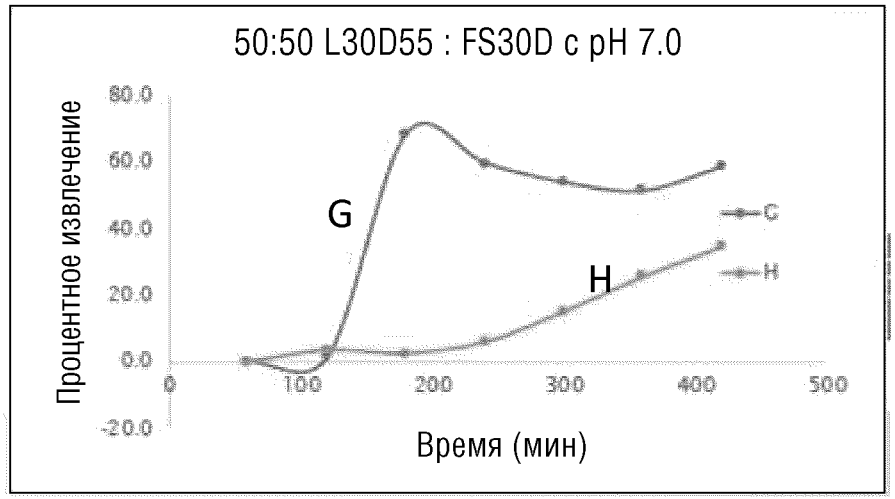
ФИГ.9А



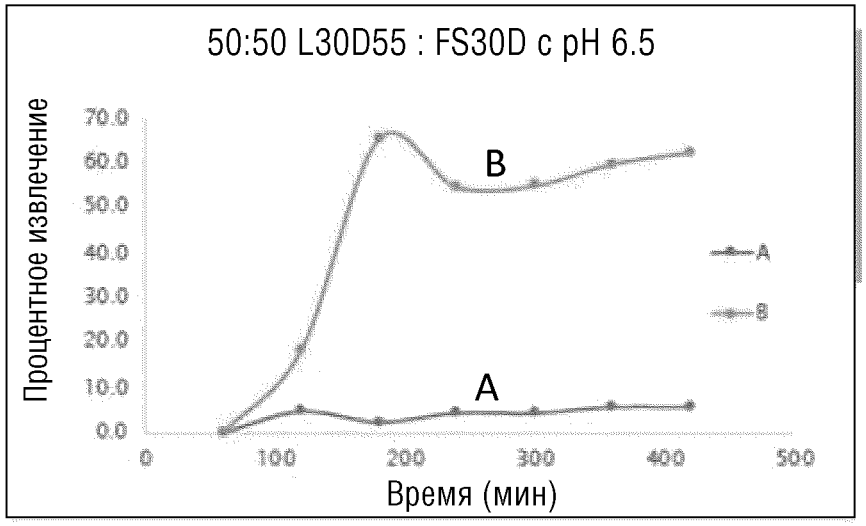
ФИГ.9В



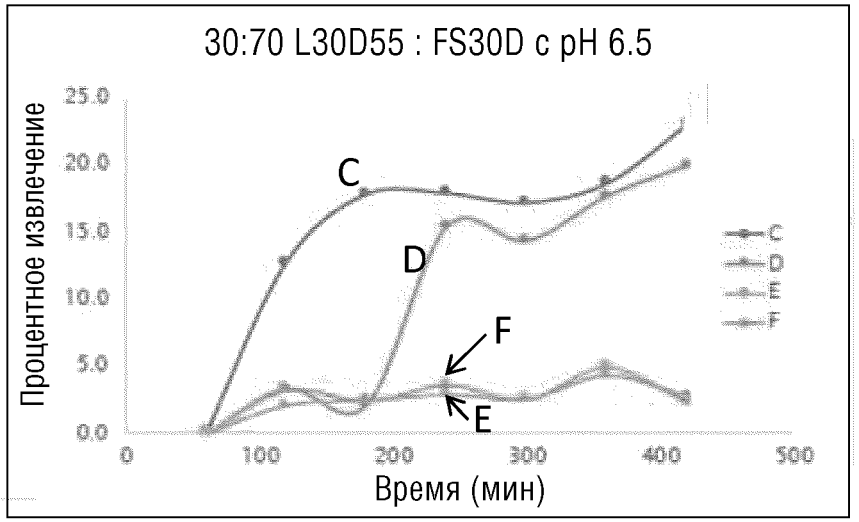
ФИГ.9С



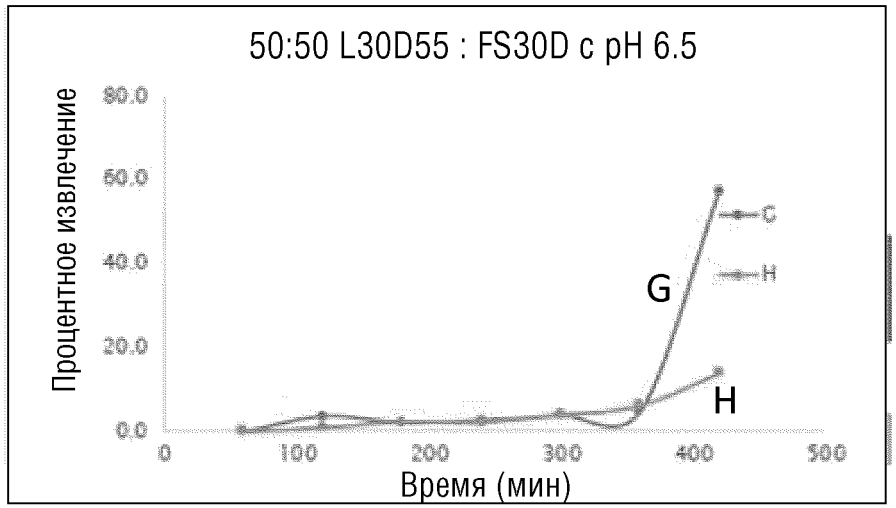
ФИГ.10A



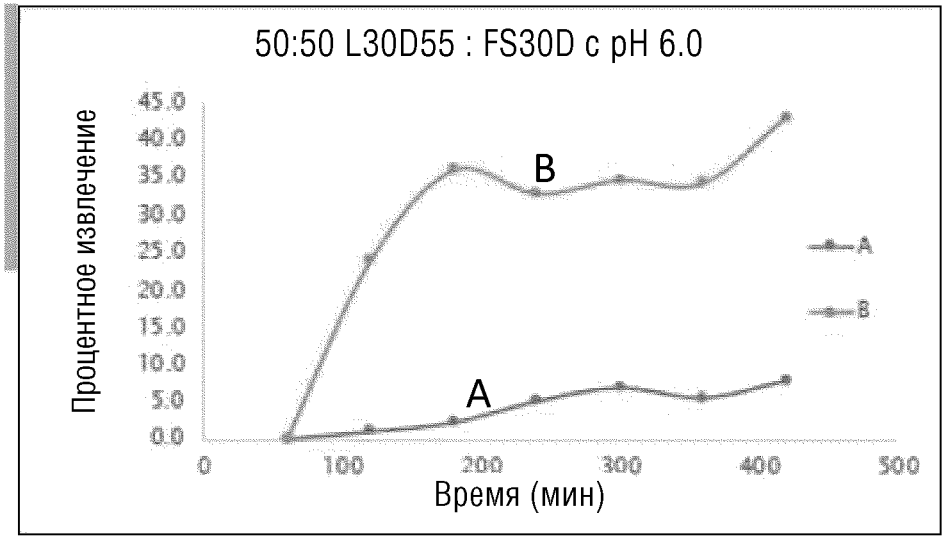
ФИГ.10B



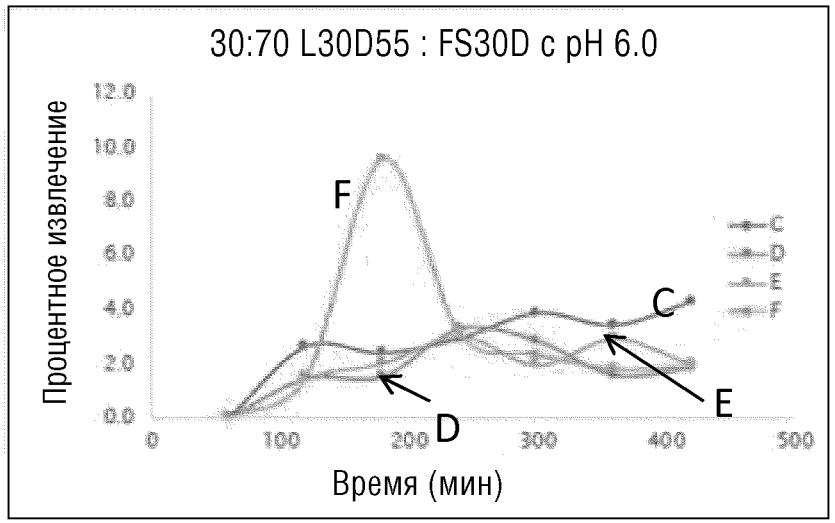
ФИГ.10C



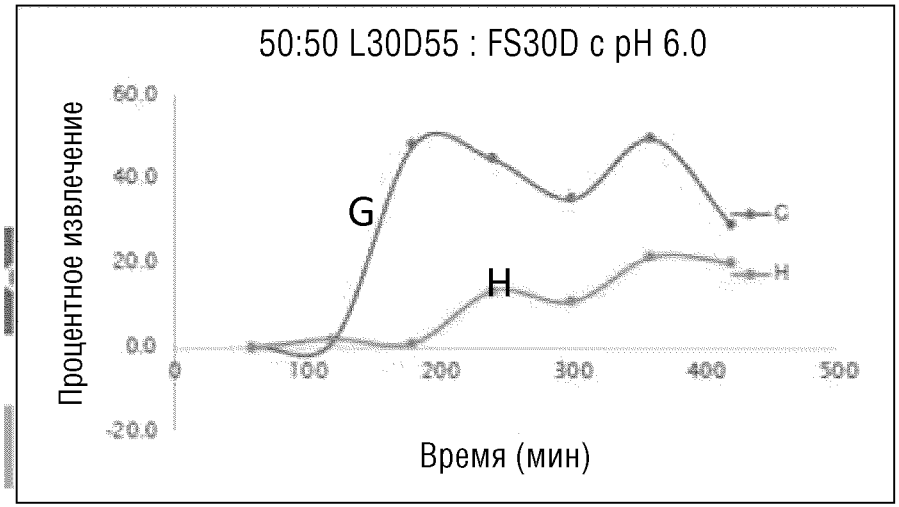
ФИГ.11A



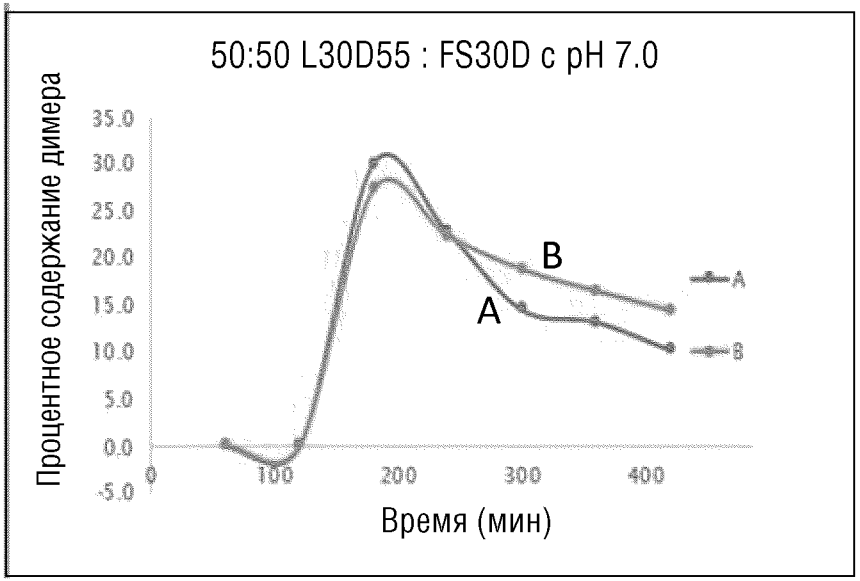
ФИГ.11B



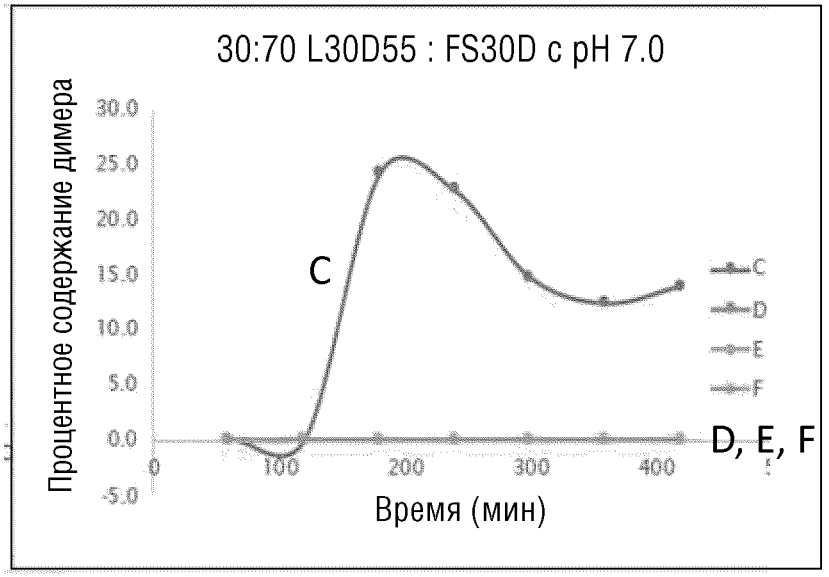
ФИГ.11C



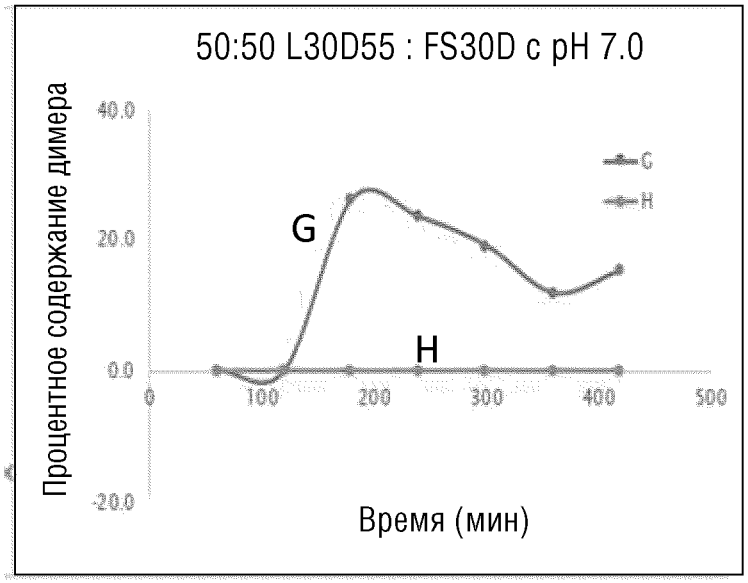
ФИГ.12A



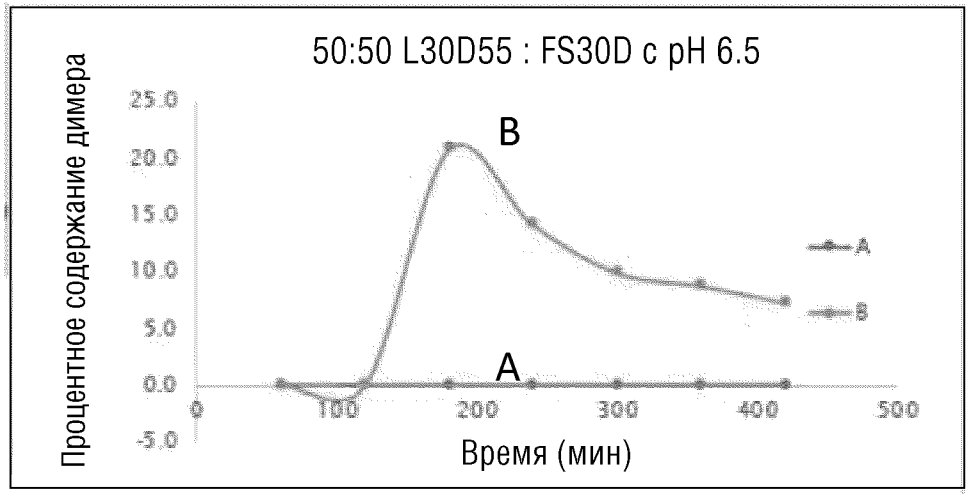
ФИГ.12B



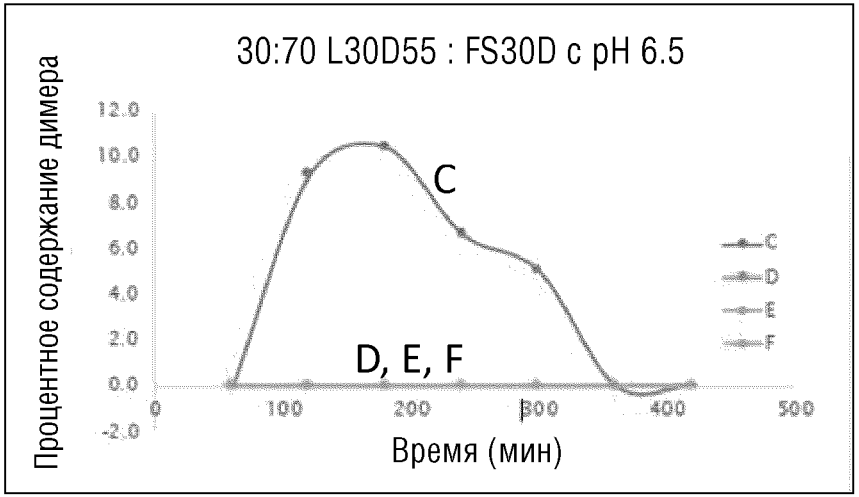
ФИГ.12C



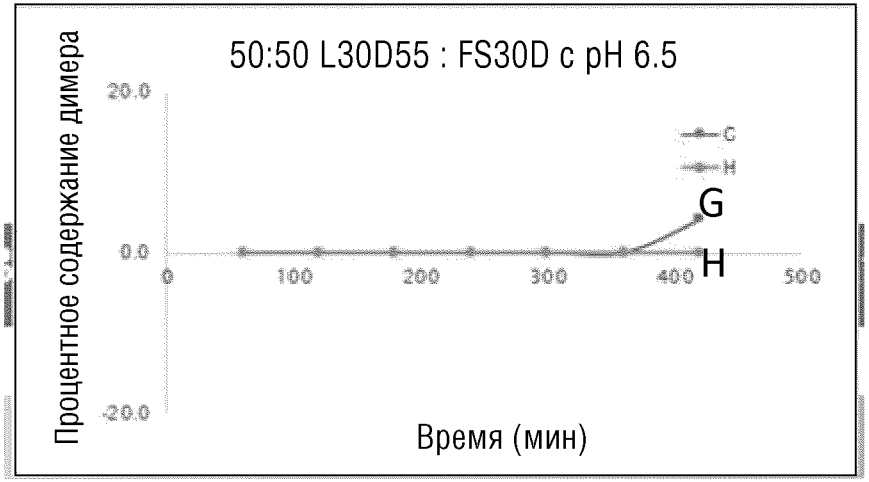
ФИГ.13A



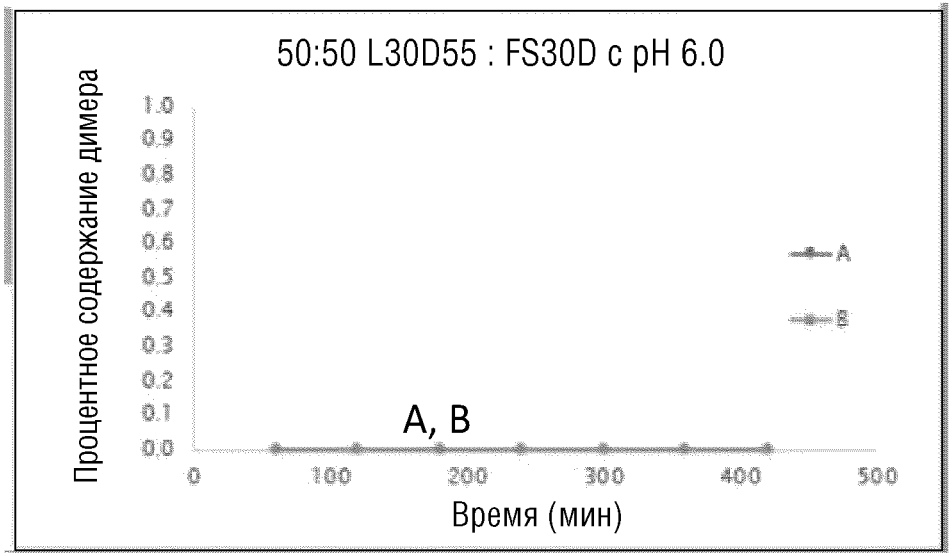
ФИГ.13B



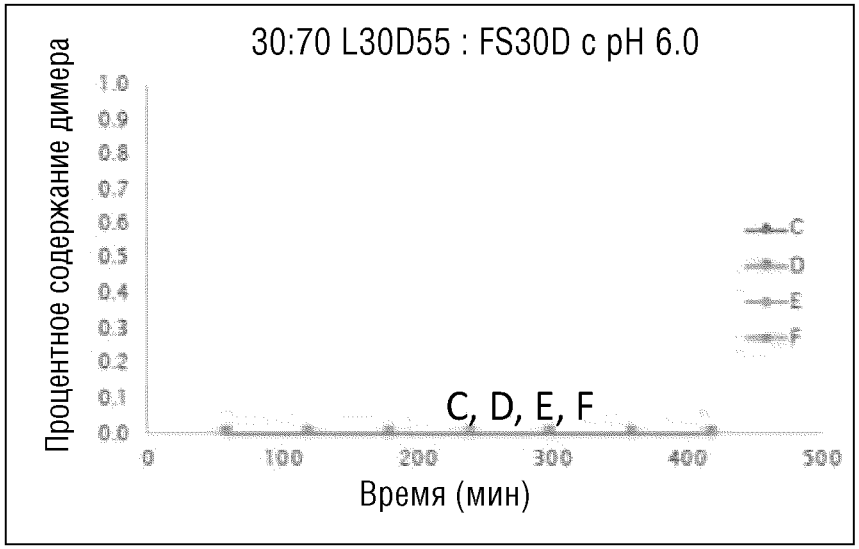
ФИГ.13C



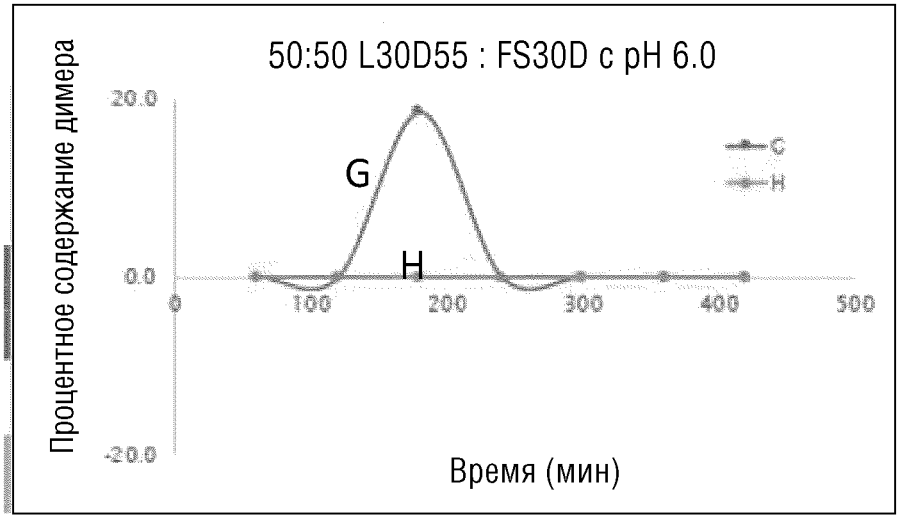
ФИГ.14A



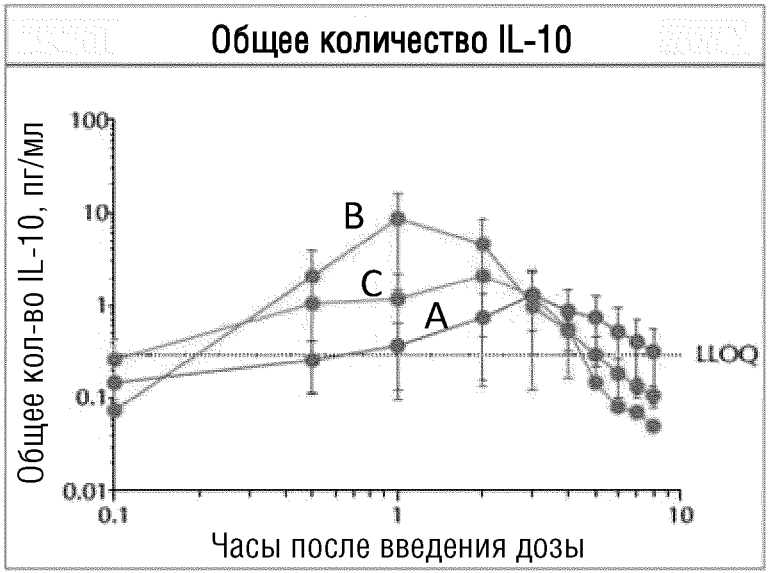
ФИГ.14B



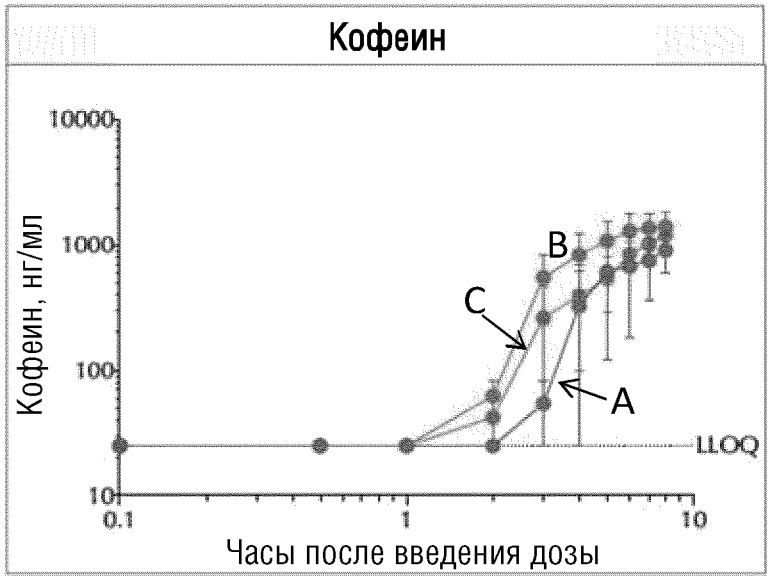
ФИГ.14C



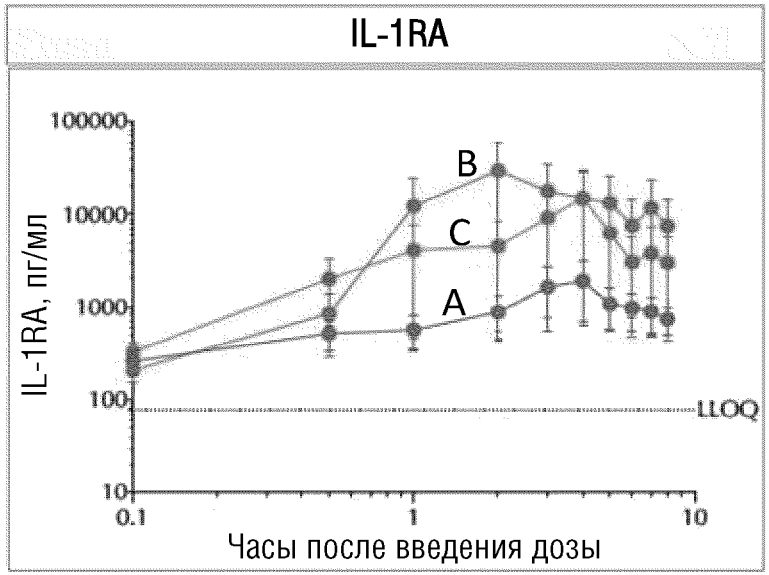
ФИГ.15A



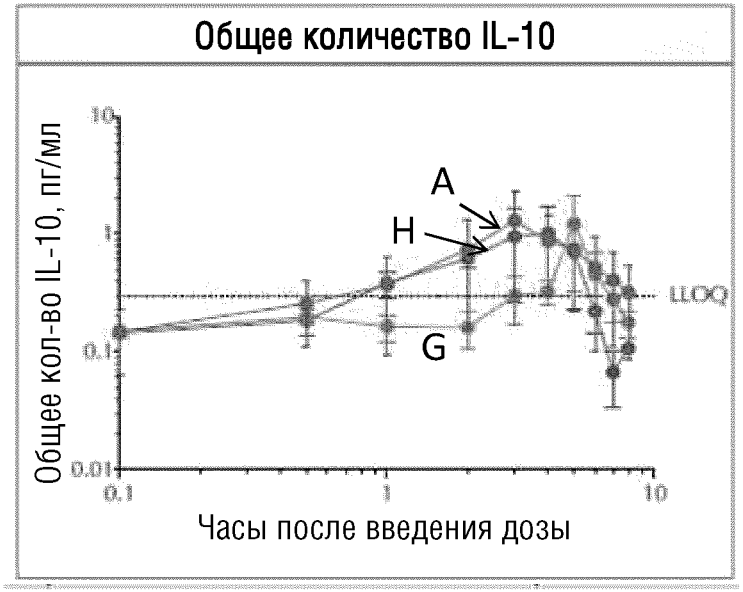
ФИГ.15B



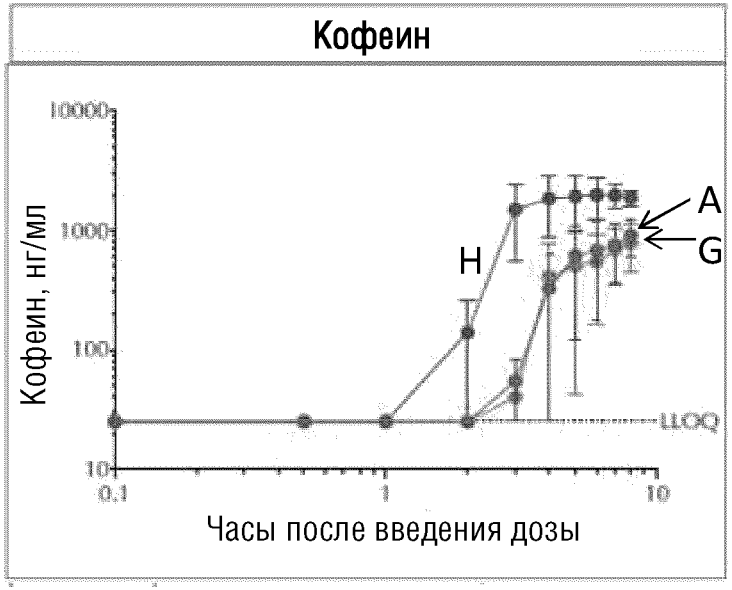
ФИГ.15C



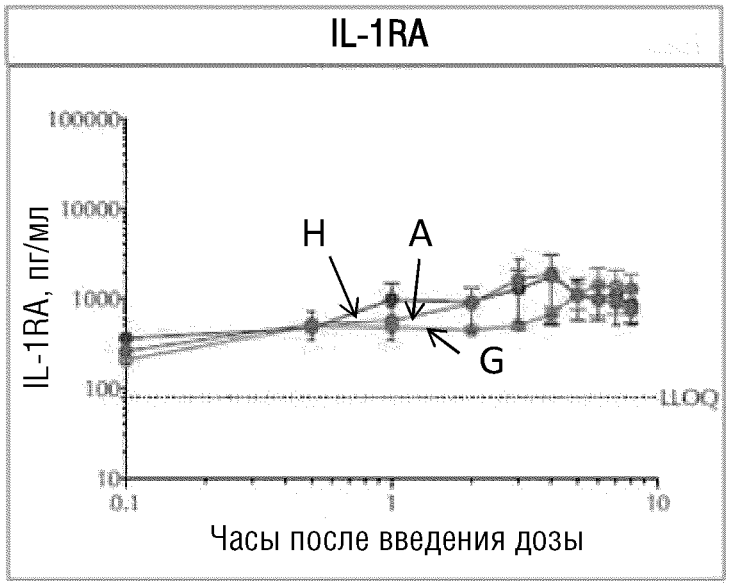
ФИГ.16A



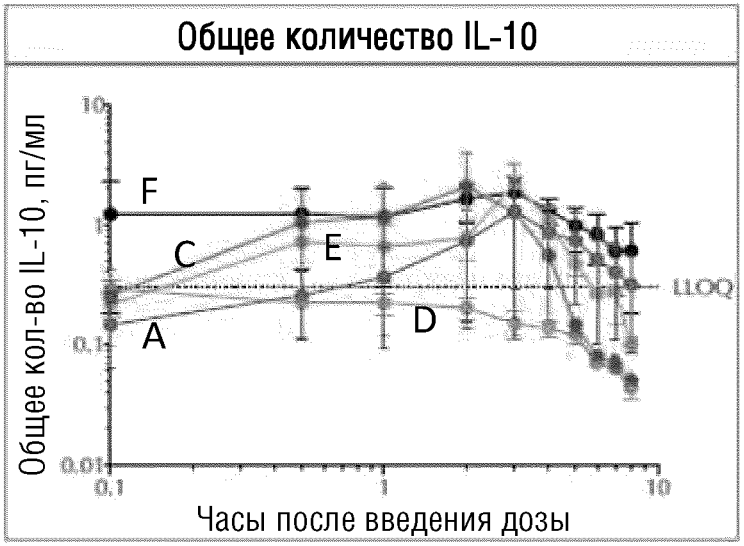
ФИГ.16B



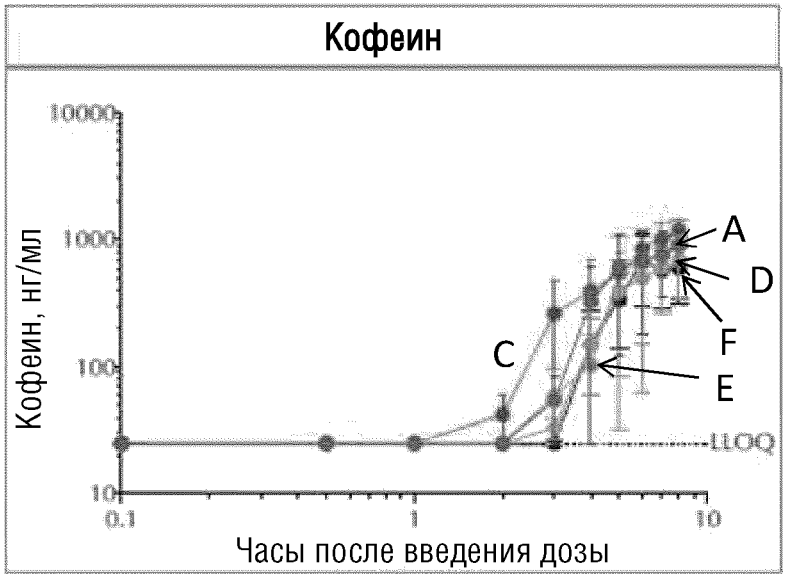
ФИГ.16C



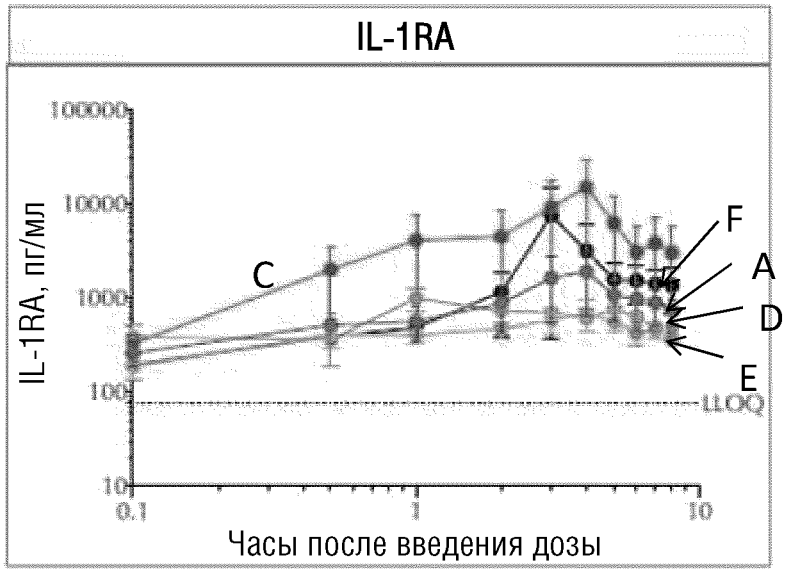
ФИГ.17A



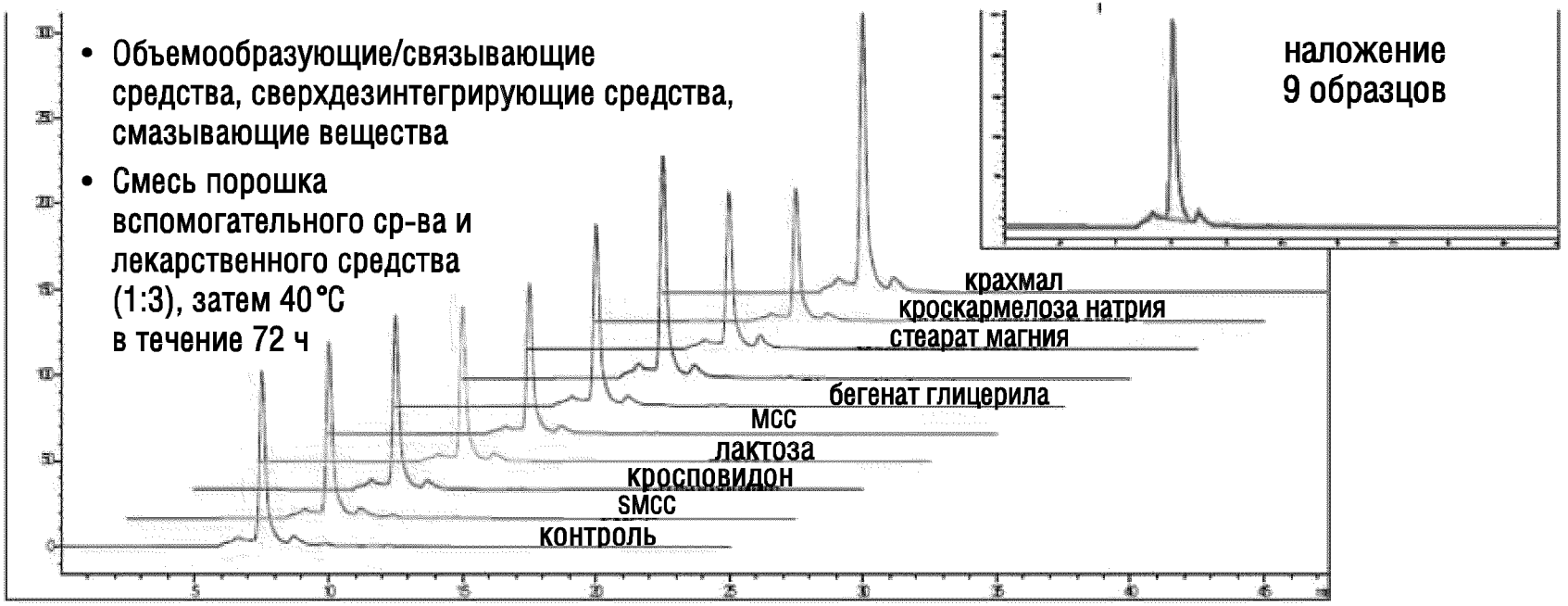
ФИГ.17B



ФИГ.17C



ФИГ.18

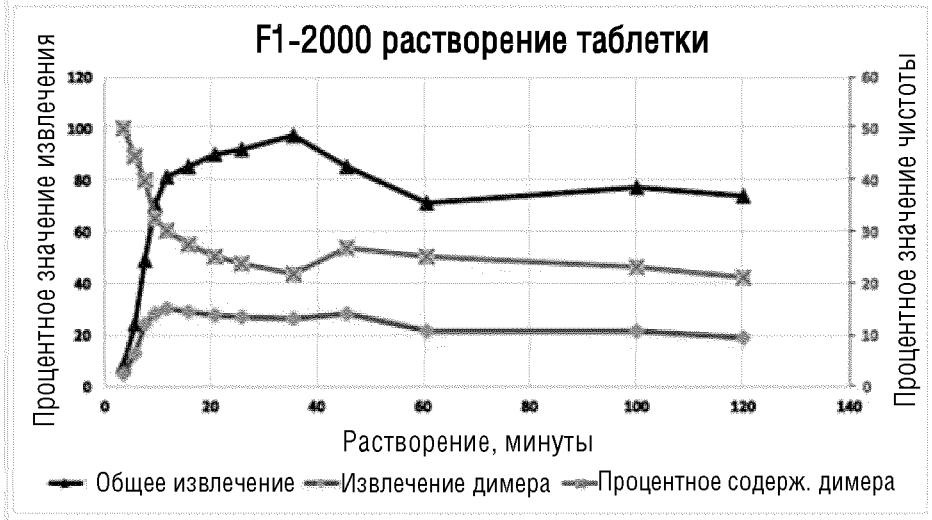

• Объемообразующие/связывающие средства, сверхдезинтегрирующие средства, смазывающие вещества
• Смесь порошка вспомогательного ср-ва и лекарственного средства (1:3), затем 40°C в течение 72 ч
наложение 9 образцов
крахмал
кроскармелоза натрия
стеарат магния
бегенат глицерила
МСС
лактоза
кросповидон
SMCC
контроль

ФИГ.19

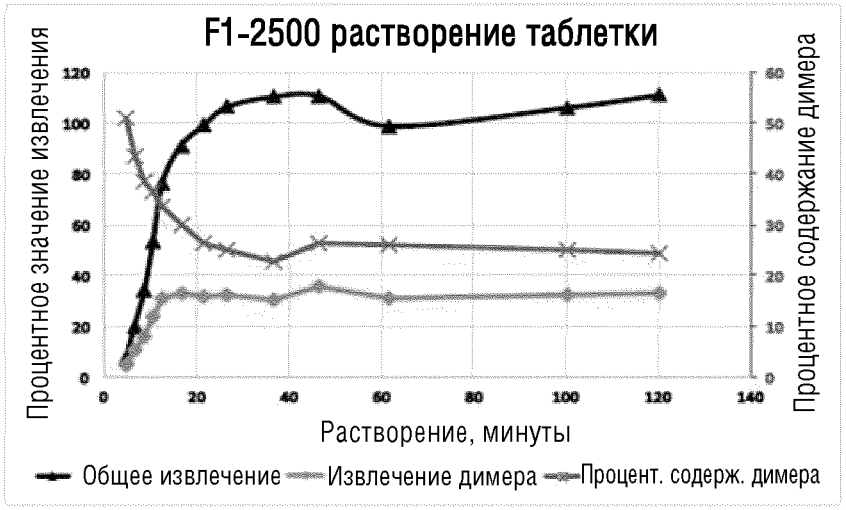


Прессование твердой дозы	Контроль	Предварит. смешивание	Лента низкой плотности	Лента высокой плотности	Гранула низкой плотности	Гранула высокой плотности	Cleo таблетка
F1 лекарств. форма	79.5	81.3	79.2	79.5	79.6	78.5	73.9
F2 лекарств. форма	79.5	78.9	78.4	79.2	79.5	78.5	69.4

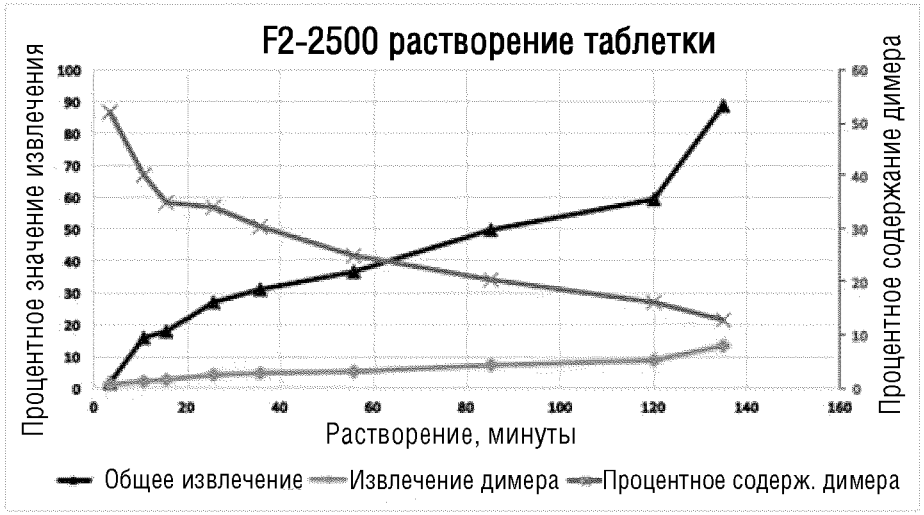
ФИГ.20A



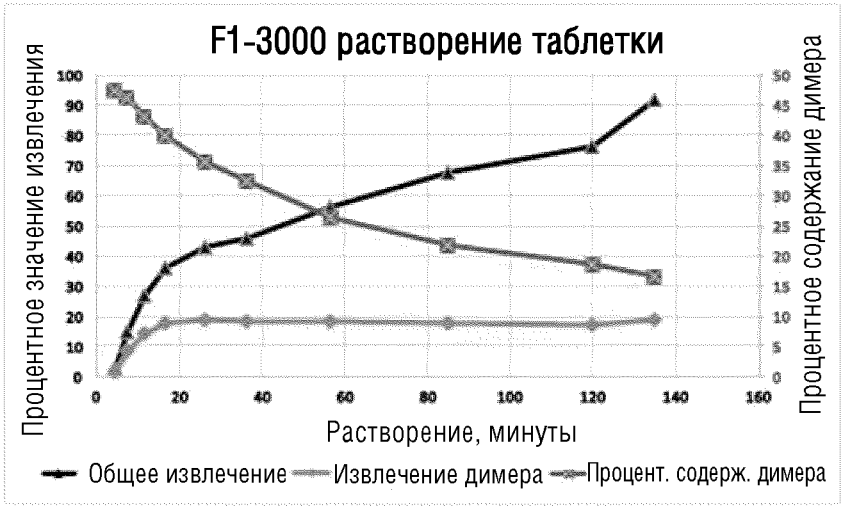
ФИГ.20B



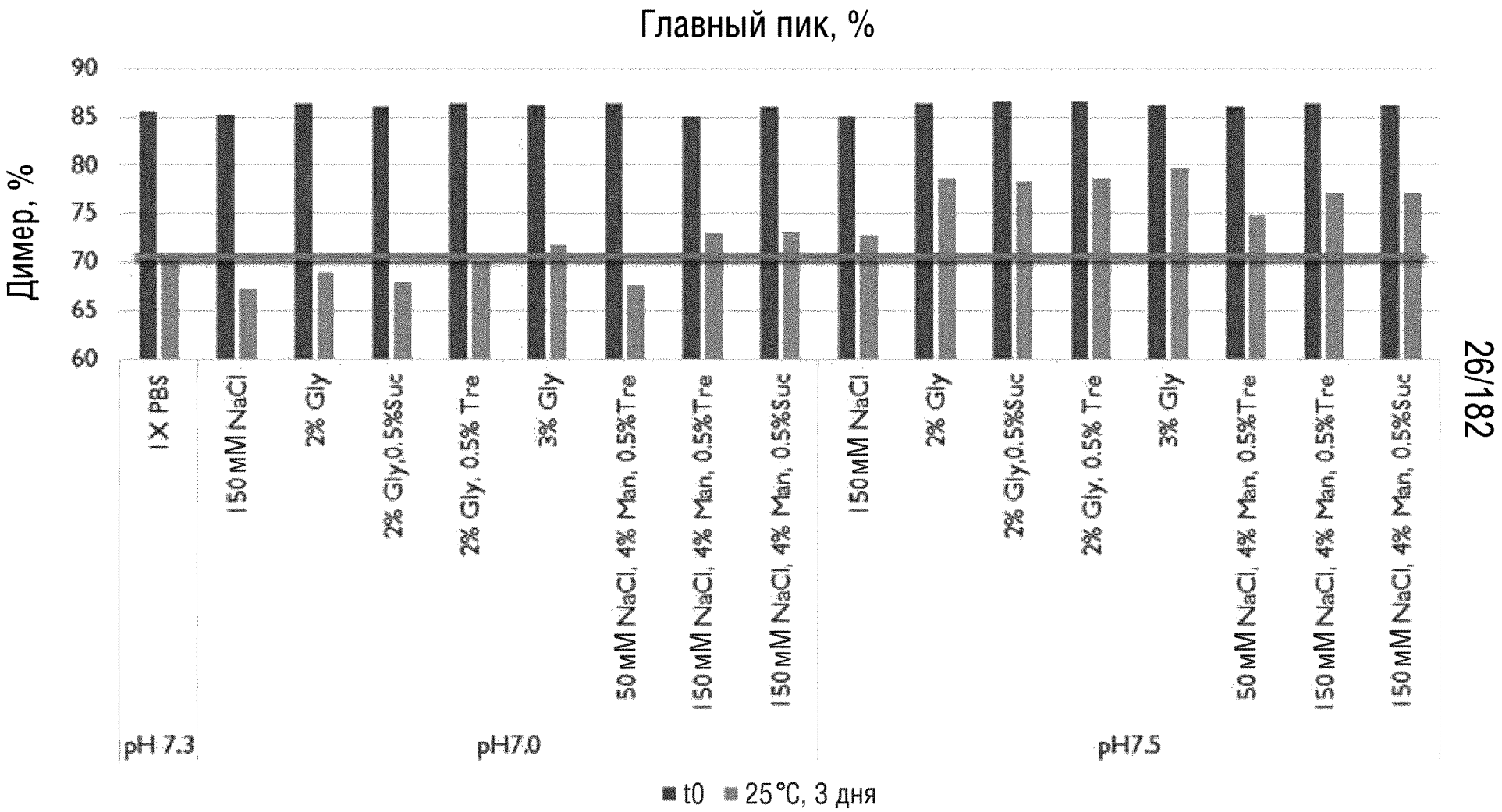
ФИГ.20C



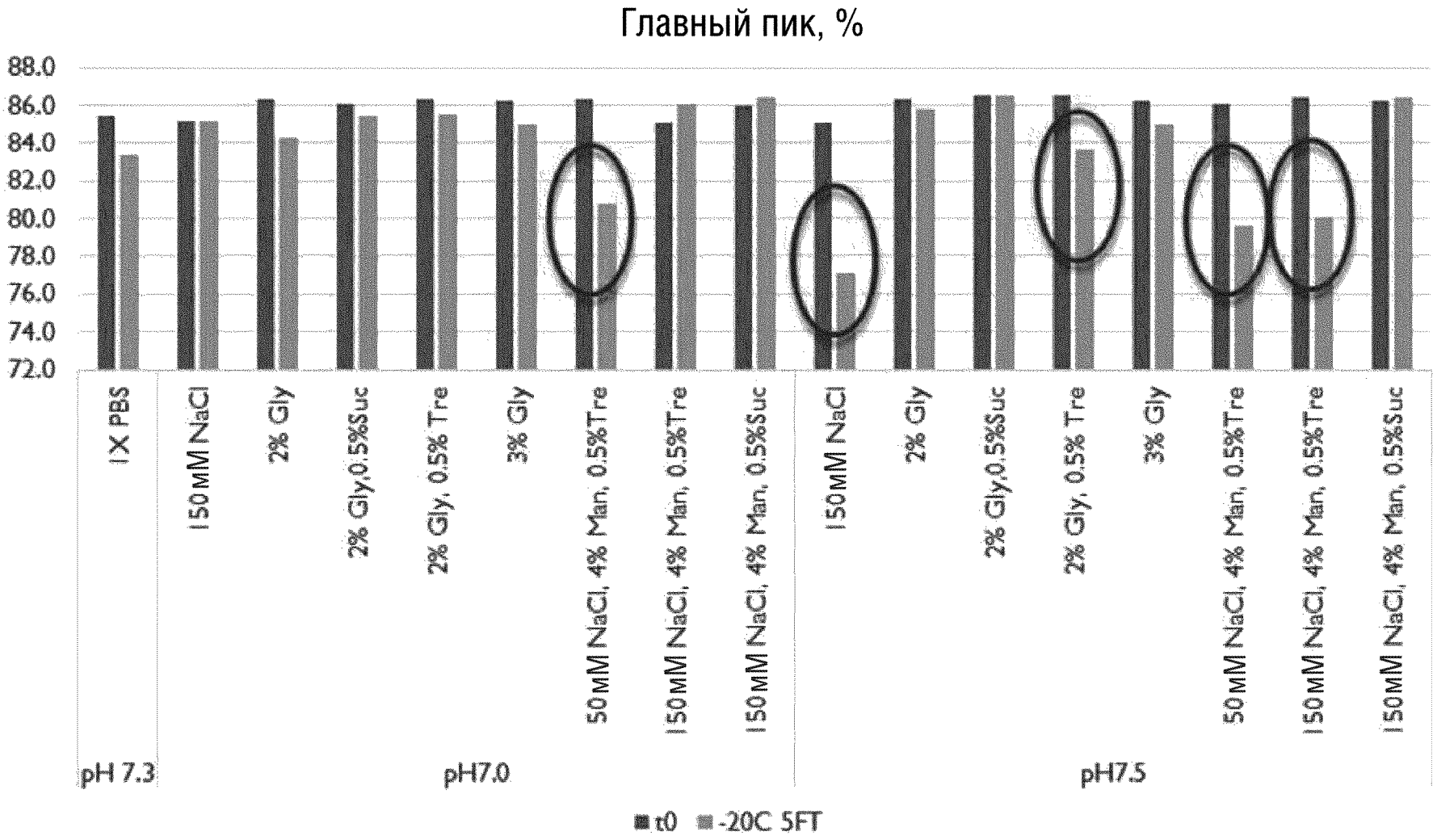
ФИГ.20D



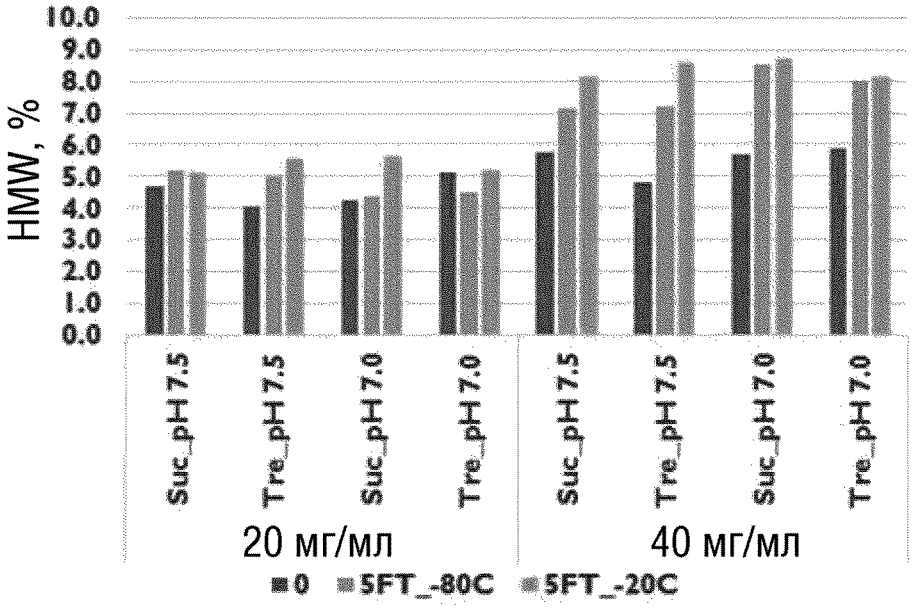
ФИГ.21


Главный пик, %
Димер, %
90
85
80
75
70
65
60
1X PBS
150 мМ NaCl
2% Gly
2% Gly,0.5%Suc
2% Gly, 0.5% Tre
3% Gly
50 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Suc
150 мМ NaCl
2% Gly
2% Gly,0.5%Suc
2% Gly, 0.5% Tre
3% Gly
50 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Suc
pH 7.3
pH7.0
pH7.5
t0
25 °C, 3 дня

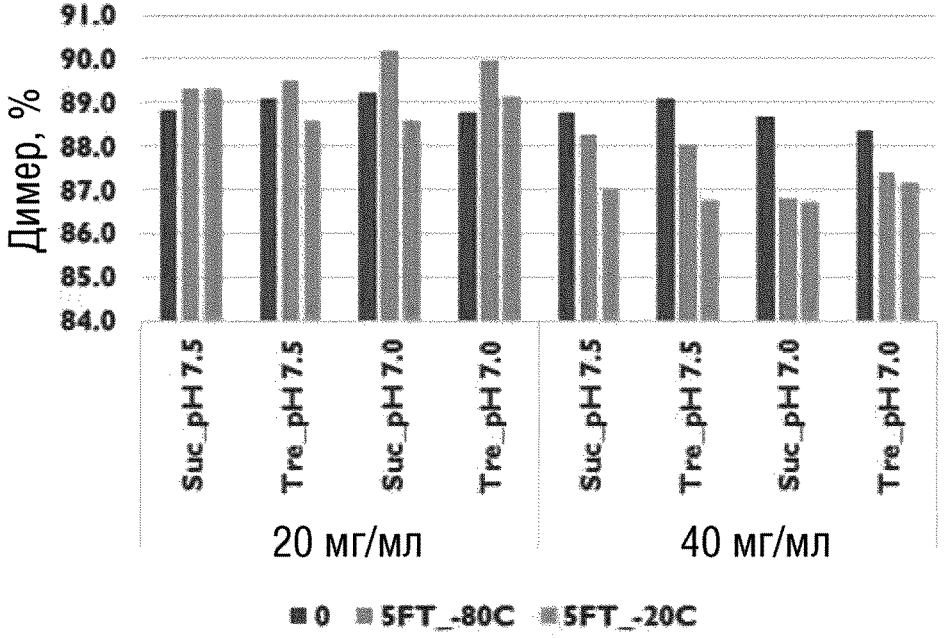
ФИГ.22


Главный пик, %
88.0
86.0
84.0
82.0
80.0
78.0
76.0
74.0
72.0
1X PBS
150 мМ NaCl
2% Gly
2% Gly,0.5%Suc
2% Gly, 0.5% Tre
3% Gly
50 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Suc
150 мМ NaCl
2% Gly
2% Gly,0.5%Suc
2% Gly, 0.5% Tre
3% Gly
50 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Tre
150 мМ NaCl, 4% Man, 0.5%Suc
pH 7.3
pH7.0
pH7.5
t0
-20C 5FT

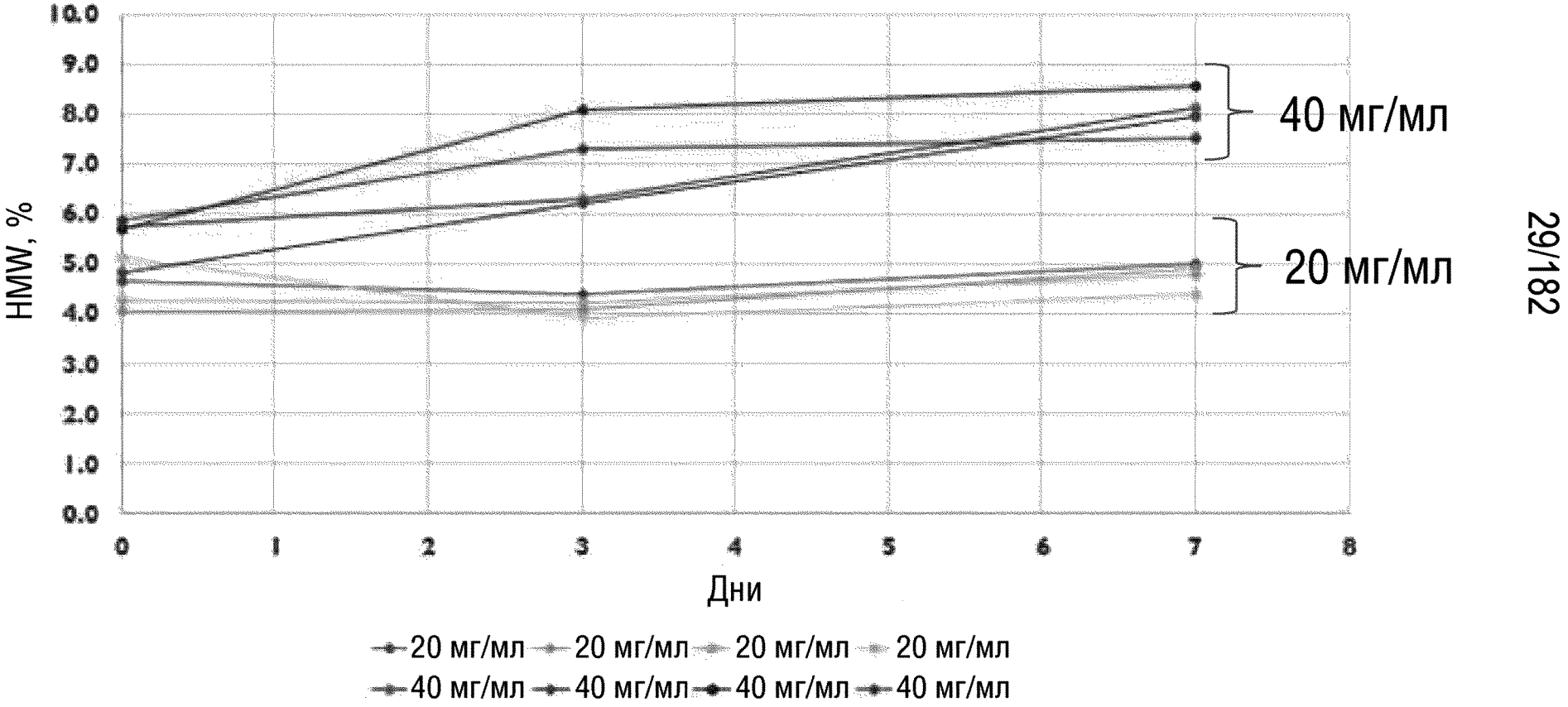
ФИГ.23А



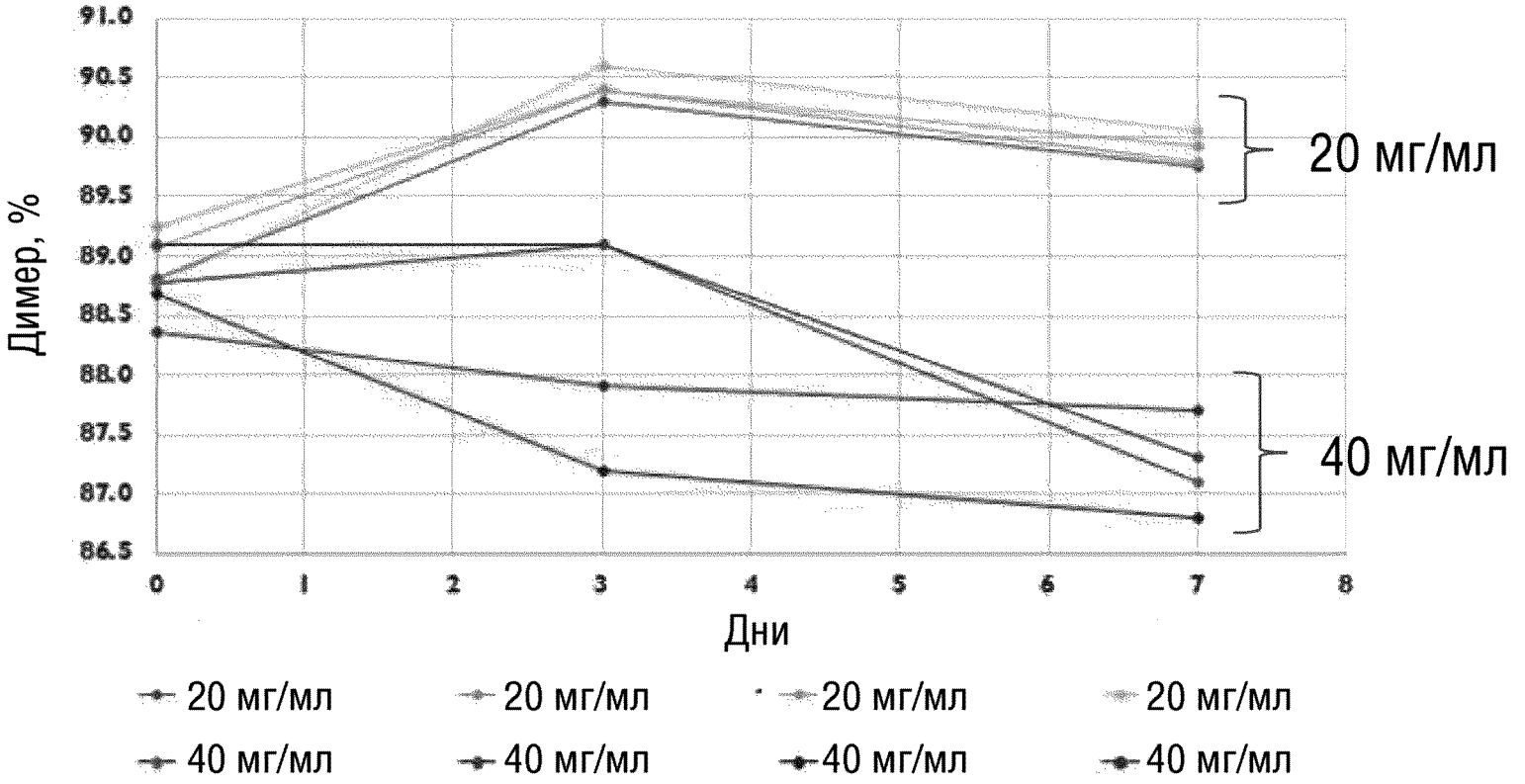
ФИГ.23В



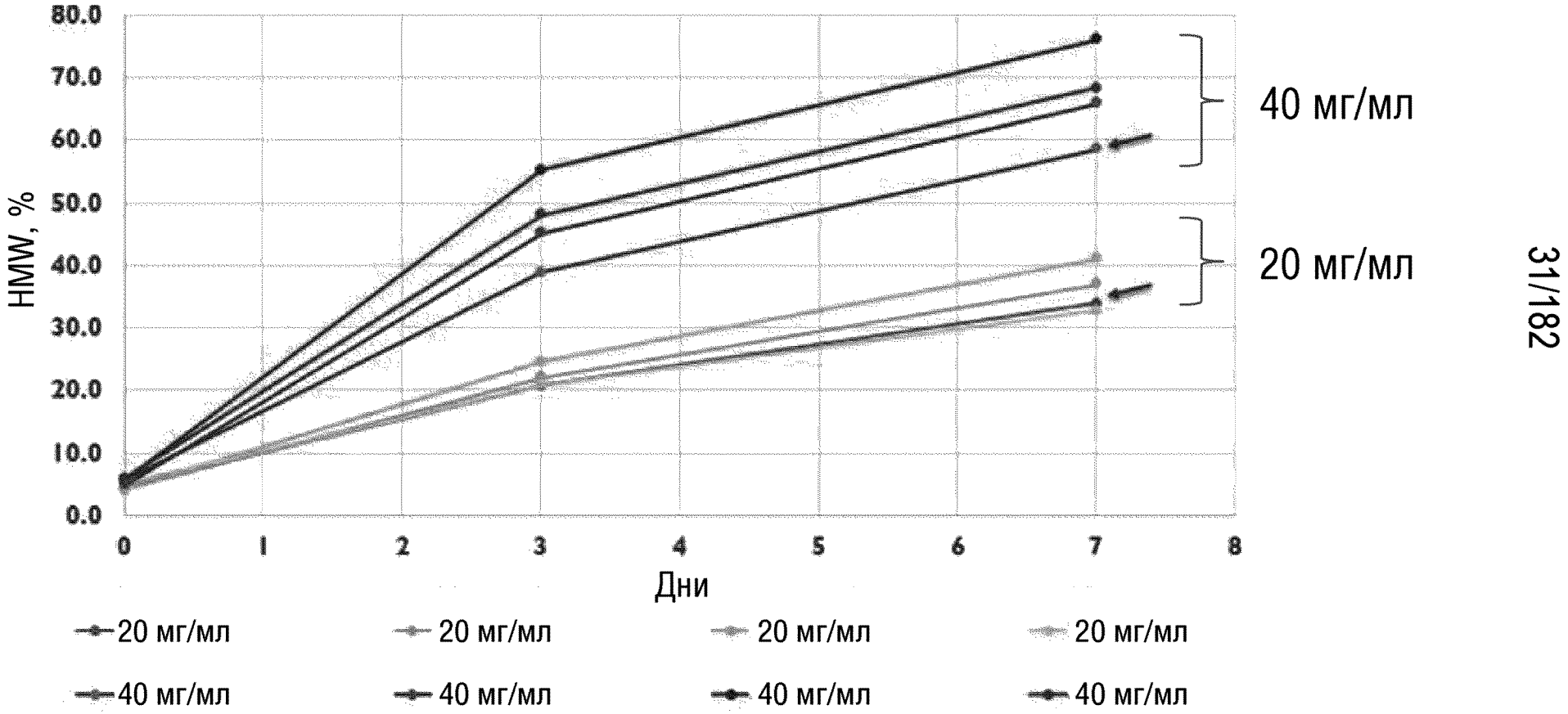
ФИГ.24А


10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
HMW, %
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Дни
40 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл

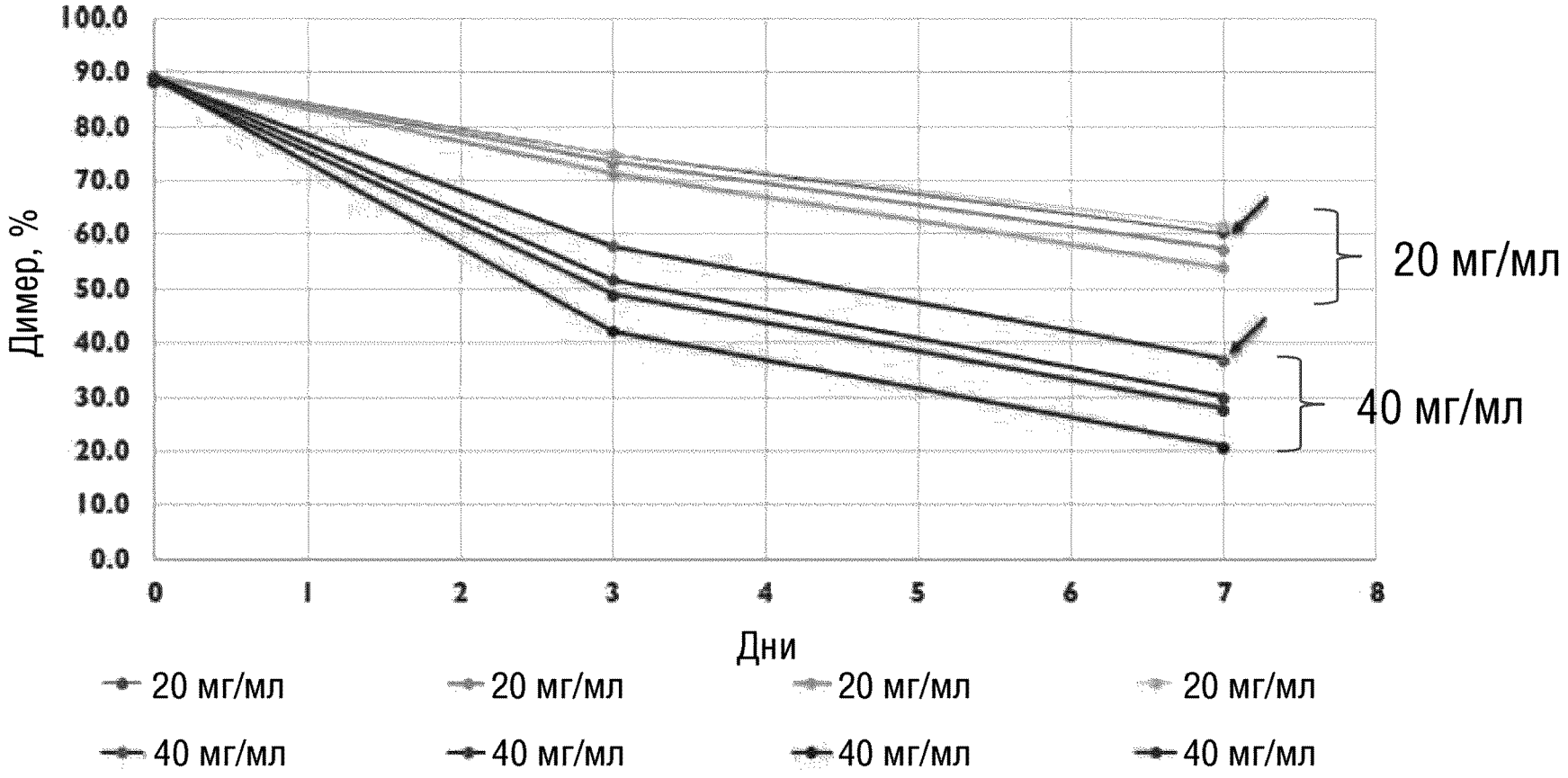
ФИГ.24B


91.0
90.5
90.0
89.5
89.0
88.5
88.0
87.5
87.0
86.5
Димер, %
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Дни
20 мг/мл
40 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл

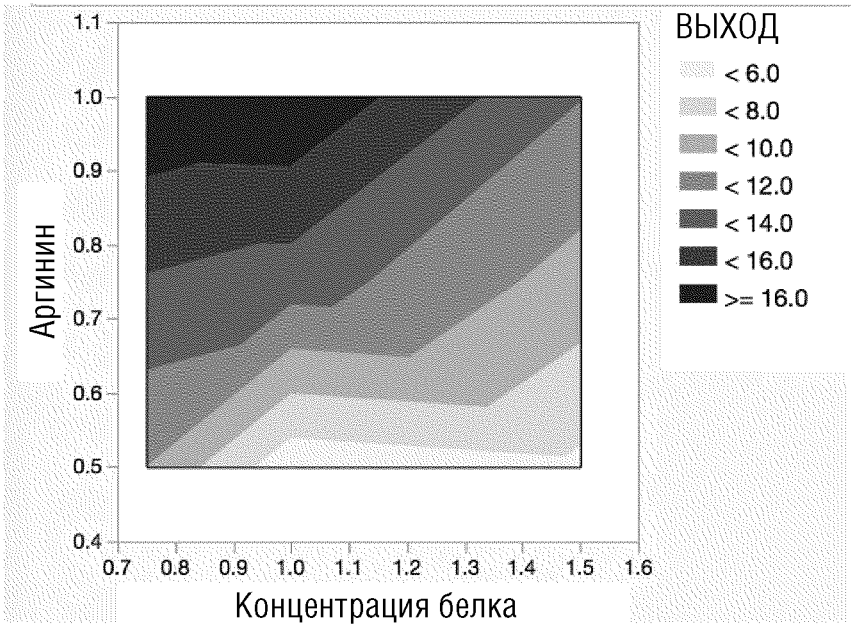
ФИГ.24C


80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
HMW, %
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Дни
40 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл

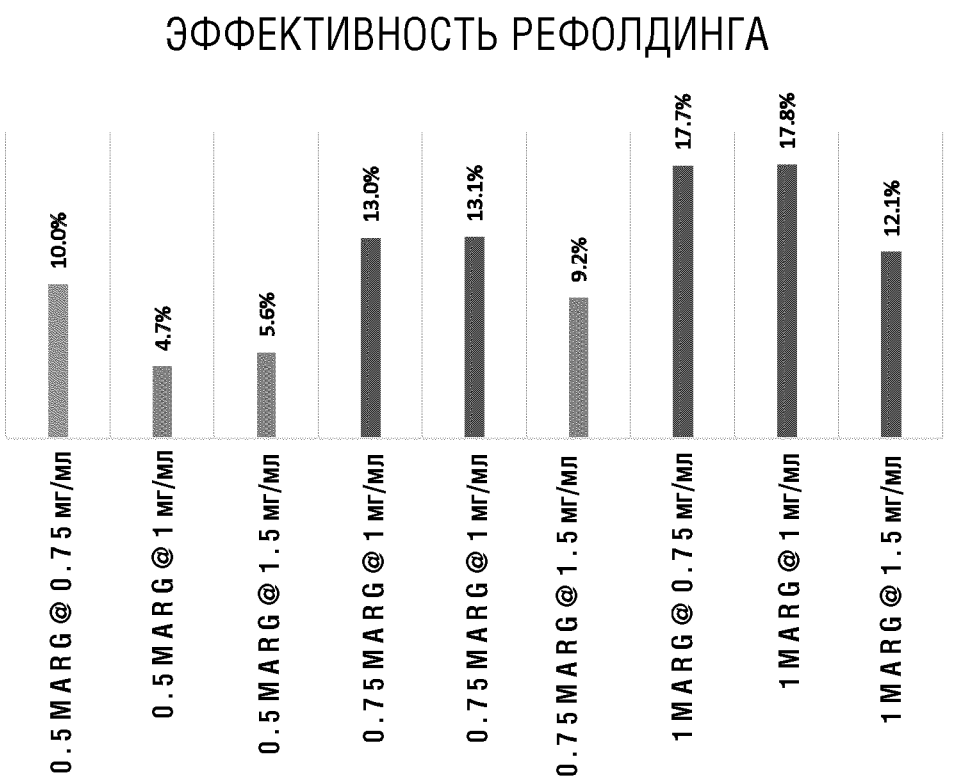
ФИГ.24D


100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
Димер, %
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Дни
20 мг/мл
40 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
20 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл
40 мг/мл

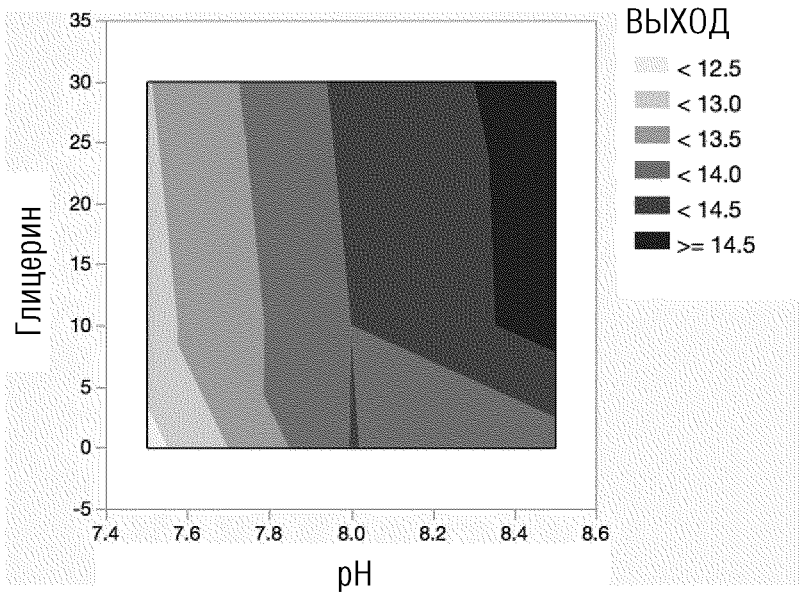
ФИГ.25А



ФИГ.25В



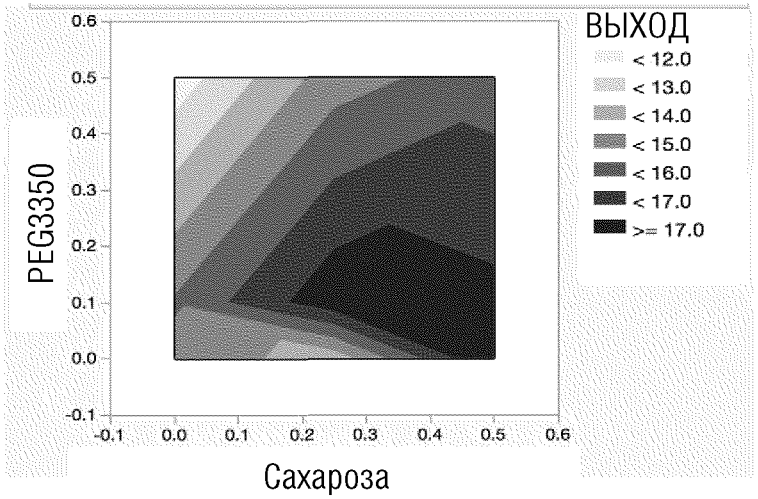
ФИГ.26A



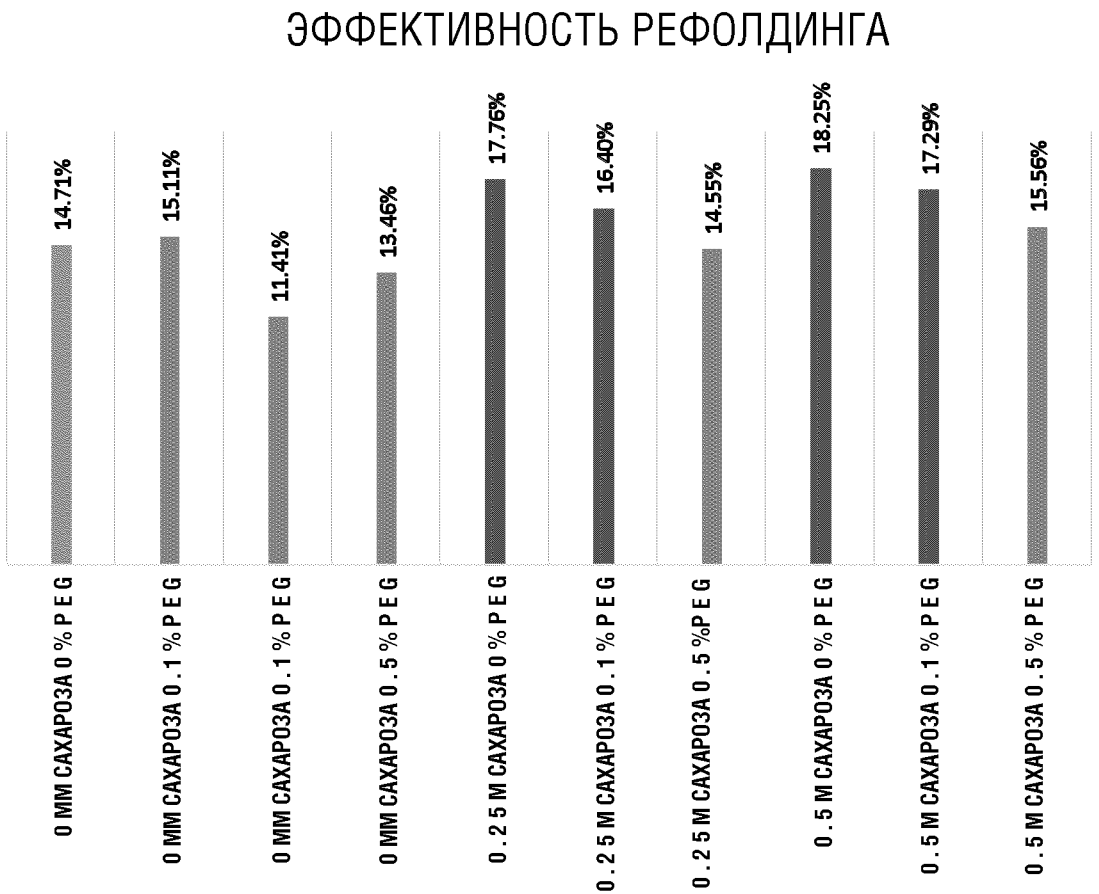
ФИГ.26B



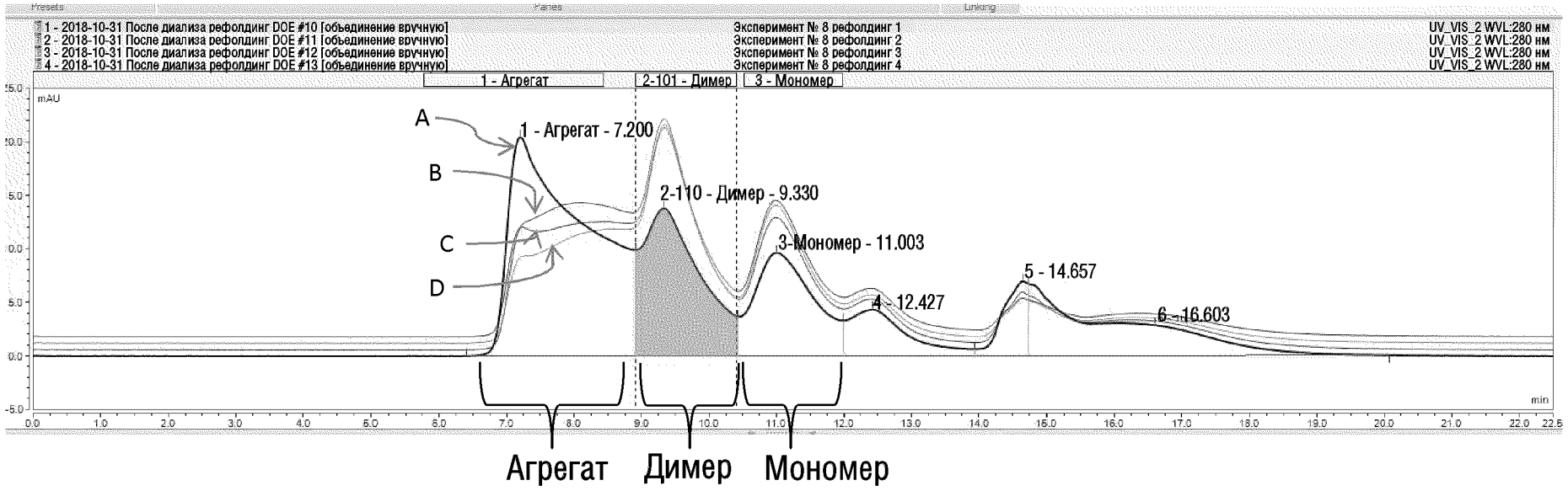
ФИГ.27A



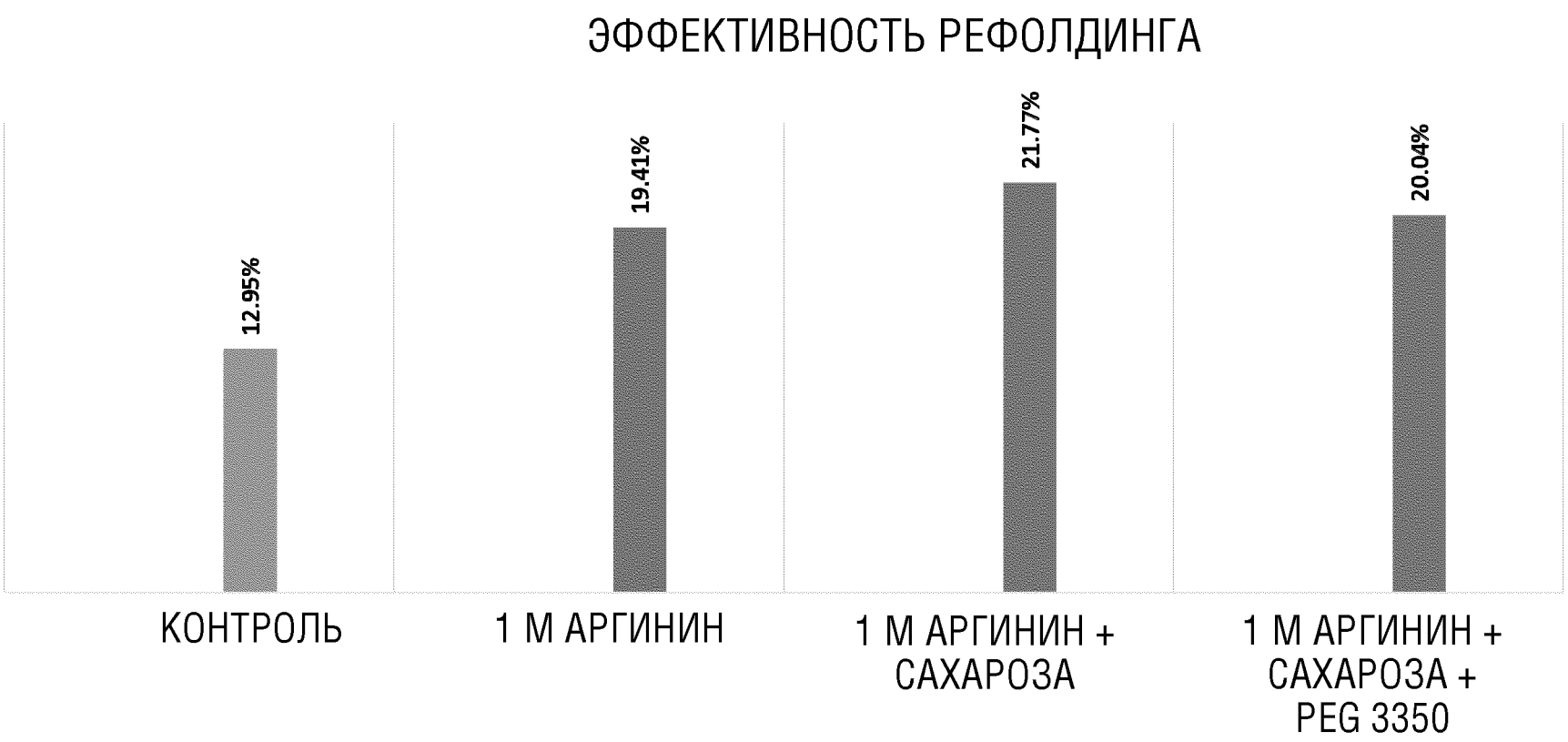
ФИГ.27B



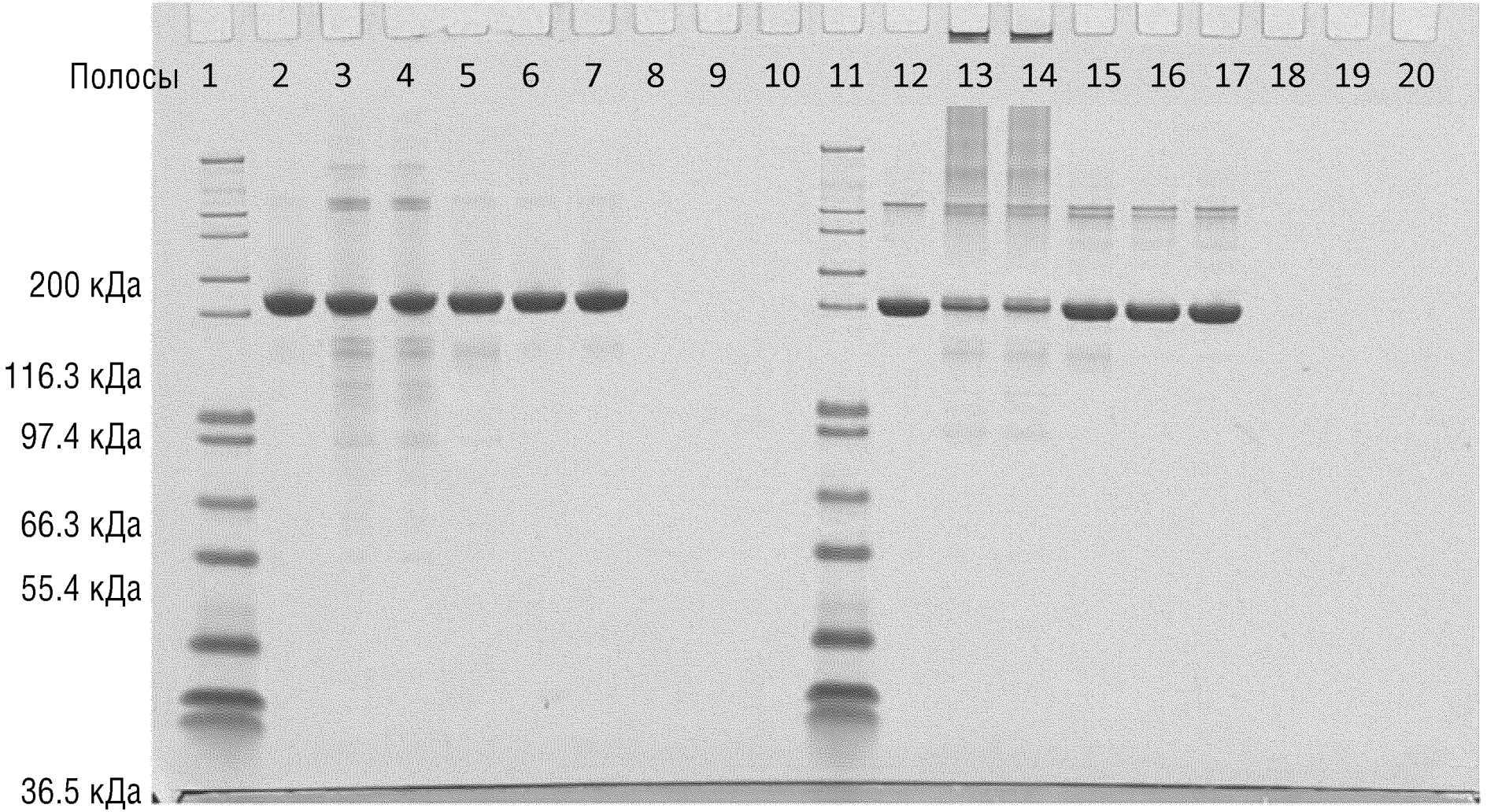
ФИГ.28


1 - 2018-10-31 После диализа рефолдинг DOE #10 [объединение вручную]
2 - 2018-10-31 После диализа рефолдинг DOE #11 [объединение вручную]
3 - 2018-10-31 После диализа рефолдинг DOE #12 [объединение вручную]
4 - 2018-10-31 После диализа рефолдинг DOE #13 [объединение вручную]
Эксперимент № 8 рефолдинг 1
Эксперимент № 8 рефолдинг 2
Эксперимент № 8 рефолдинг 3
Эксперимент № 8 рефолдинг 4
UV_VIS_2 WVL:280 нм
1 - Агрегат
2-101 - Димер
3 - Мономер
mAU
A
B
C
D
1 - Агрегат - 7.200
2-110 - Димер - 9.330
3-Мономер - 11.003
4 - 12.427
5 - 14.657
6 - 16.603
min
Агрегат
Димер
Мономер

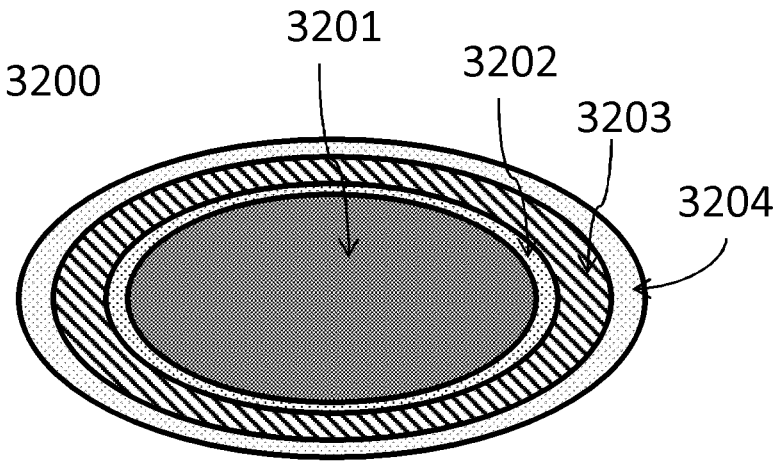
ФИГ.29


ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕФОЛДИНГА
12.95%
19.41%
21.77%
20.04%
КОНТРОЛЬ
1 М АРГИНИН
1 М АРГИНИН + САХАРОЗА
1 М АРГИНИН + САХАРОЗА + PEG 3350

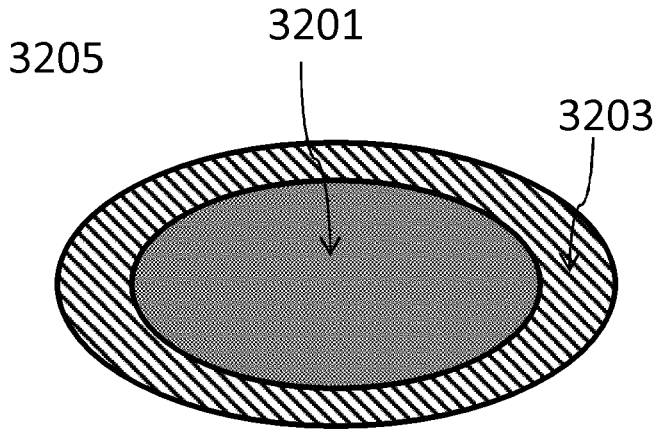
ФИГ.30


Полосы 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
200 кДа
116.3 кДа
97.4 кДа
66.3 кДа
55.4 кДа
36.5 кДа

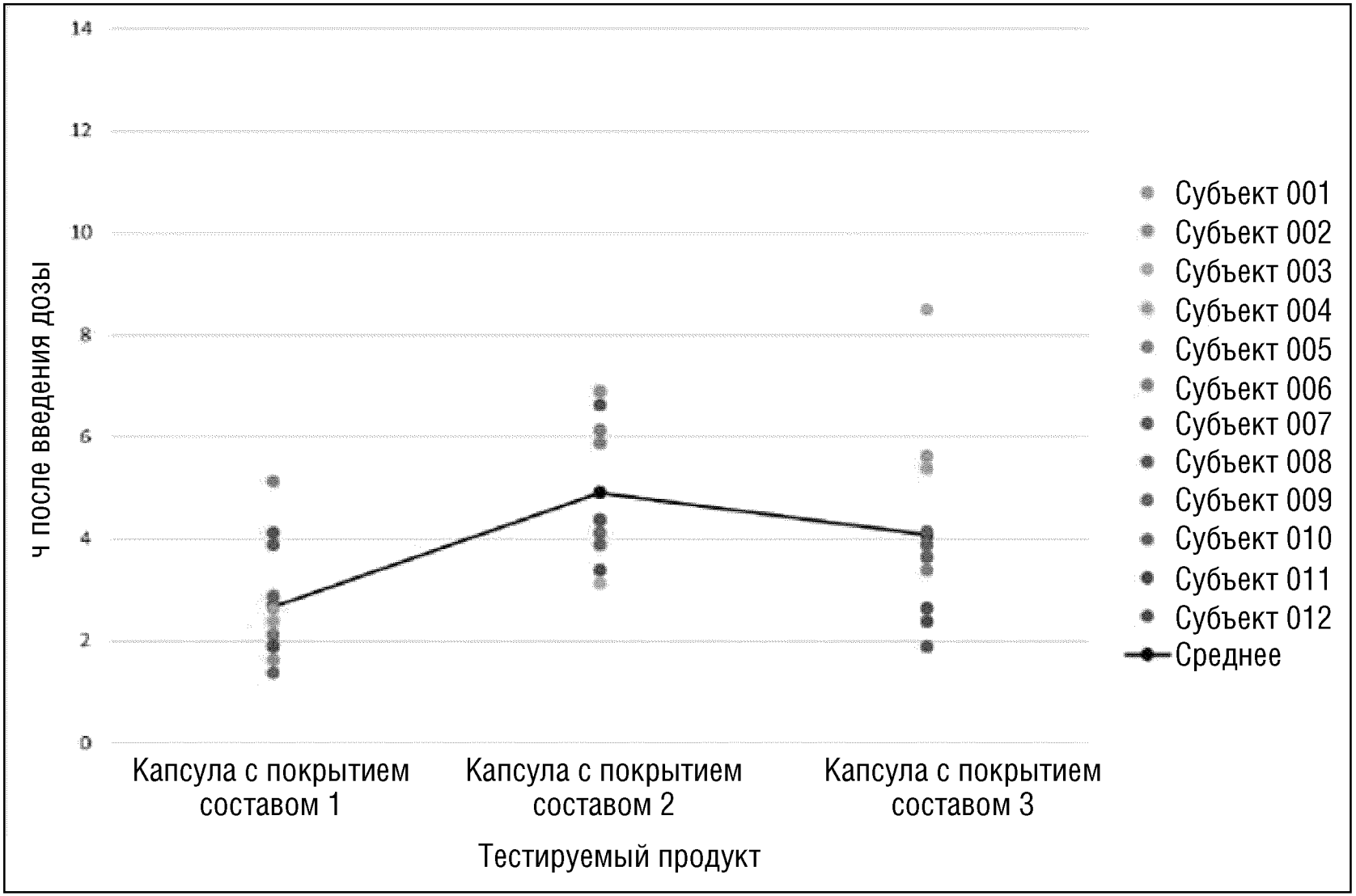
ФИГ.31A



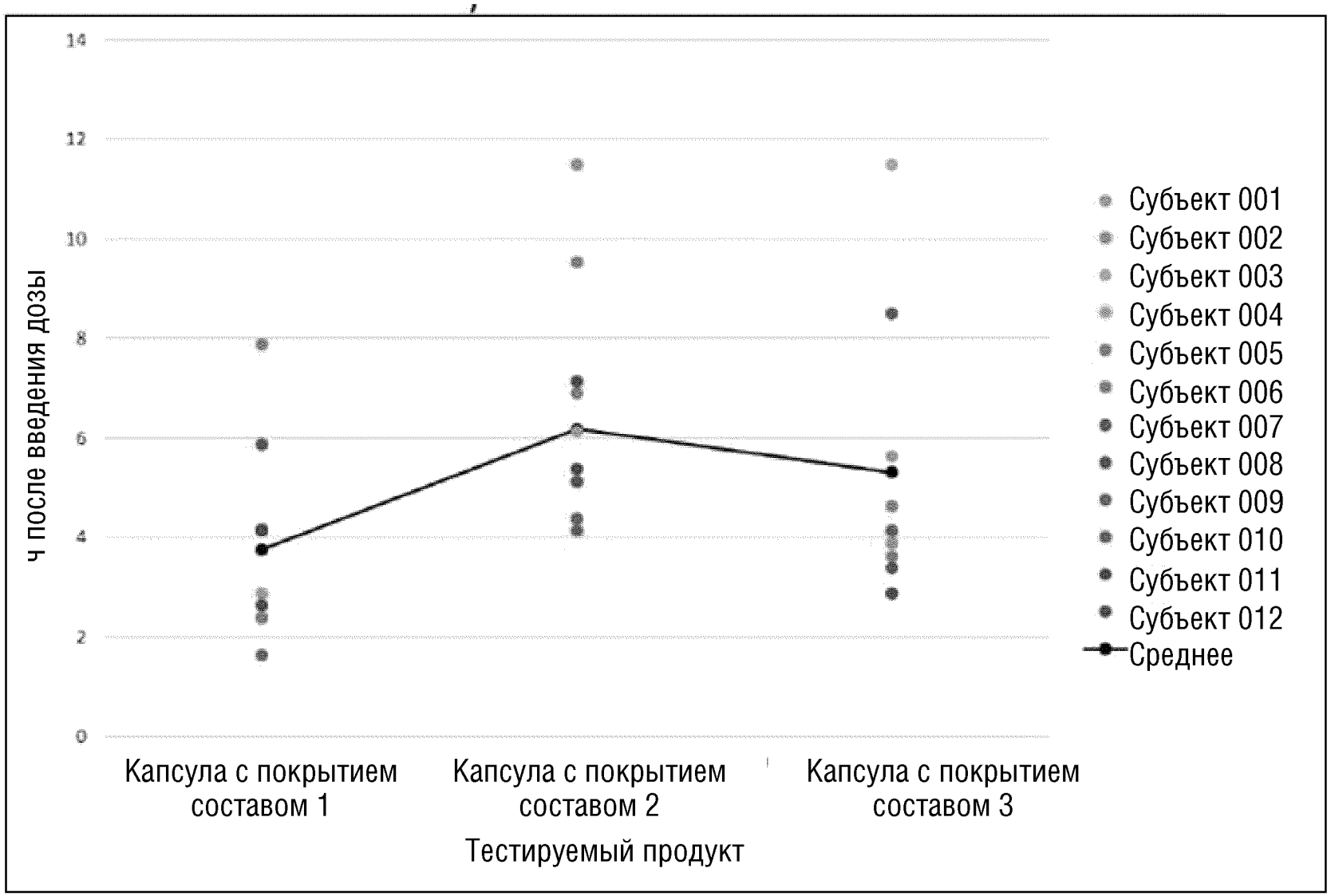
ФИГ.31B



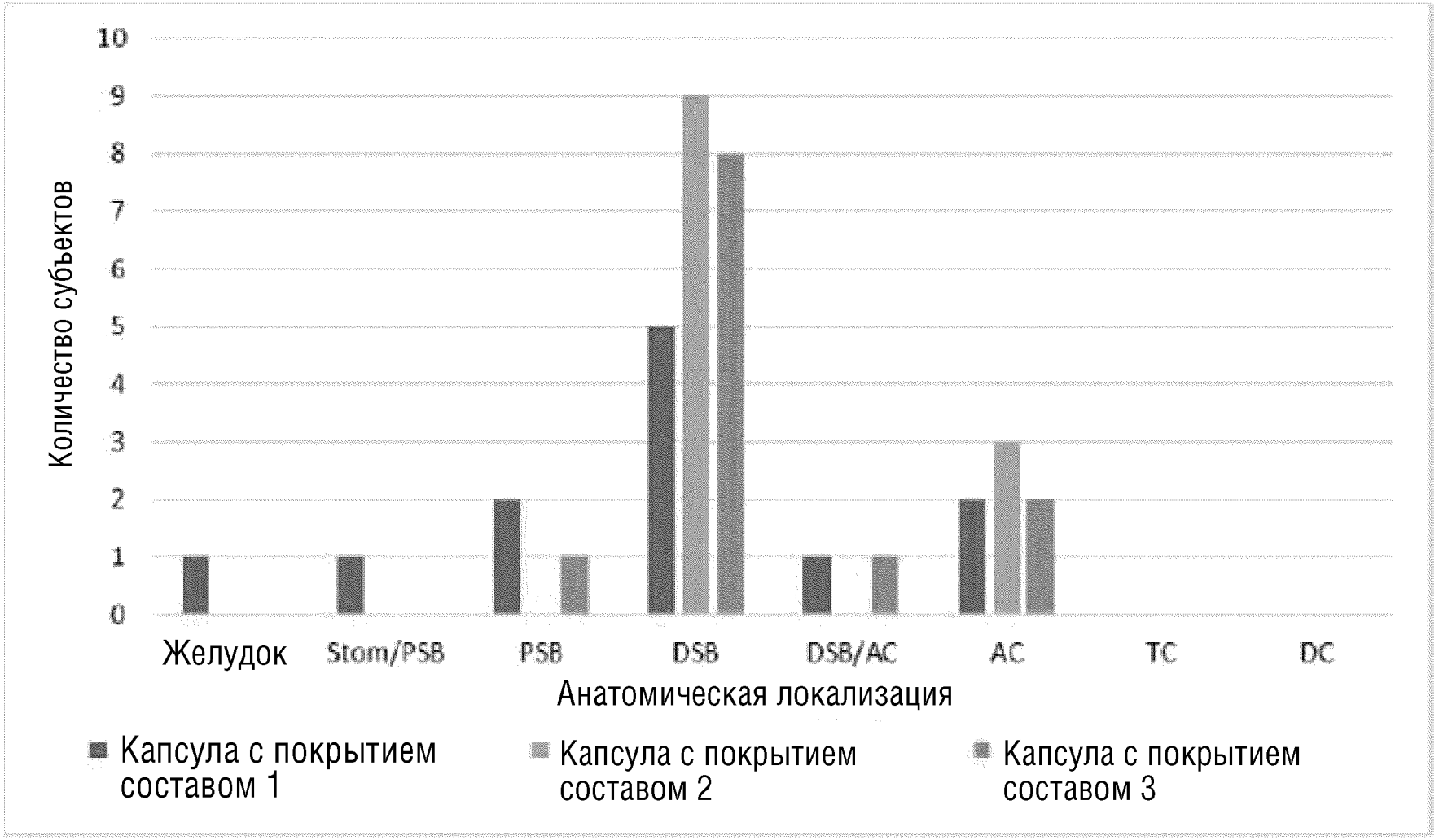
ФИГ.32А


14
12
10
8
6
4
2
0
ч после введения дозы
Капсула с покрытием составом 1
Капсула с покрытием составом 2
Капсула с покрытием составом 3
Тестируемый продукт
Субъект 001
Субъект 002
Субъект 003
Субъект 004
Субъект 005
Субъект 006
Субъект 007
Субъект 008
Субъект 009
Субъект 010
Субъект 011
Субъект 012
Среднее

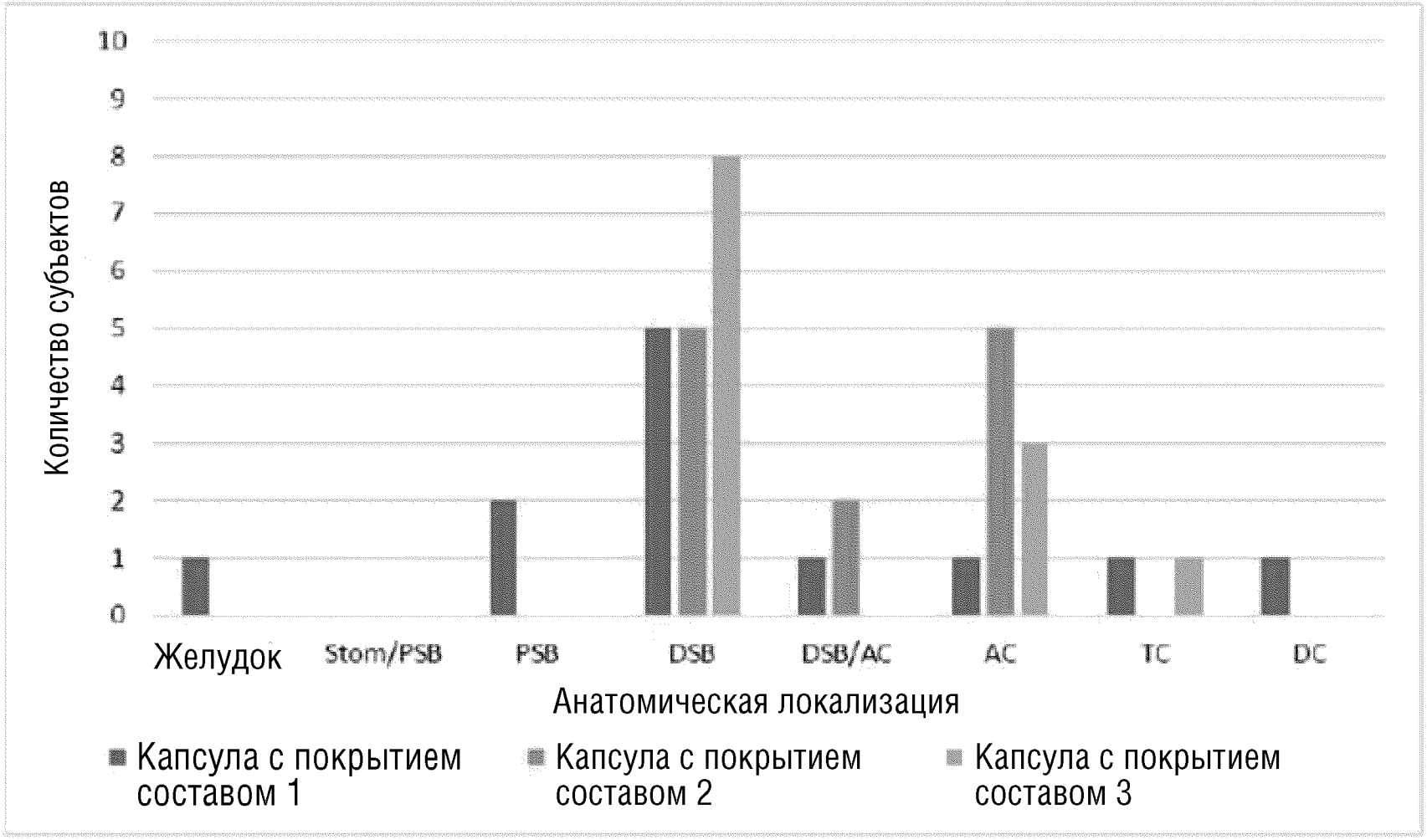
ФИГ.32B


14
12
10
8
6
4
2
0
ч после введения дозы
Капсула с покрытием составом 1
Капсула с покрытием составом 2
Капсула с покрытием составом 3
Тестируемый продукт
Субъект 001
Субъект 002
Субъект 003
Субъект 004
Субъект 005
Субъект 006
Субъект 007
Субъект 008
Субъект 009
Субъект 010
Субъект 011
Субъект 012
Среднее

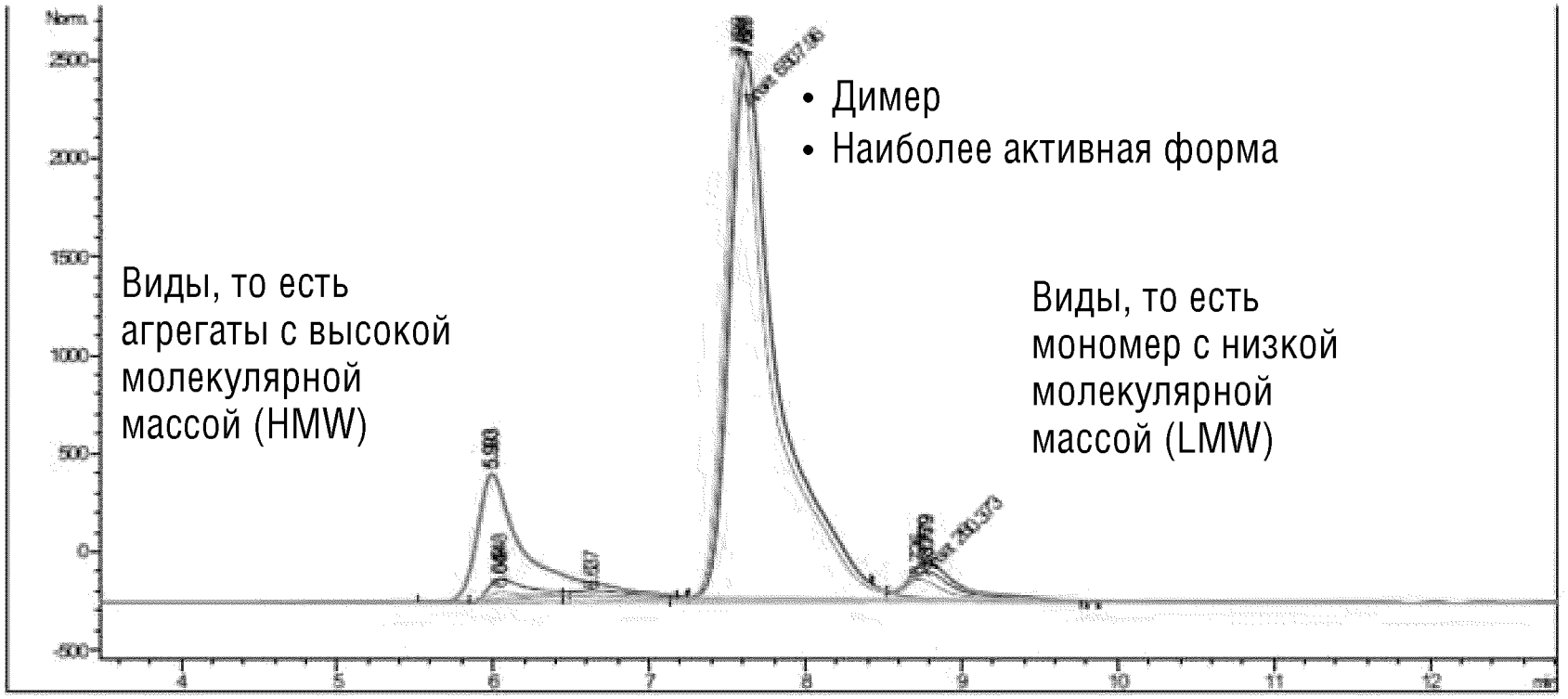
ФИГ.33А


10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Количество субъектов
Желудок
Stom/PSB
PSB
DSB
DSB/AC
AC
TC
DC
Анатомическая локализация
Капсула с покрытием составом 1
Капсула с покрытием составом 2
Капсула с покрытием составом 3

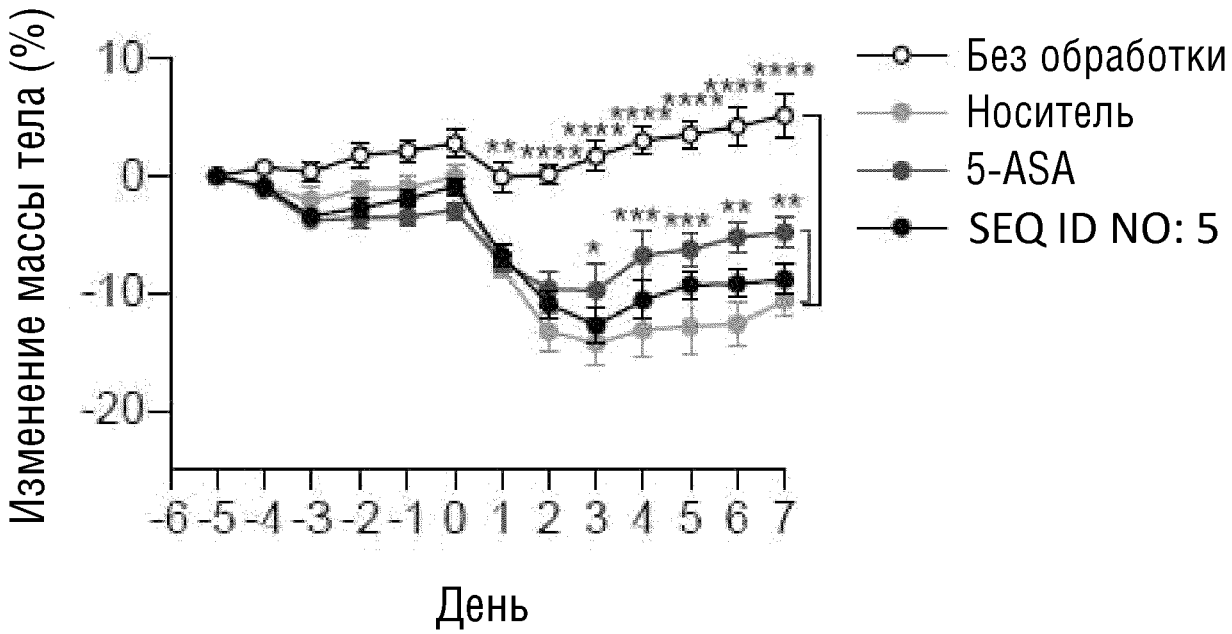
ФИГ.33B


10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Количество субъектов
Желудок
Stom/PSB
PSB
DSB
DSB/AC
AC
TC
DC
Анатомическая локализация
Капсула с покрытием составом 1
Капсула с покрытием составом 2
Капсула с покрытием составом 3

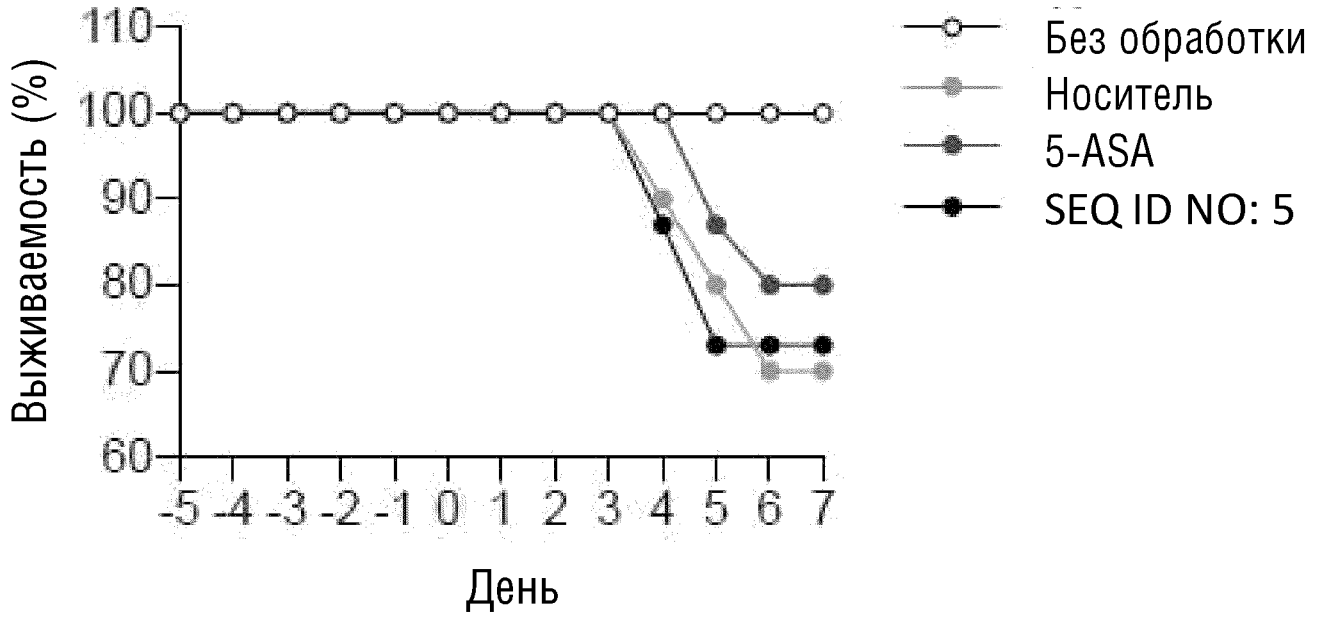
ФИГ.34


Norm.
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
4
5
6
7
8
9
10
11
12
min
• Димер
• Наиболее активная форма
Виды, то есть агрегаты с высокой молекулярной массой (HMW)
Виды, то есть мономер с низкой молекулярной массой (LMW)

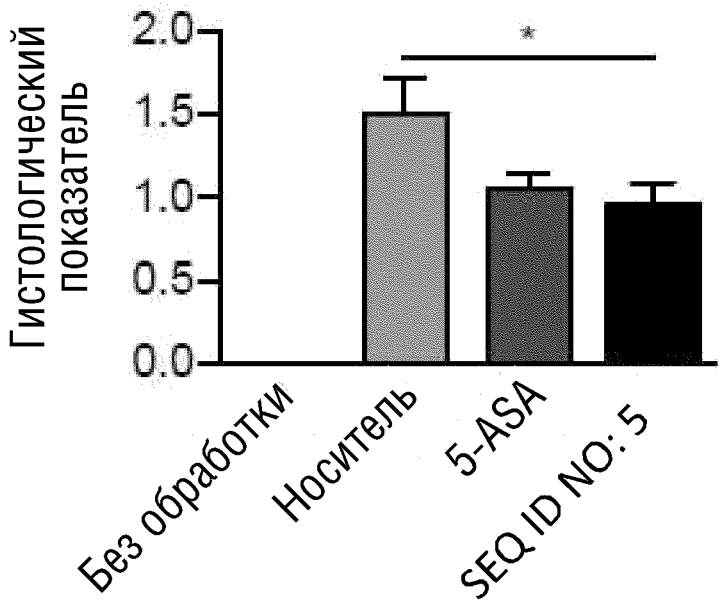
ФИГ.35


Изменение массы тела (%)
10
0
-10
-20
-6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7
День
Без обработки
Носитель
5-ASA
SEQ ID NO: 5

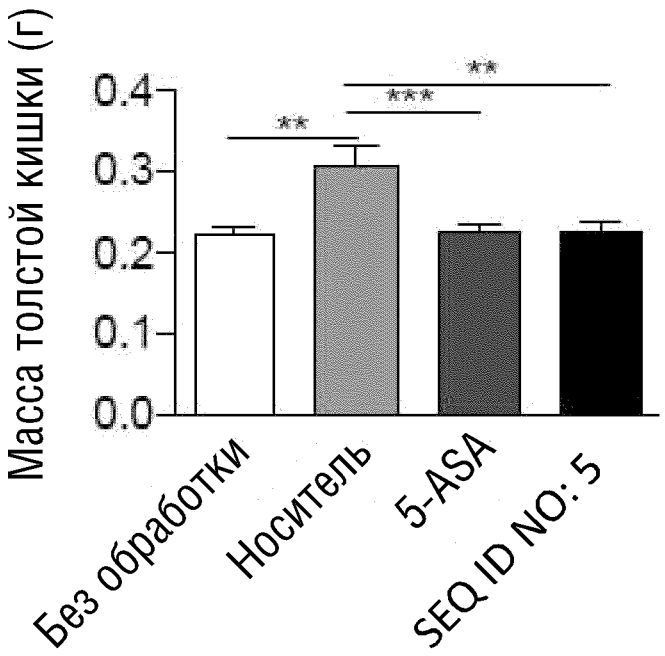
ФИГ.36


110
100
90
80
70
60
Выживаемость (%)
-5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7
День
Без обработки
Носитель
5-ASA
SEQ ID NO: 5

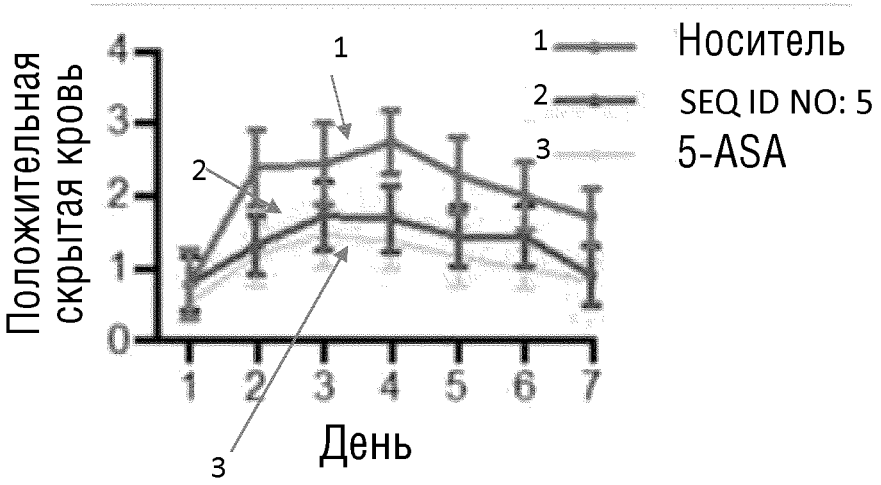
ФИГ.37


Гистологический показатель
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Без обработки
Носитель
5-ASA
SEQ ID NO: 5

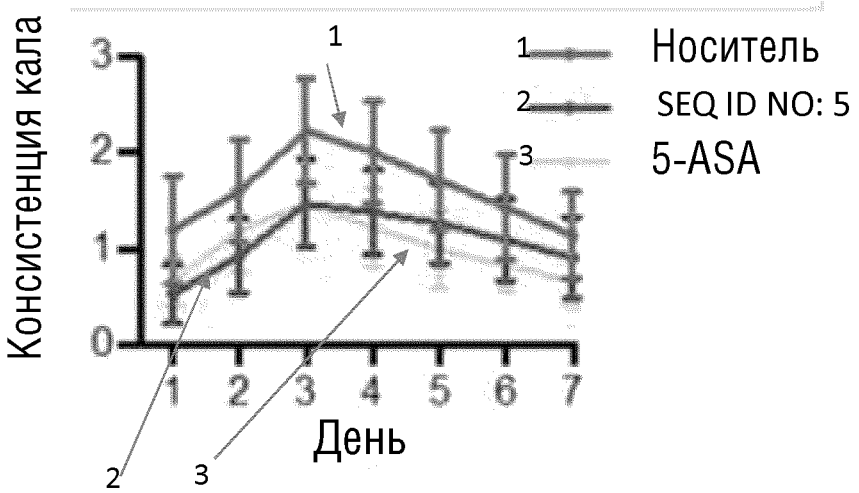
ФИГ.38А


Масса толстой кишки (г)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
***
**
Без обработки
Носитель
5-ASA
SEQ ID NO: 5

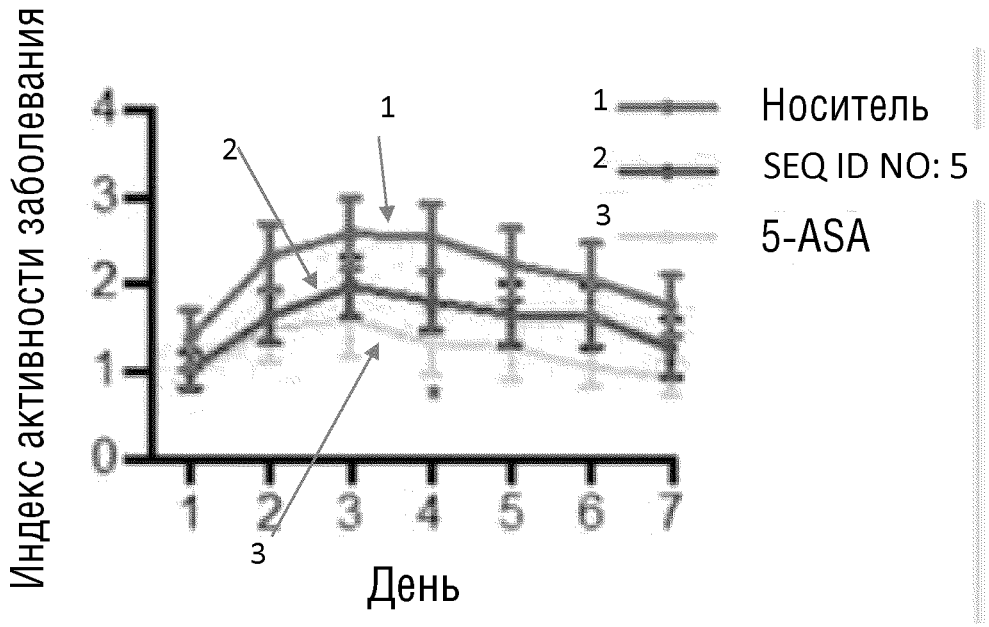
ФИГ.38B



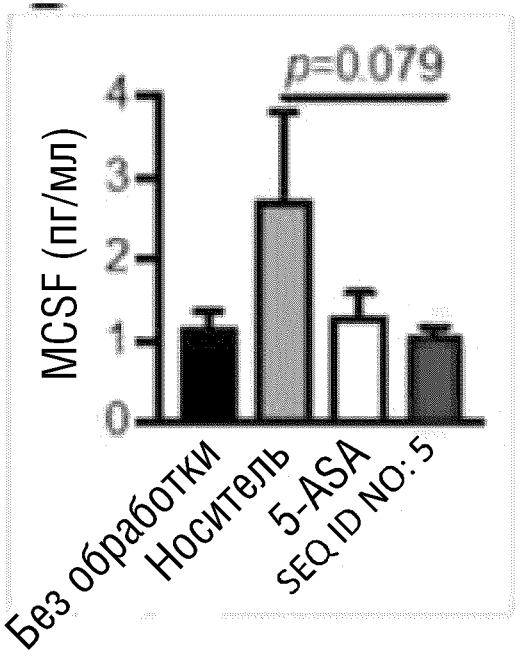
ФИГ.38C



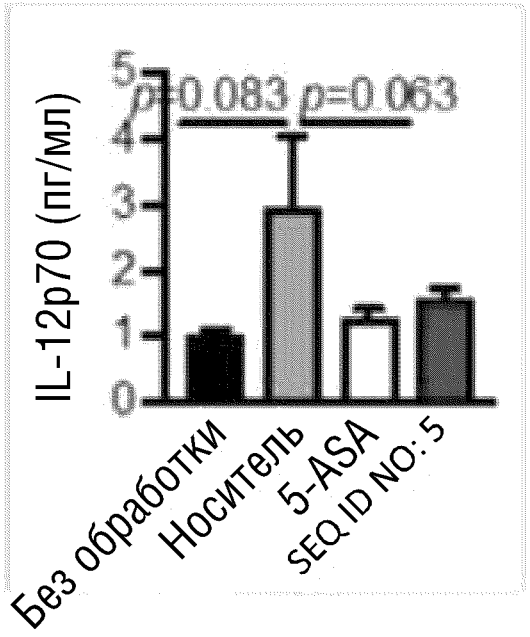
ФИГ.38D


Индекс активности заболевания
4
3
2
1
0
1
2
3
4
5
6
7
День
1
2
3
1
2
3
Носитель
SEQ ID NO: 5
5-ASA

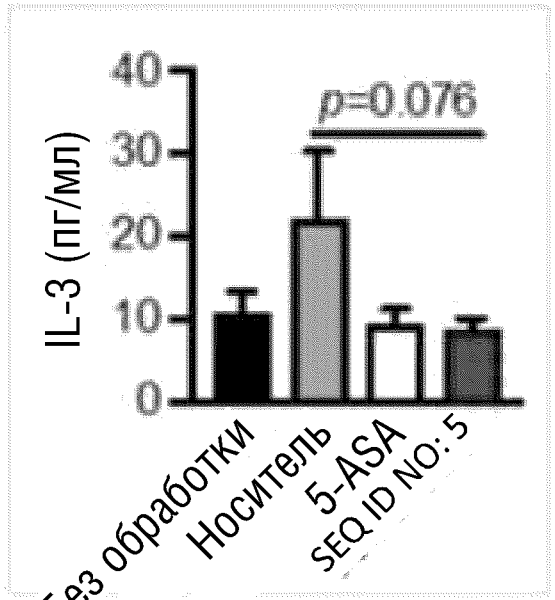
ФИГ.38E



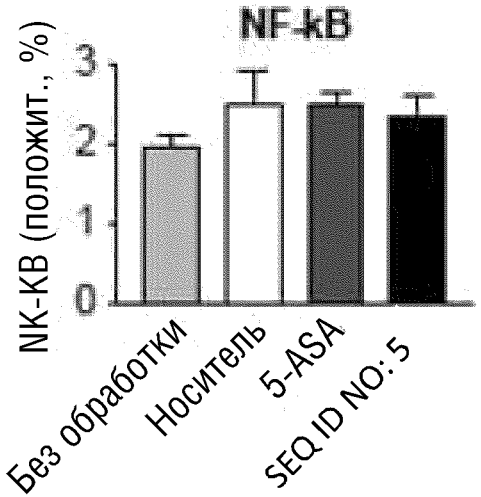
ФИГ.38F



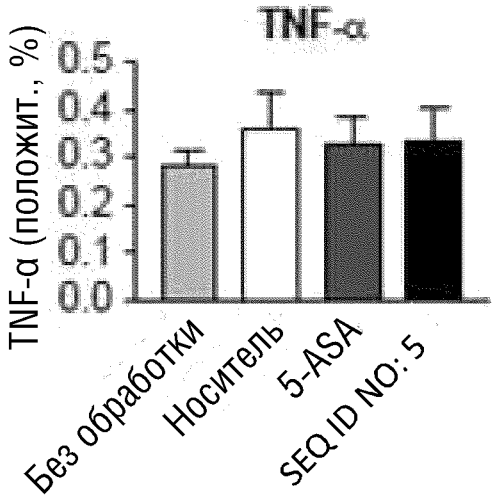
ФИГ.38G



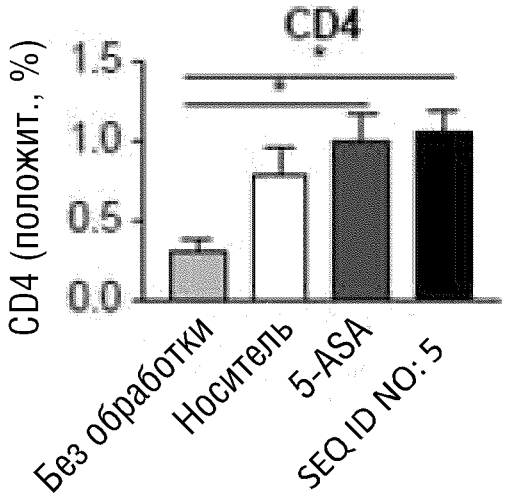
ФИГ.39A



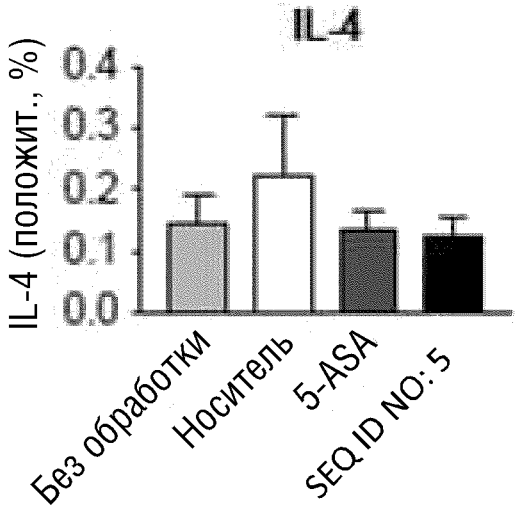
ФИГ.39B



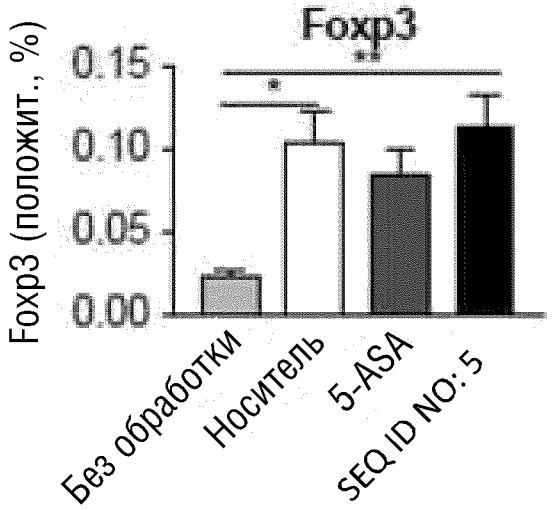
ФИГ.39C



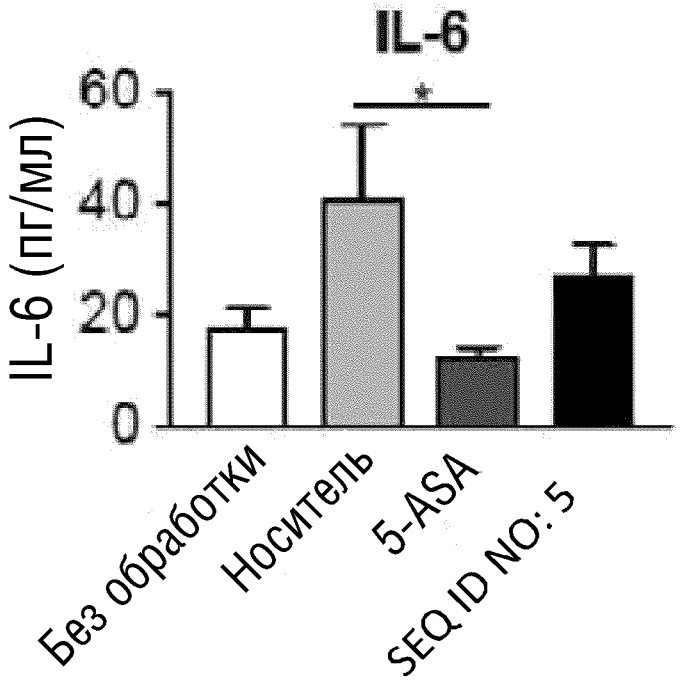
ФИГ.39D



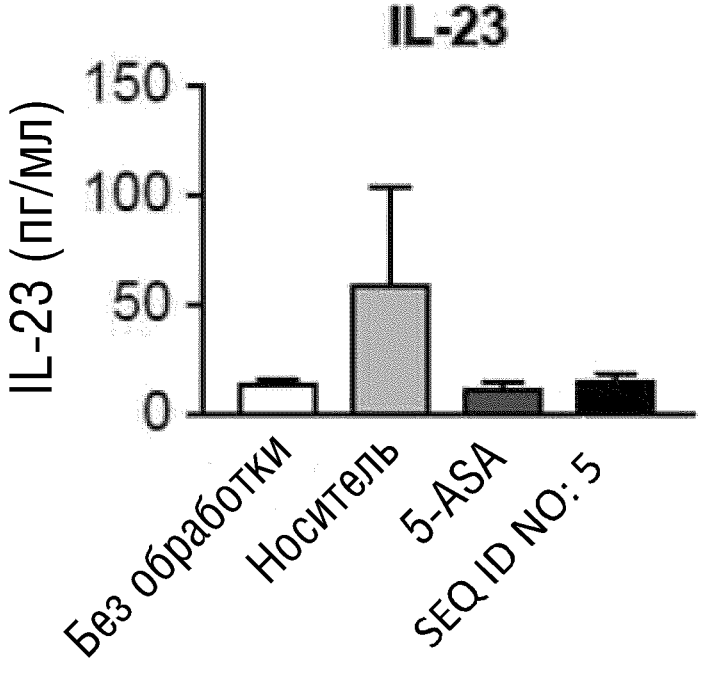
ФИГ.39E



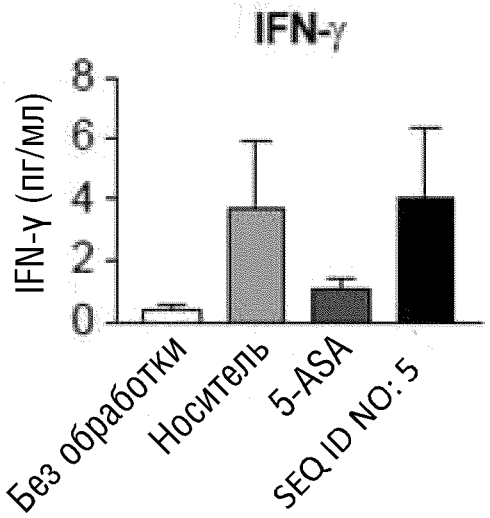
ФИГ.40А



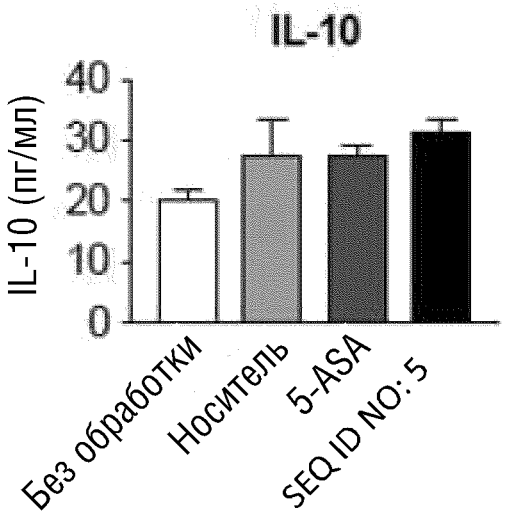
ФИГ.40В



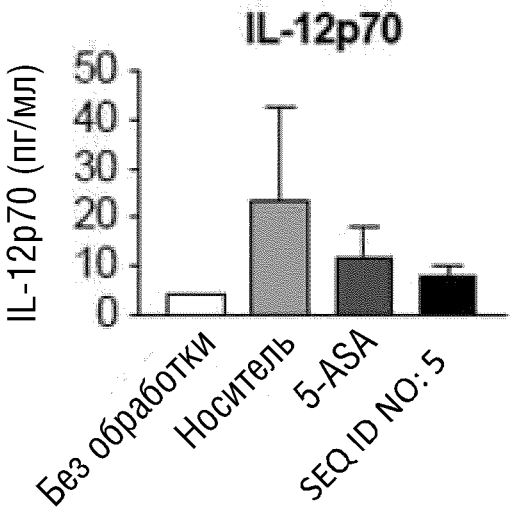
ФИГ.41A



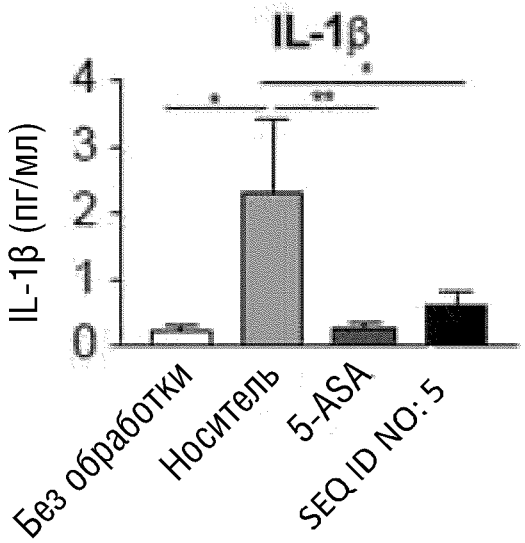
ФИГ.41B



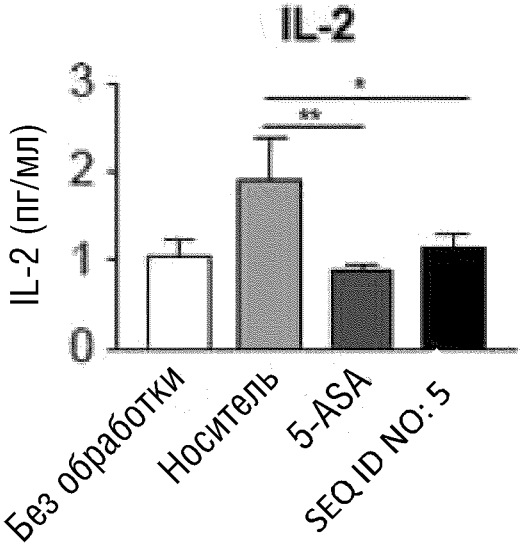
ФИГ.41C



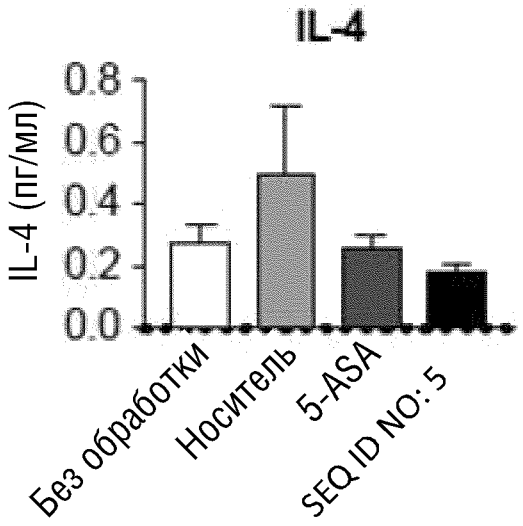
ФИГ.41D



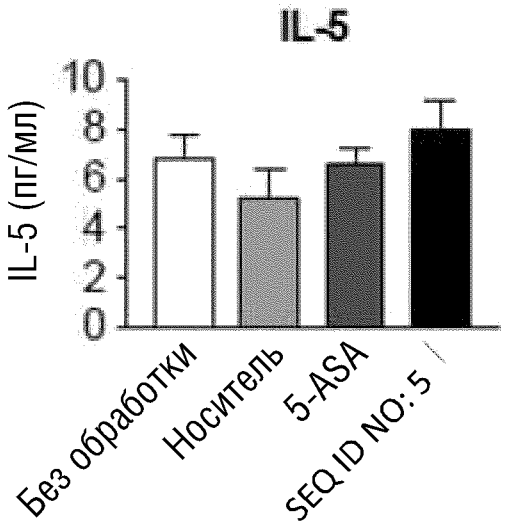
ФИГ.41E



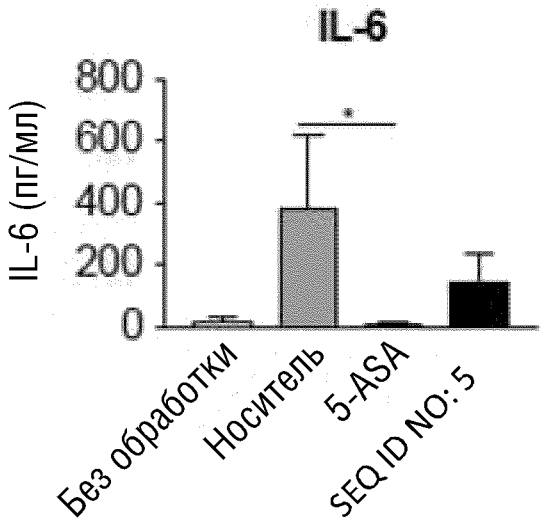
ФИГ.41F



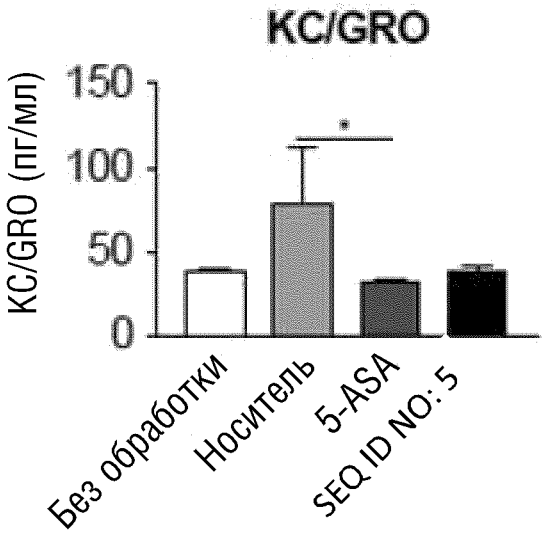
ФИГ.41G



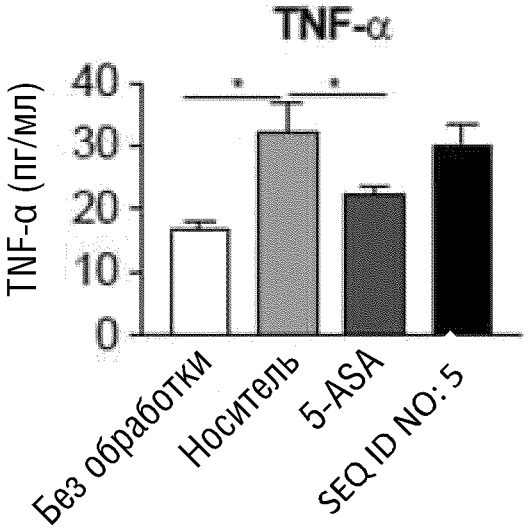
ФИГ.41H



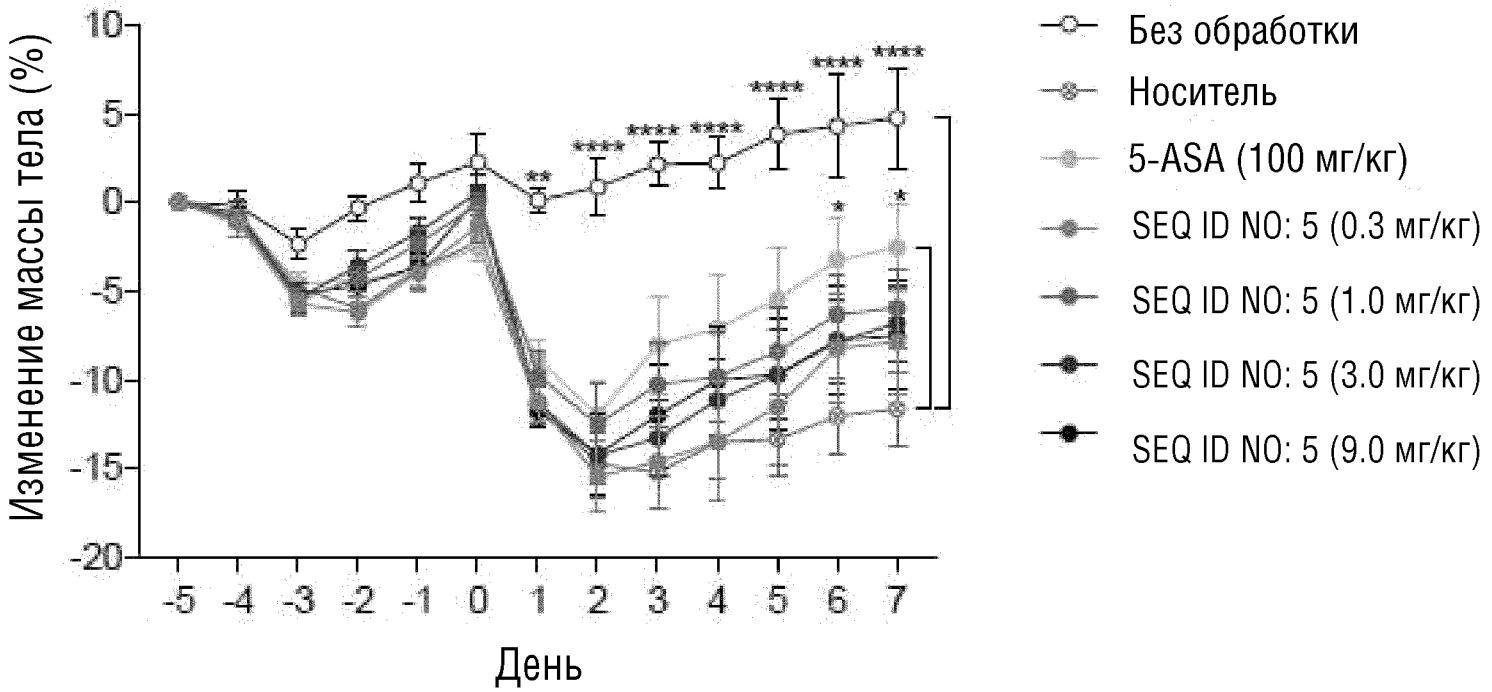
ФИГ.41I



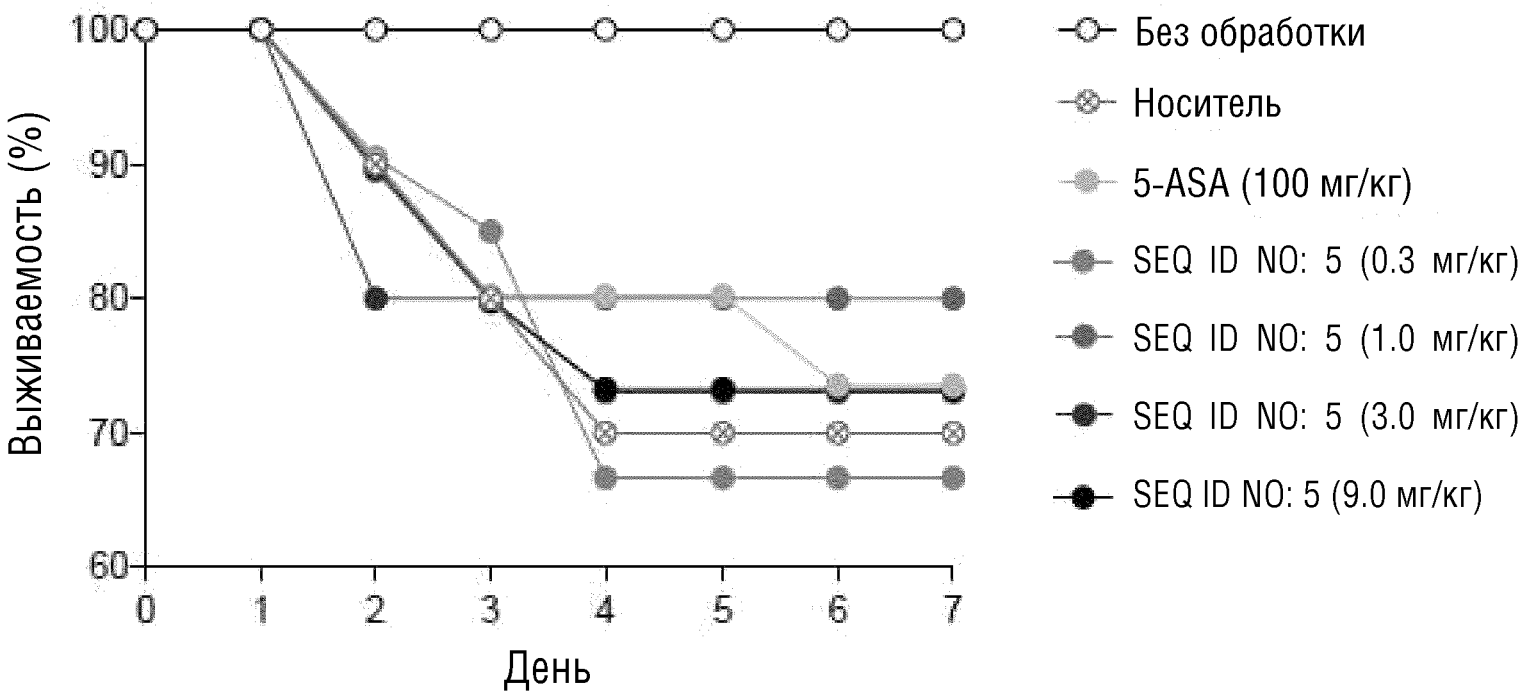
ФИГ.41J



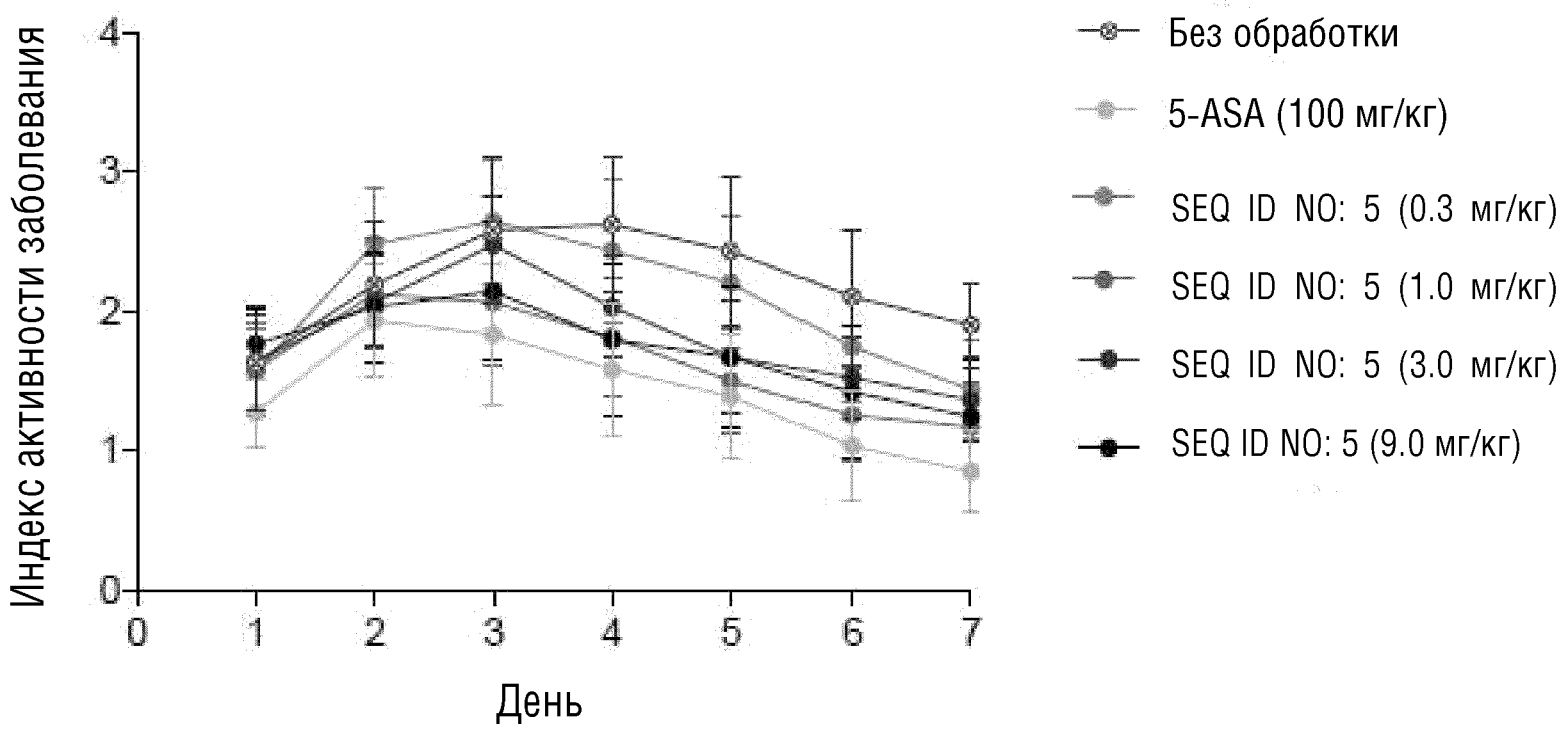
ФИГ.42


Изменение массы тела (%)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7
День
Без обработки
Носитель
5-ASA (100 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (1.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (9.0 мг/кг)

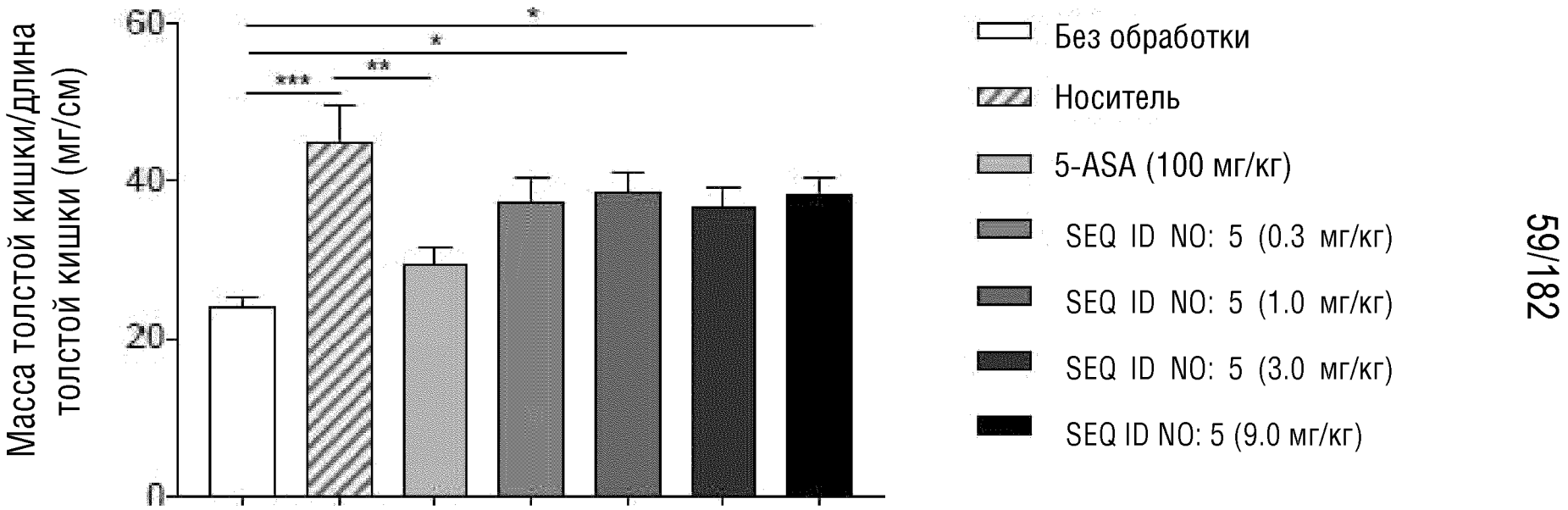
ФИГ.43


Выживаемость (%)
100
90
80
70
60
0
1
2
3
4
5
6
7
День
Без обработки
Носитель
5-ASA (100 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (1.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (9.0 мг/кг)

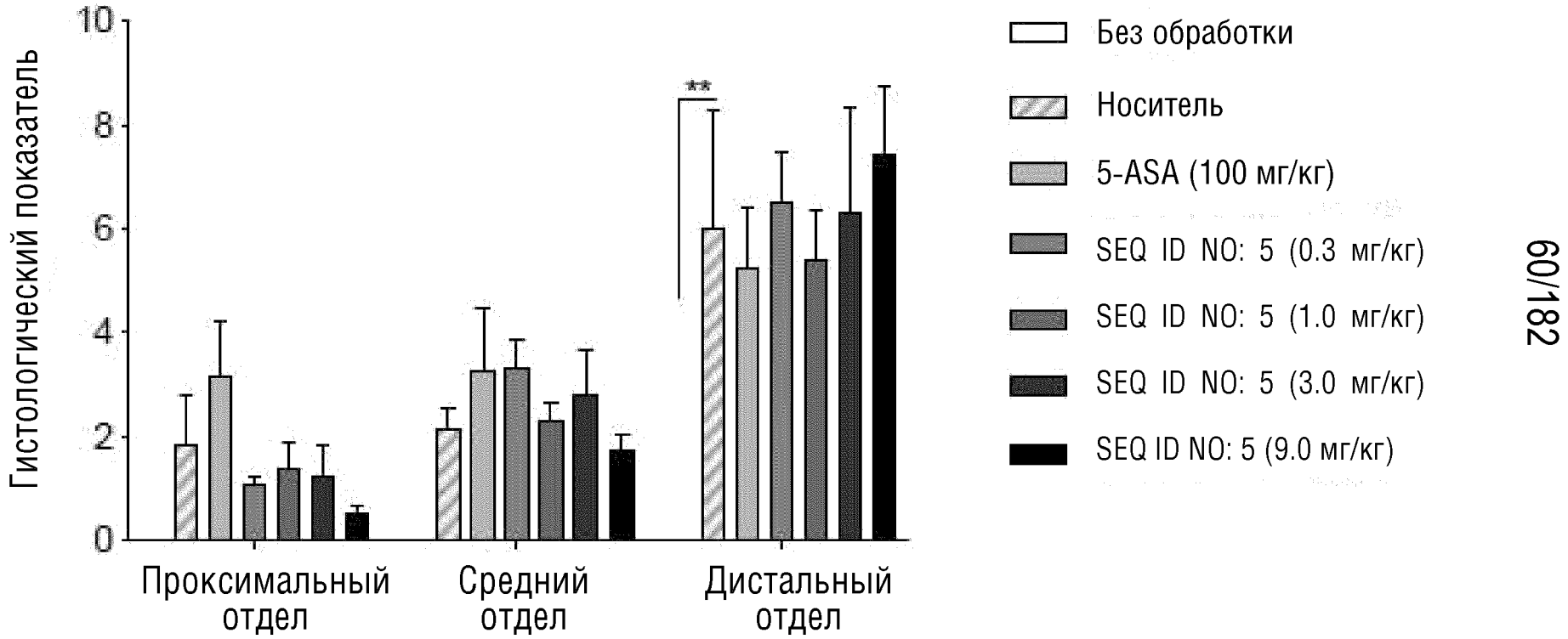
ФИГ.44


Индекс активности заболевания
0
1
2
3
4
0
1
2
3
4
5
6
7
День
Без обработки
5-ASA (100 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (1.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (9.0 мг/кг)

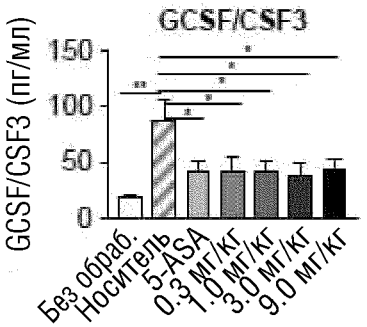
ФИГ.45


Масса толстой кишки/длина толстой кишки (мг/см)
60
40
20
0
***
**
*
*
Без обработки
Носитель
5-ASA (100 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (1.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (9.0 мг/кг)

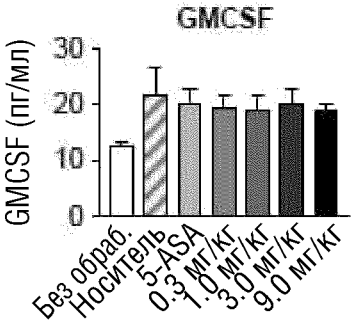
ФИГ.46


Гистологический показатель
10
8
6
4
2
0
**
Проксимальный отдел
Средний отдел
Дистальный отдел
Без обработки
Носитель
5-ASA (100 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (1.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (9.0 мг/кг)

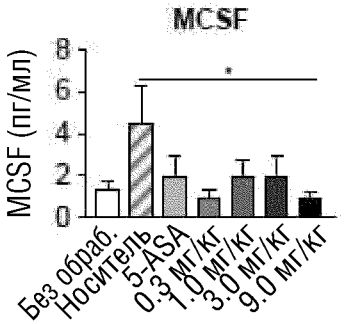
ФИГ.47A



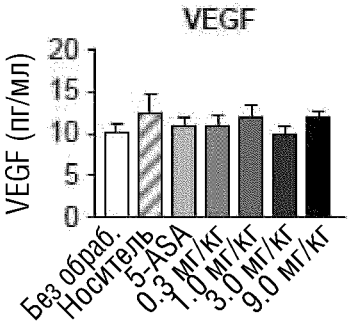
ФИГ.47B



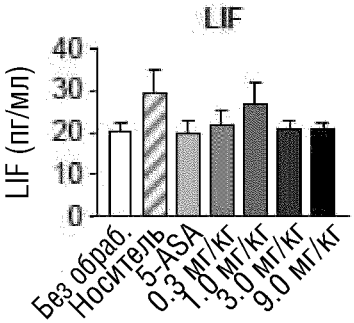
ФИГ.47C



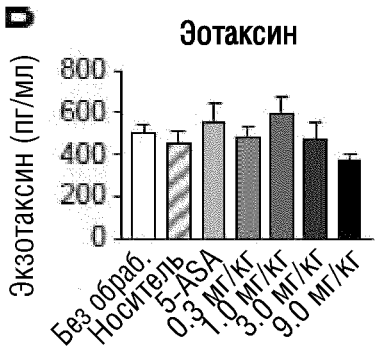
ФИГ.47D



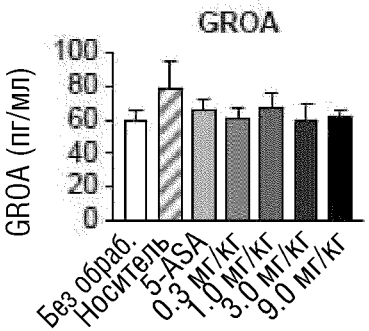
ФИГ.47E



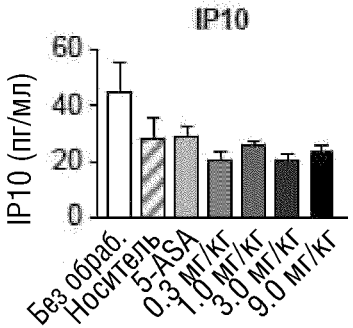
ФИГ.47F



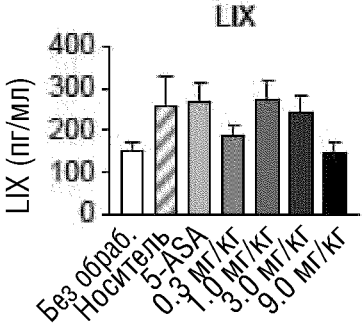
ФИГ.47G



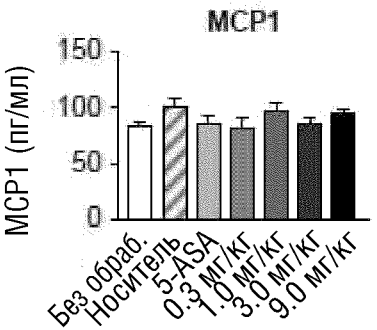
ФИГ.47H



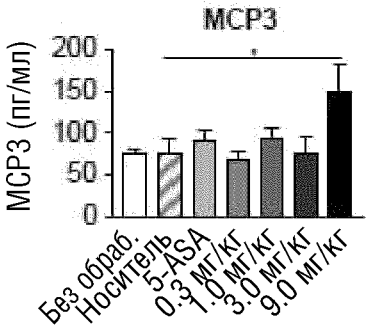
ФИГ.47I



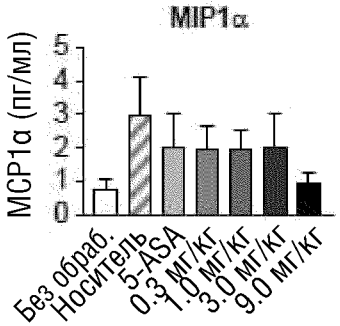
ФИГ.47J



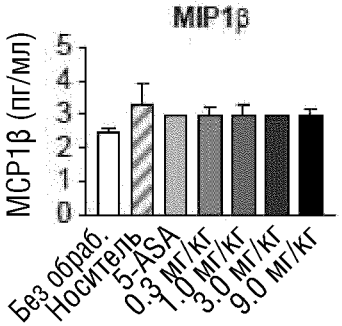
ФИГ.48K



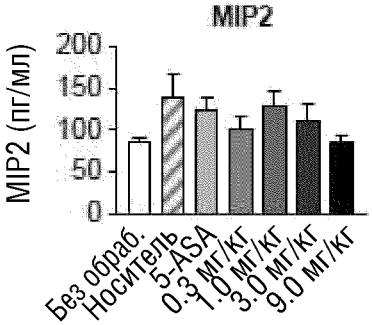
ФИГ.48L



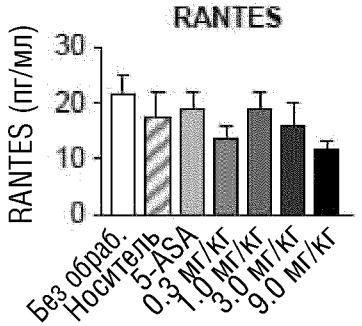
ФИГ.48M



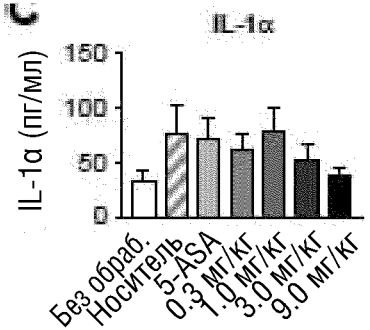
ФИГ.48N



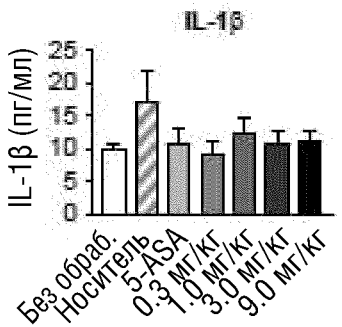
ФИГ.48O



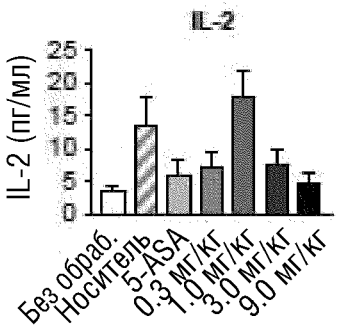
ФИГ.47P



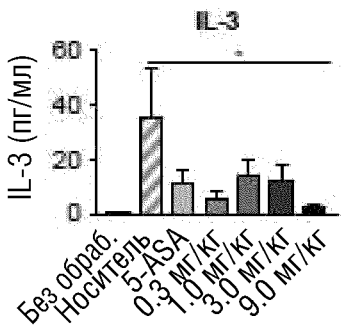
ФИГ.47Q



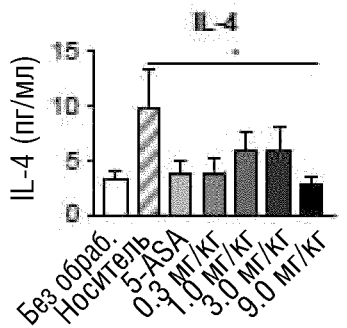
ФИГ.47R



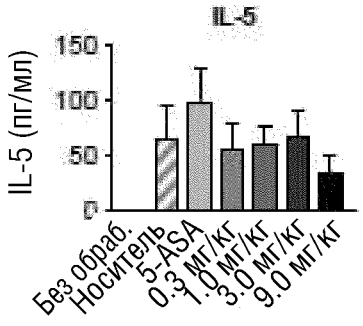
ФИГ.47S



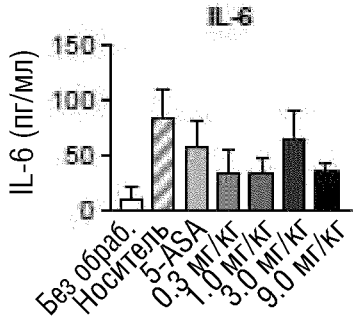
ФИГ.47T



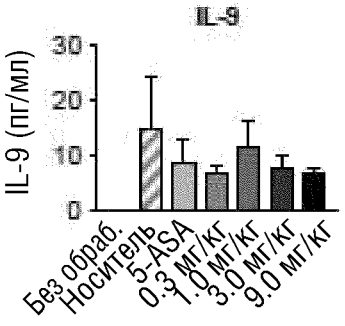
ФИГ.47U



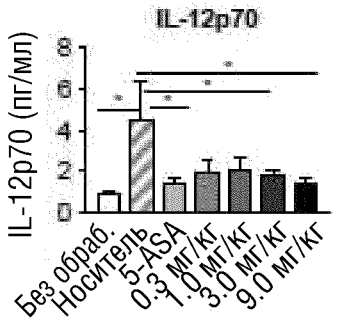
ФИГ.47V



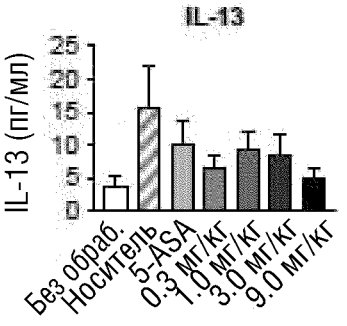
ФИГ.47W



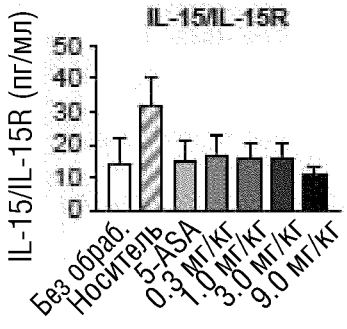
ФИГ.47X



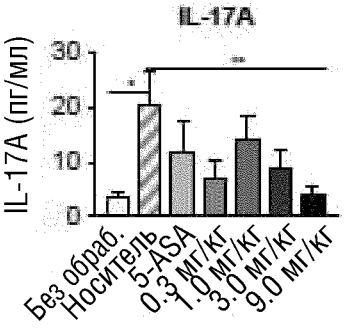
ФИГ.47Y



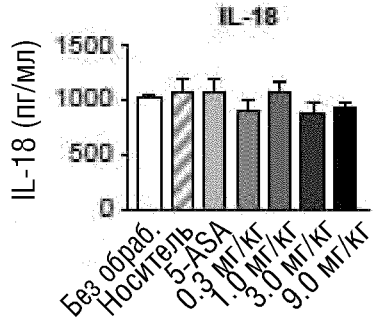
ФИГ.47Z



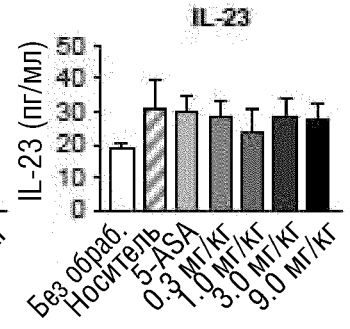
ФИГ.47AA



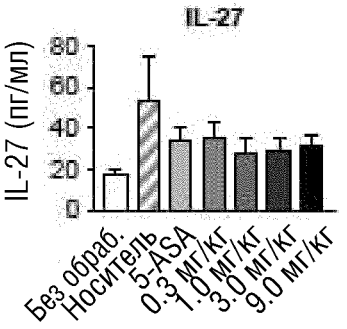
ФИГ.47BB



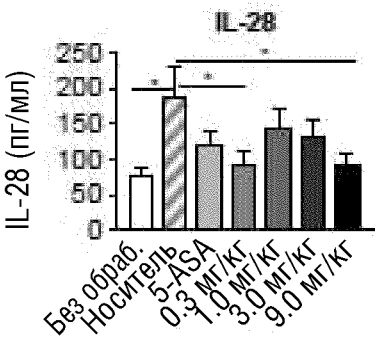
ФИГ.47CC



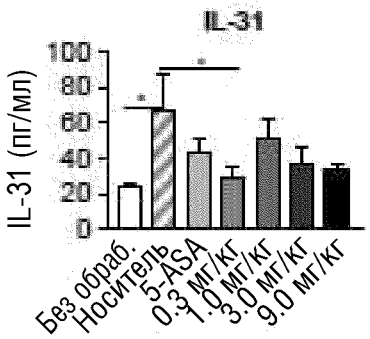
ФИГ.47DD



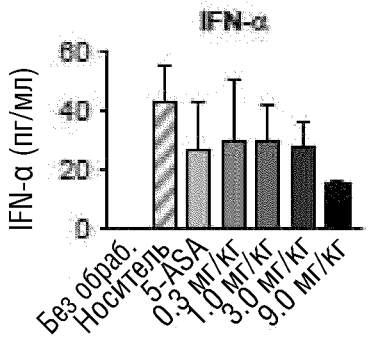
ФИГ.47EE



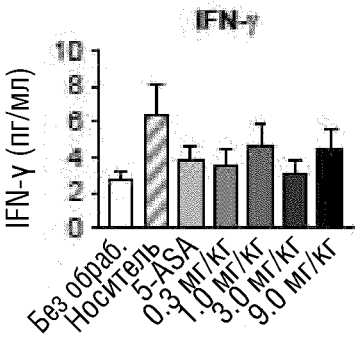
ФИГ.47FF



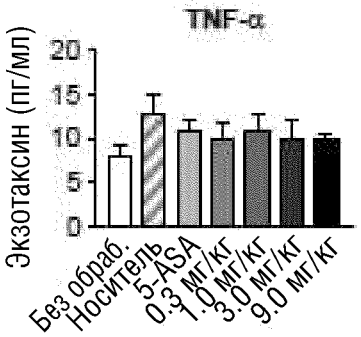
ФИГ.47GG



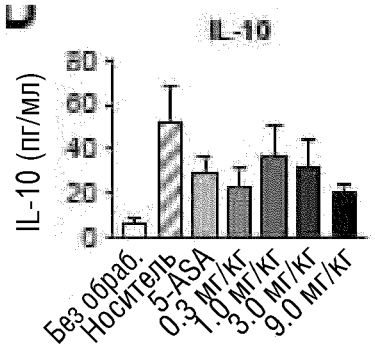
ФИГ.47HH



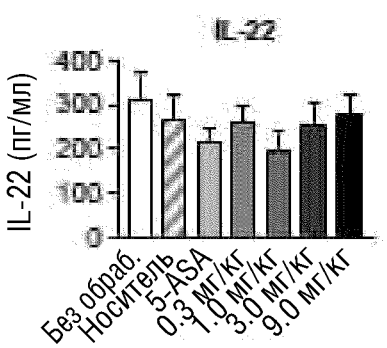
ФИГ.47II



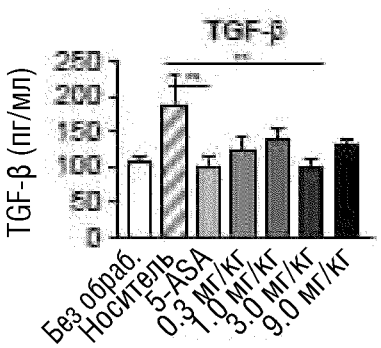
ФИГ.47JJ



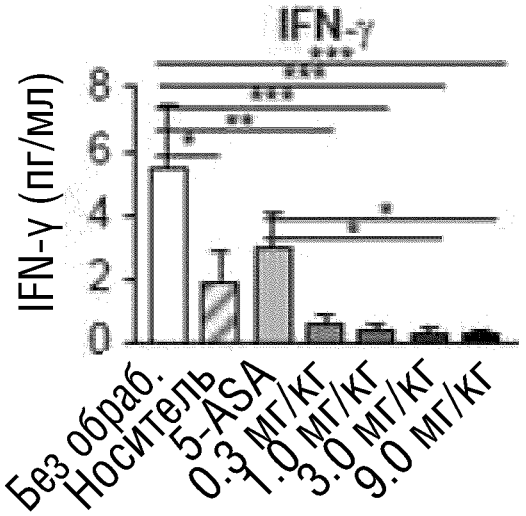
ФИГ.47KK



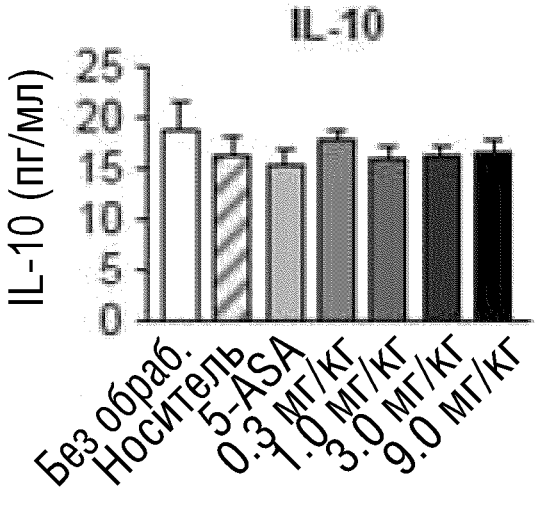
ФИГ.47LL



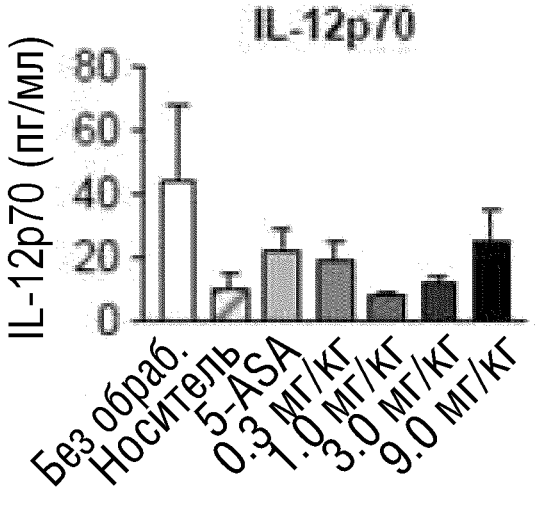
ФИГ.48A



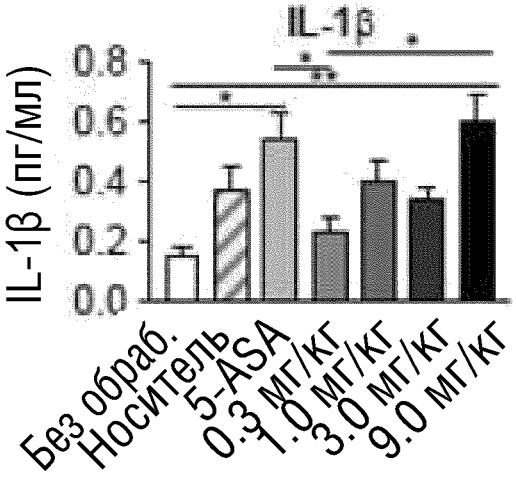
ФИГ.48B



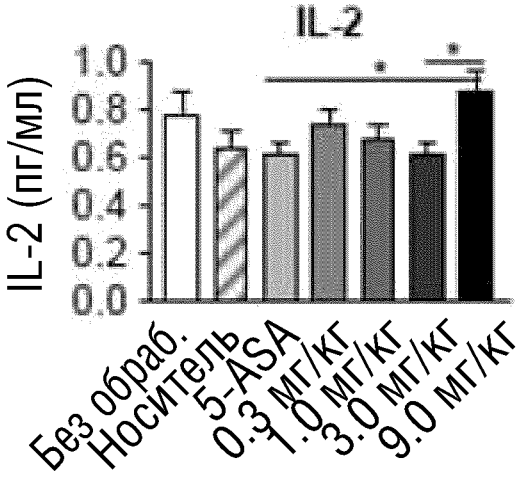
ФИГ.48C



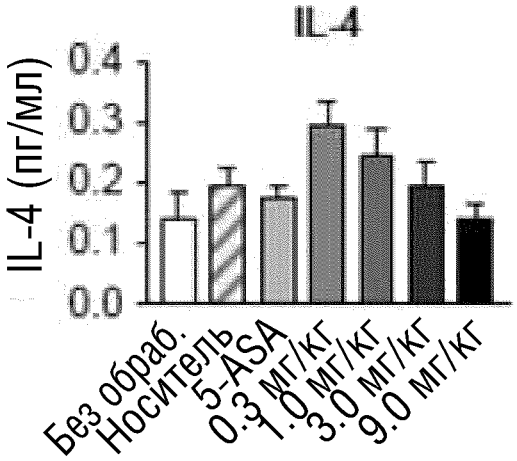
ФИГ.48D



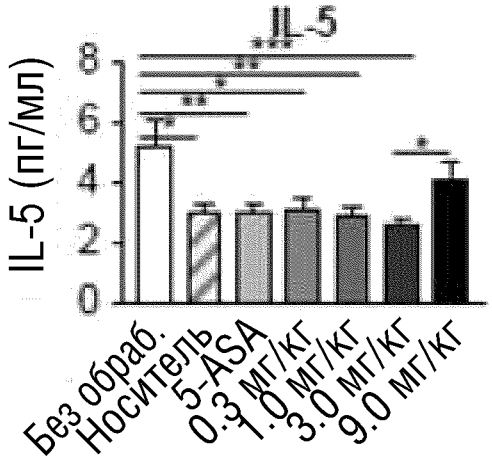
ФИГ.48E



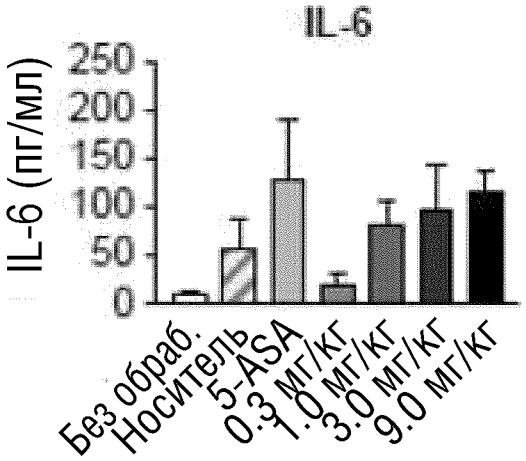
ФИГ.48F



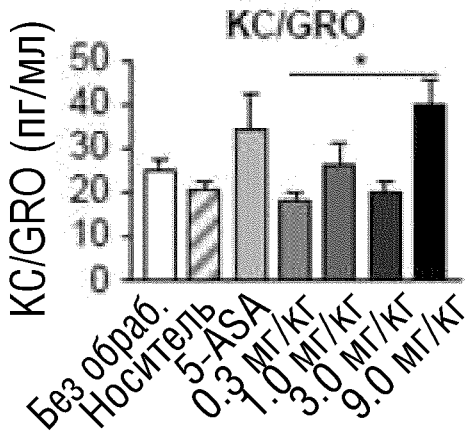
ФИГ.48G



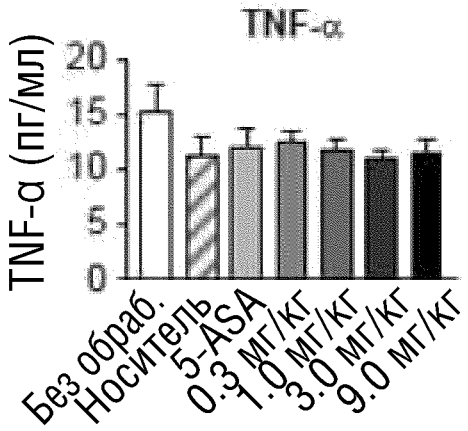
ФИГ.48H



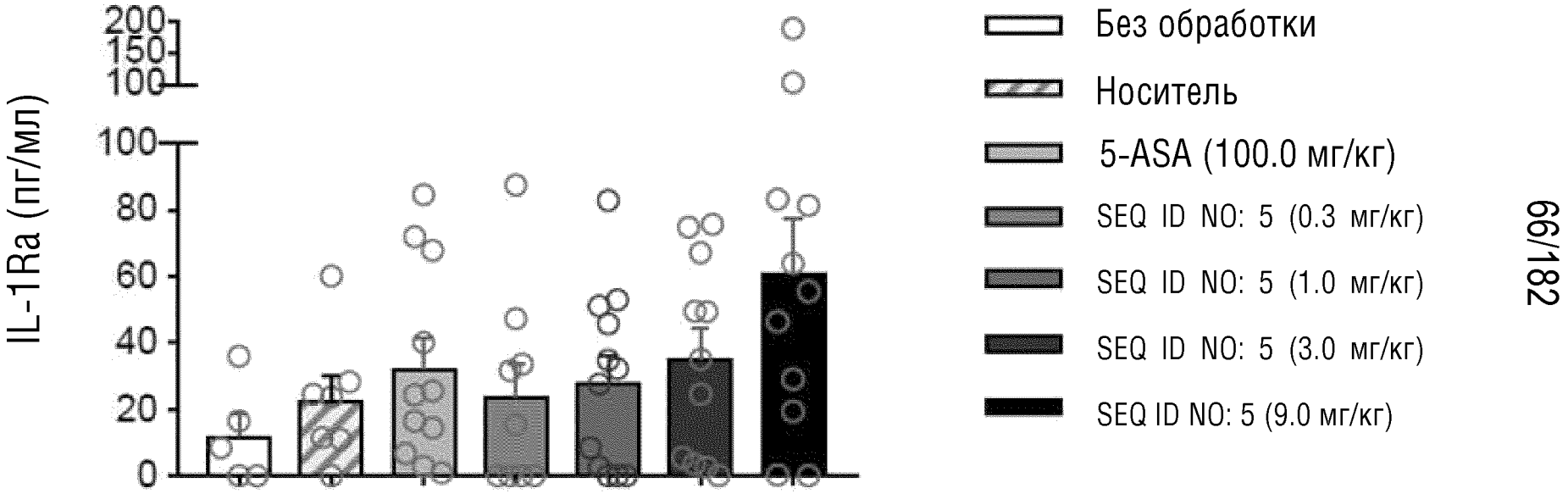
ФИГ.48I



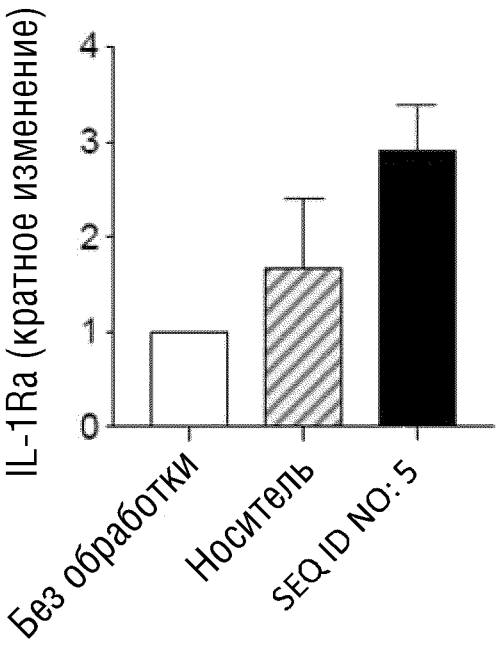
ФИГ.48J



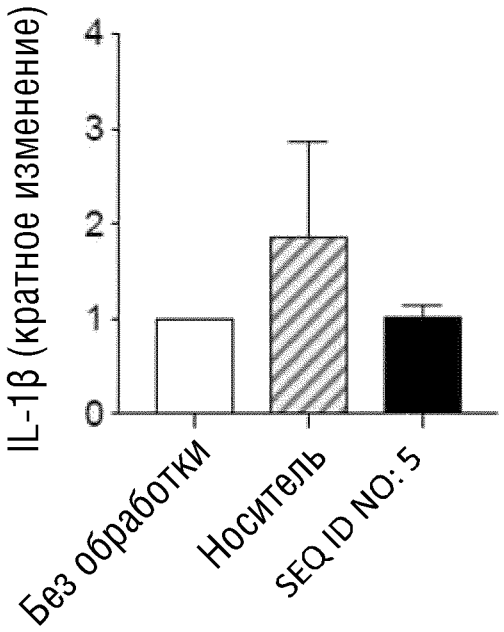
ФИГ.49А


IL-1Ra (пг/мл)
200
150
100
100
80
60
40
20
0
Без обработки
Носитель
5-ASA (100.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (1.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (9.0 мг/кг)

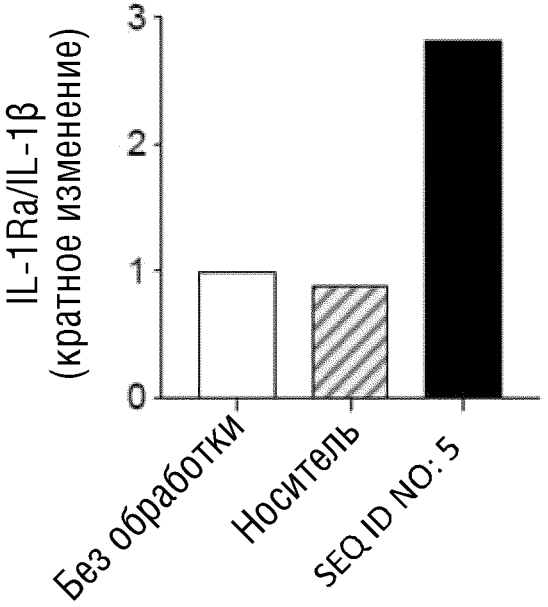
ФИГ.49B



ФИГ.49C



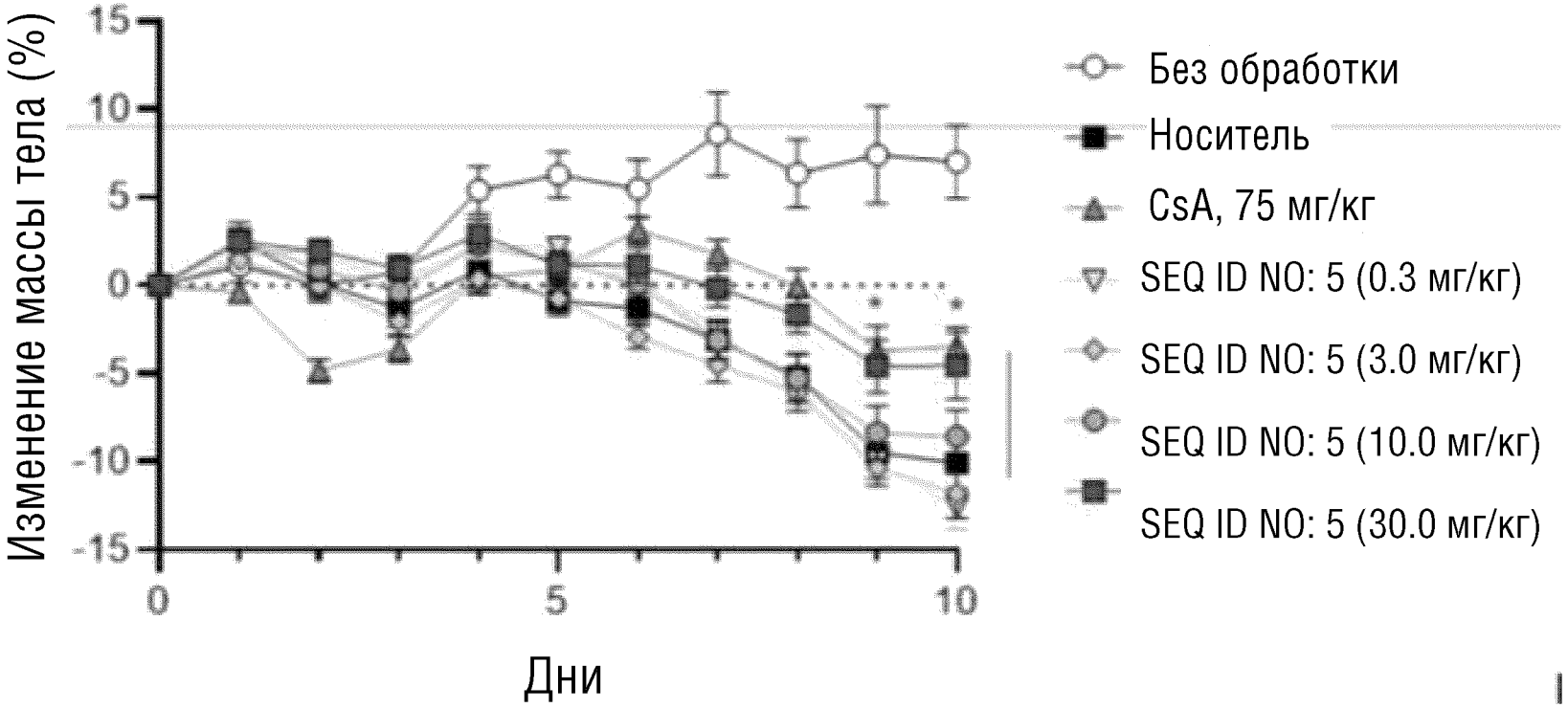
ФИГ.49D



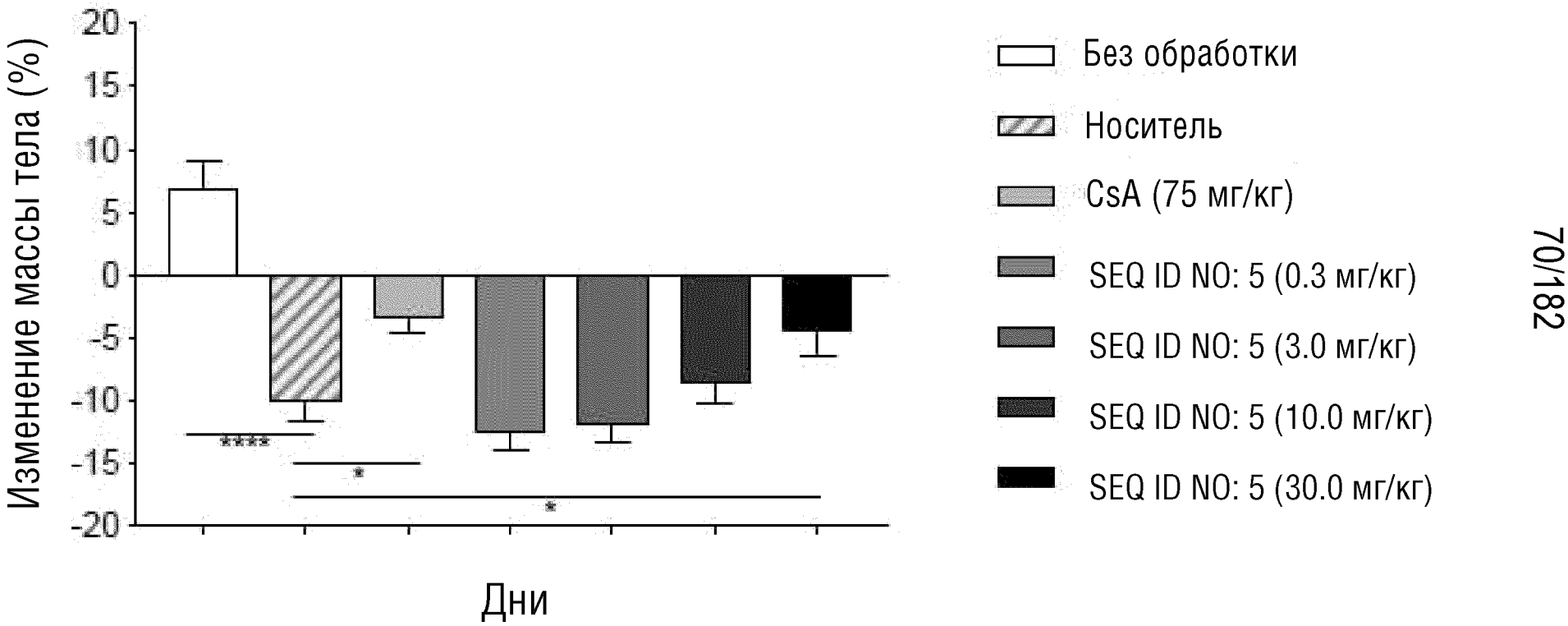
ФИГ.50А


4 день
адаптация
Режим лечения: SEQ ID NO: 5 пероральный зонд (День 0-10)
Завершение
с последующим
анализом ex vivo
День
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
2.5 % DSS
Вода

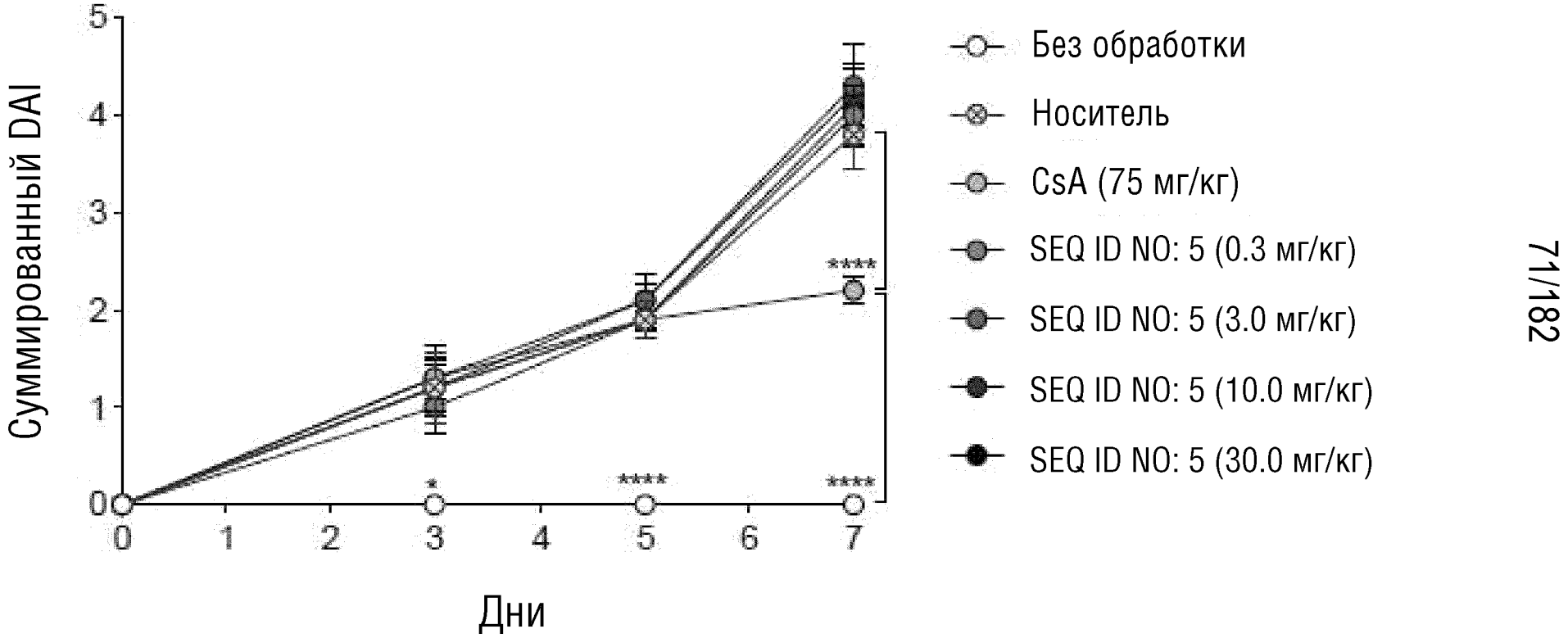
ФИГ.50В


Изменение массы тела (%)
15
10
5
0
-5
-10
-15
0
5
10
Дни
Без обработки
Носитель
CsA, 75 мг/кг
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30.0 мг/кг)

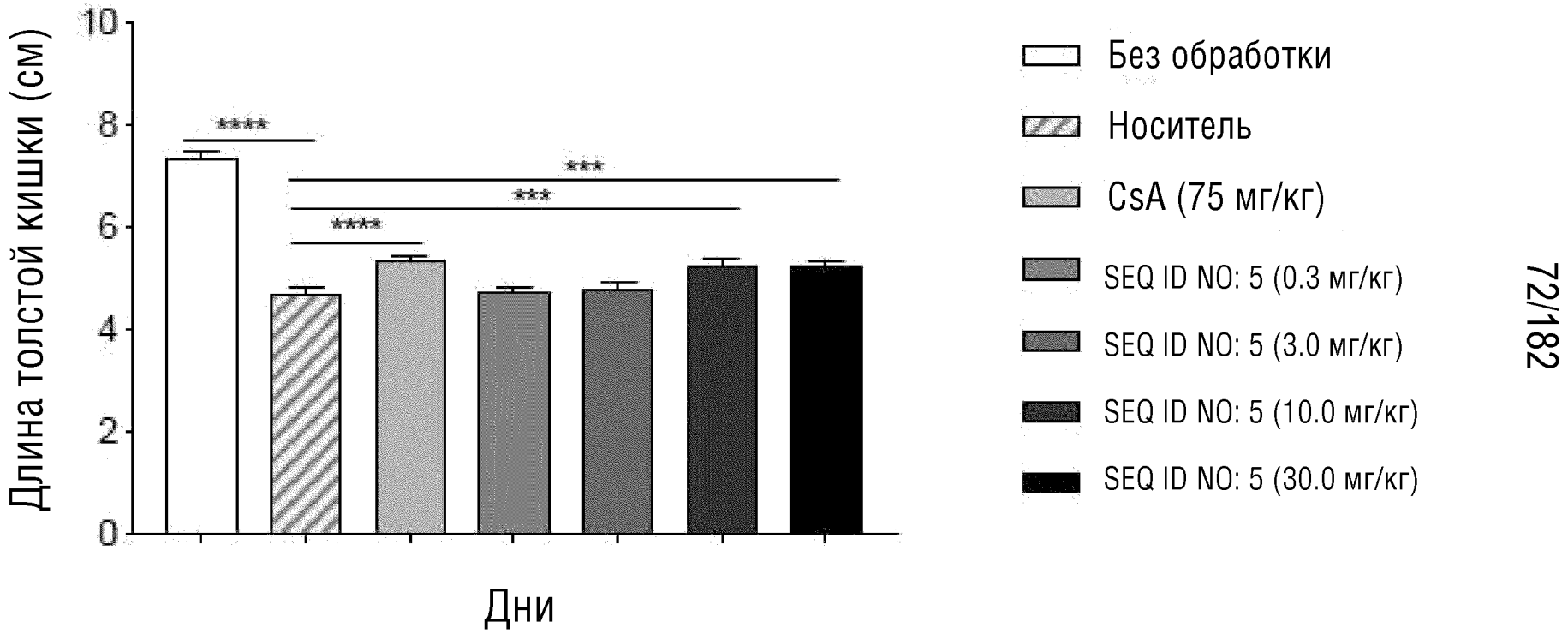
ФИГ.50C

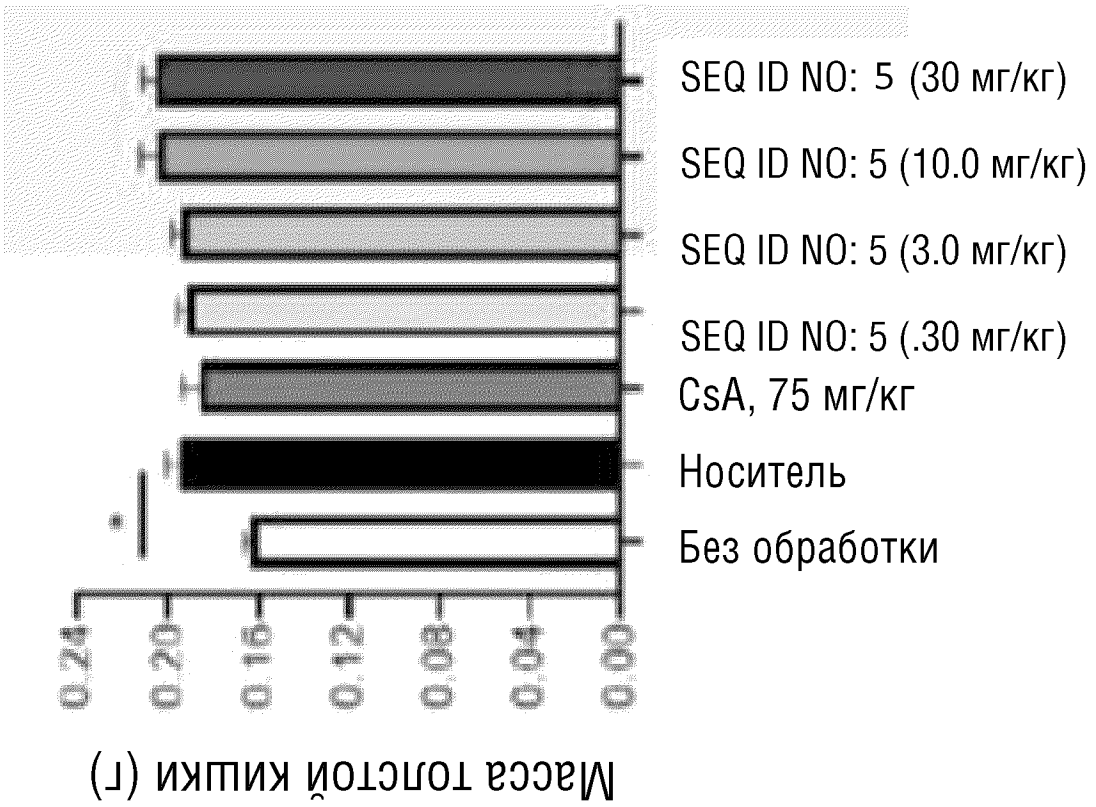

Изменение массы тела (%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
****
*
*
Дни
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30.0 мг/кг)

ФИГ.51


Суммированный DAI
5
4
3
2
1
0
0
1
2
3
4
5
6
7
Дни
*
****
****
****
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30.0 мг/кг)

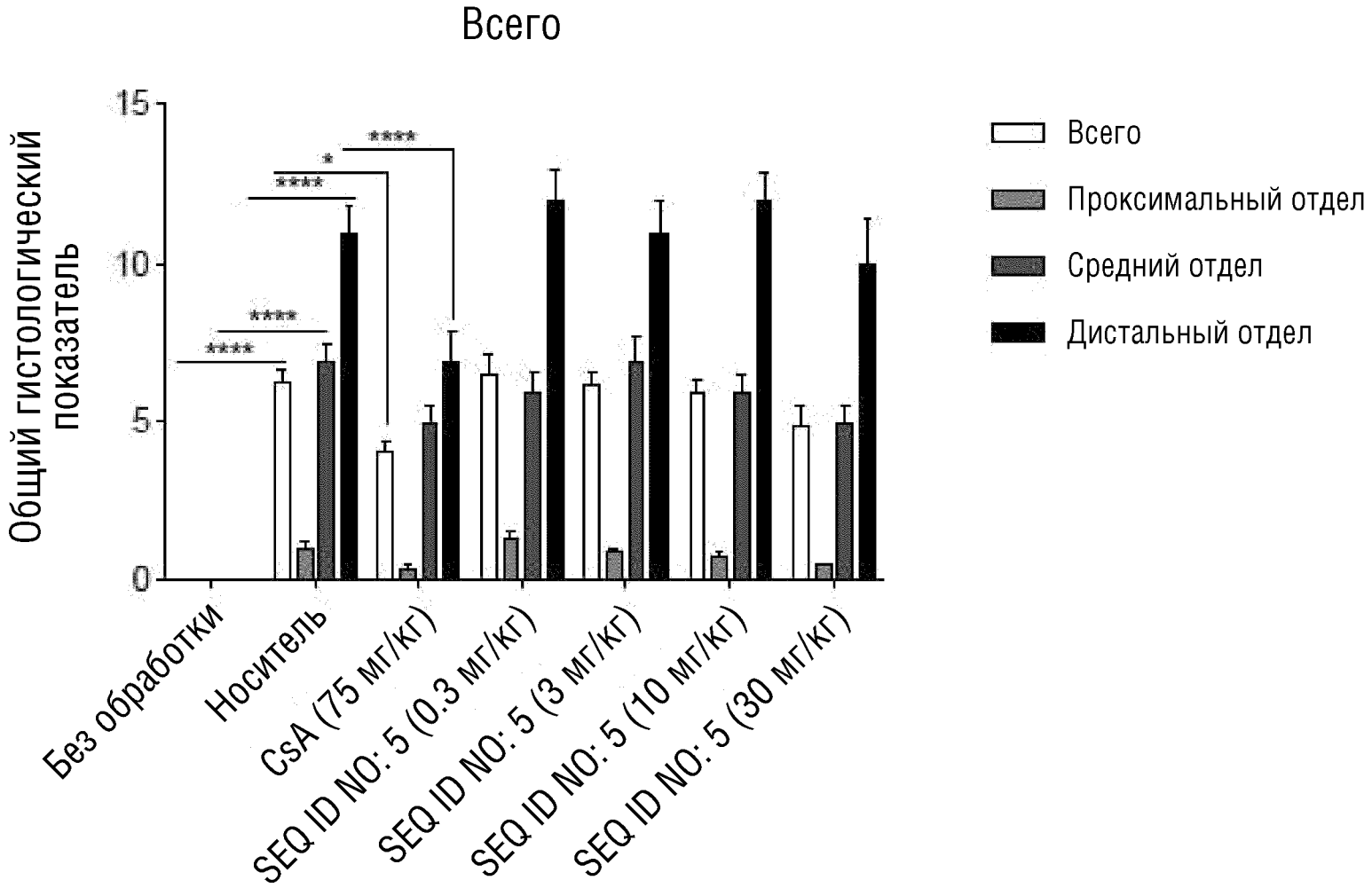
ФИГ.52А


Длина толстой кишки (см)
10
8
6
4
2
0
****
***
***
****
Дни
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30.0 мг/кг)

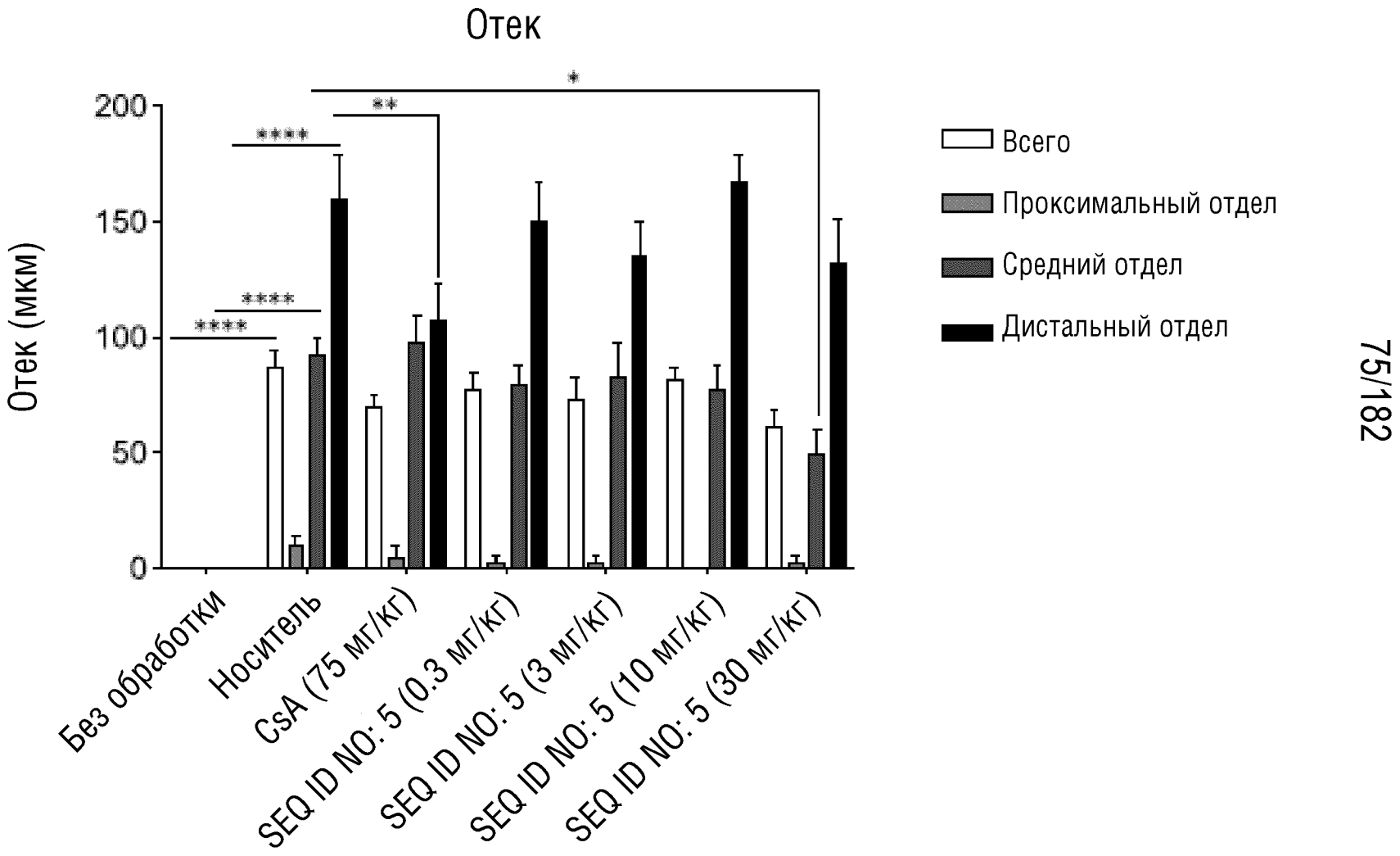

SEQ ID NO: 5 (30 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (.30 мг/кг)
CsA, 75 мг/кг
Носитель
Без обработки
*
0.24
0.20
0.16
0.12
0.08
0.04
0.00
Масса тощей кишки (г)

ФИГ.52В

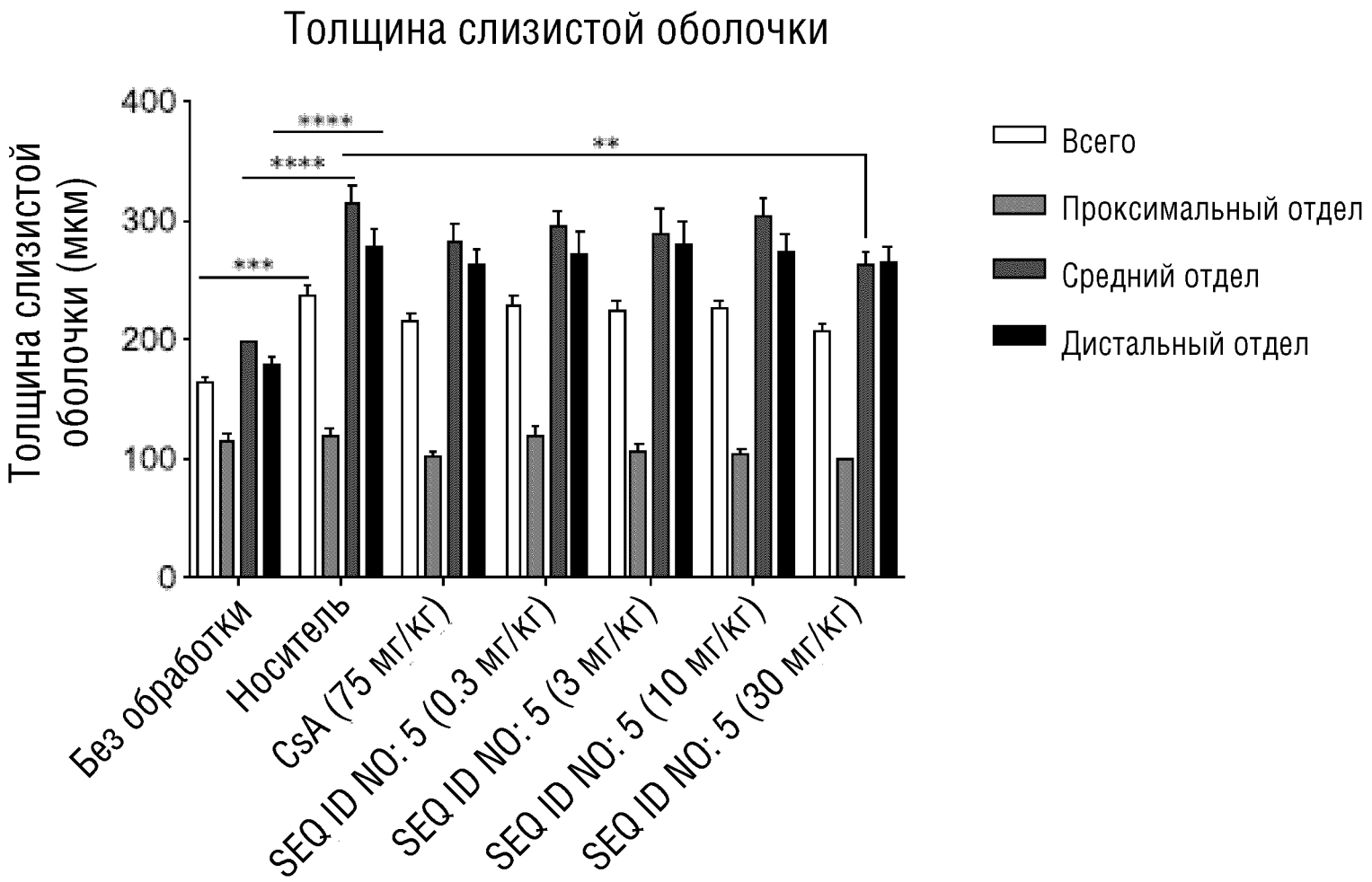
ФИГ.53


Всего
Общий гистологический показатель
15
10
5
0
****
****
****
*
Всего
Проксимальный отдел
Средний отдел
Дистальный отдел
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30 мг/кг)

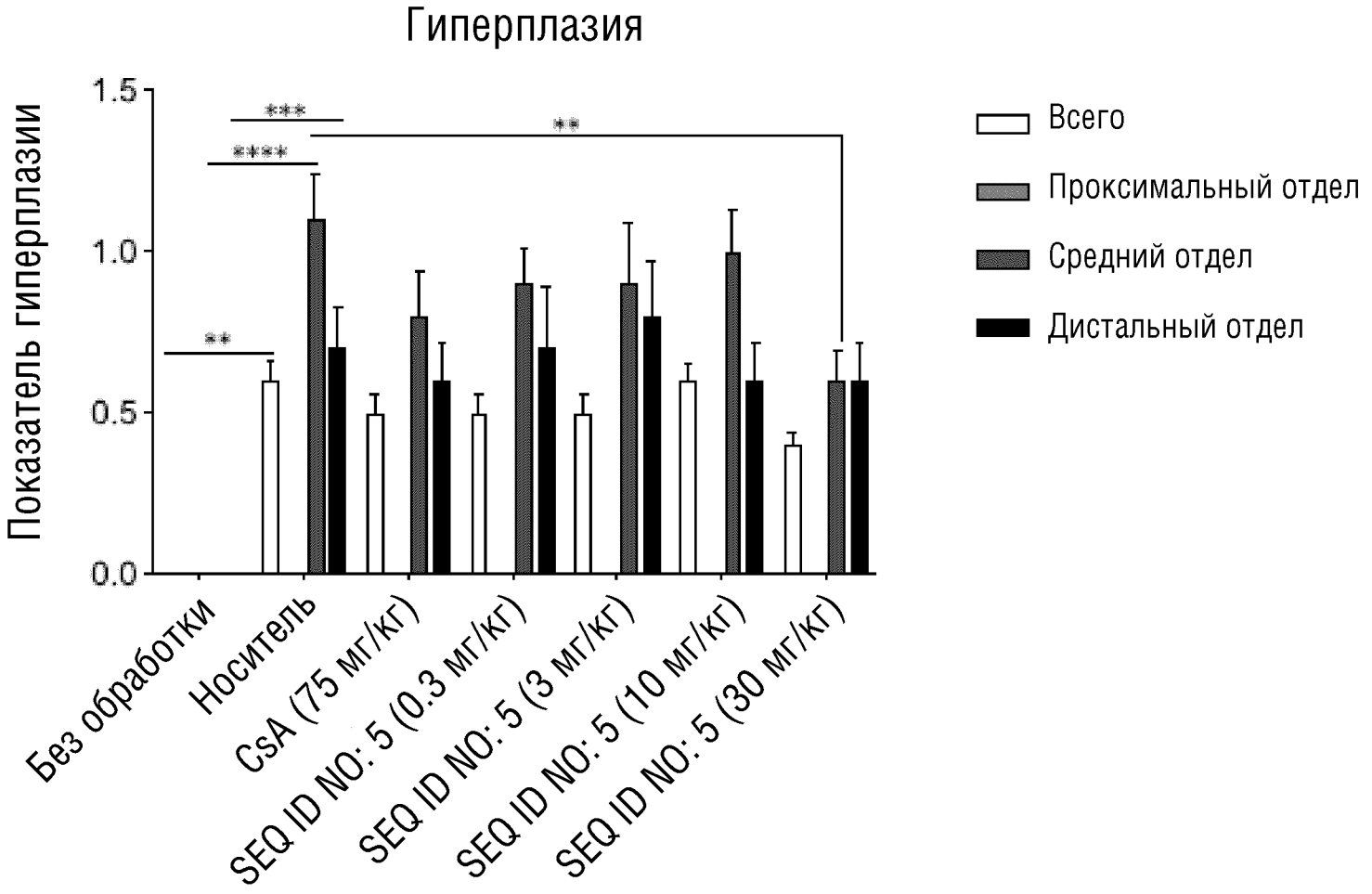
ФИГ.54


Отек
Отек (мкм)
200
150
100
50
0
****
****
****
**
*
Всего
Проксимальный отдел
Средний отдел
Дистальный отдел
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30 мг/кг)

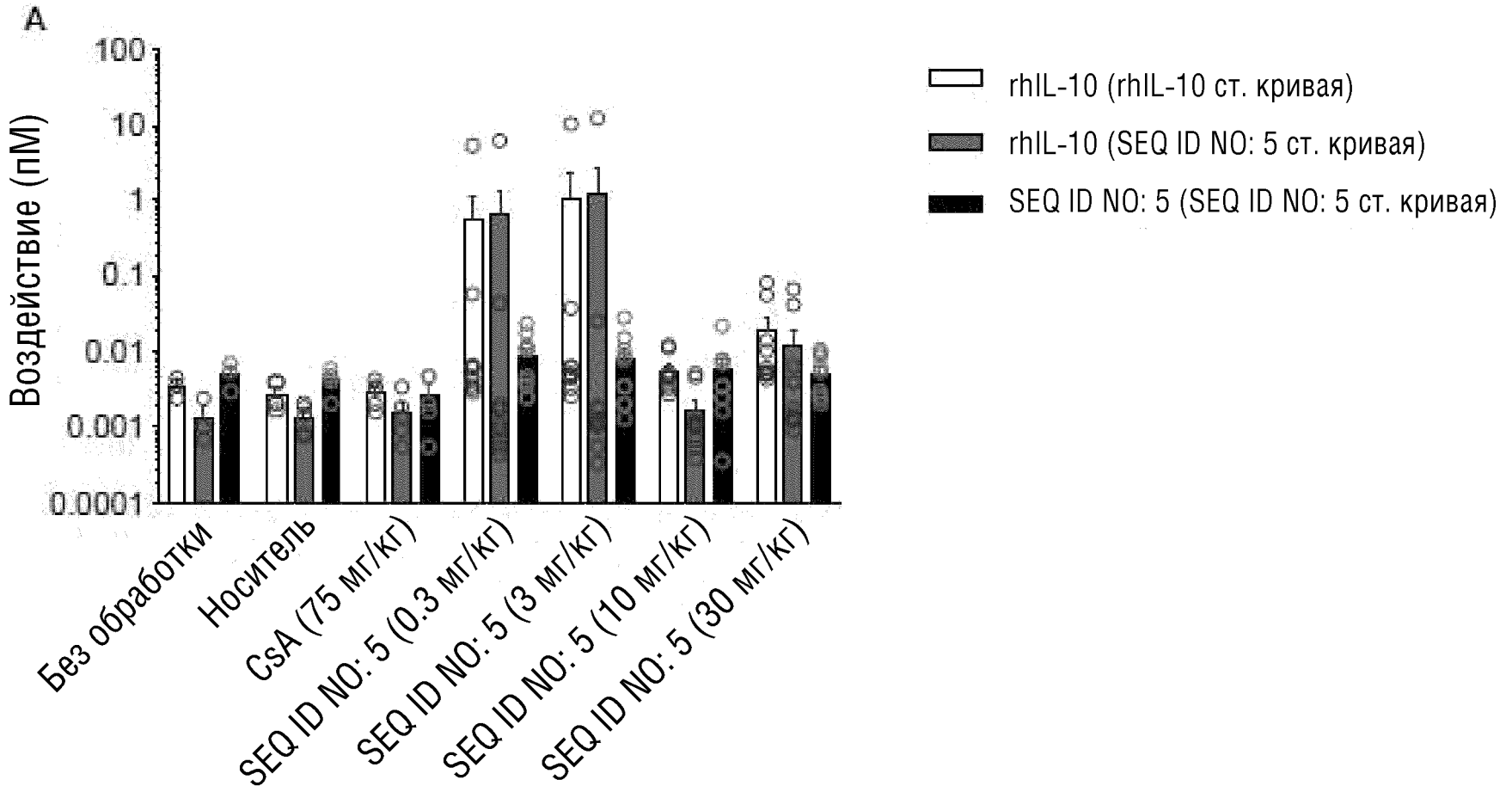
ФИГ.55


Толщина слизистой оболочки
Толщина слизистой оболочки (мкм)
400
300
200
100
0
****
****
**
***
Всего
Проксимальный отдел
Средний отдел
Дистальный отдел
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30 мг/кг)

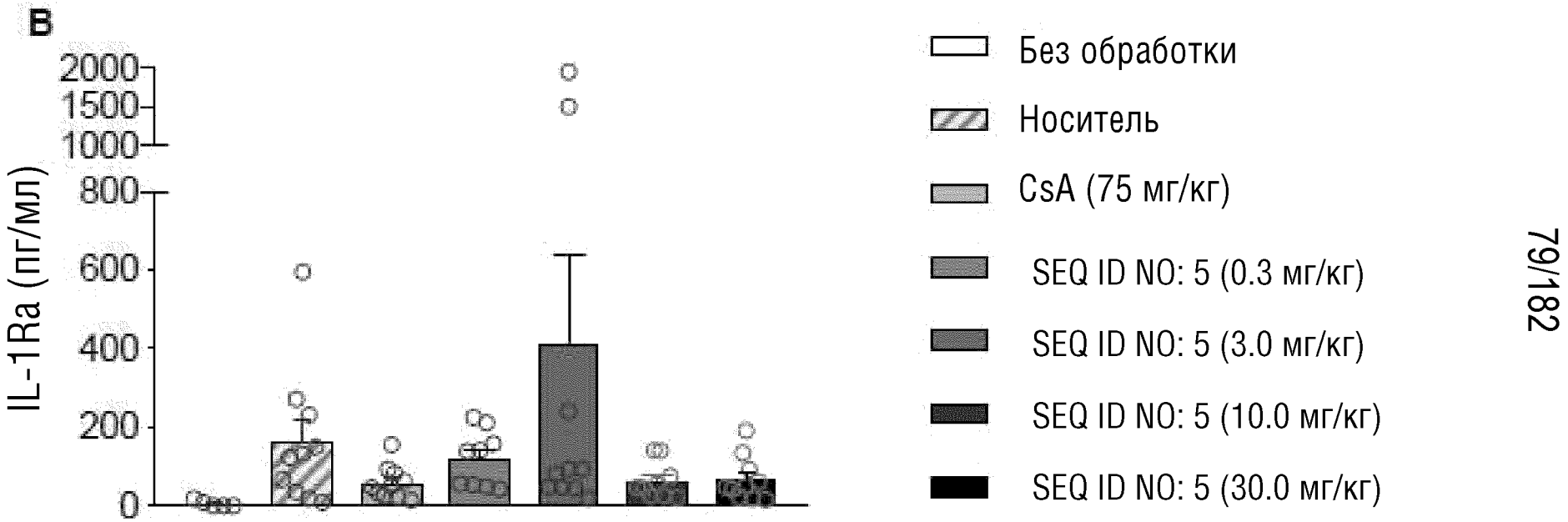
ФИГ.56


Гиперплазия
Показатель гиперплазии
1.5
1.0
0.5
0.0
***
****
**
**
Всего
Проксимальный отдел
Средний отдел
Дистальный отдел
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30 мг/кг)

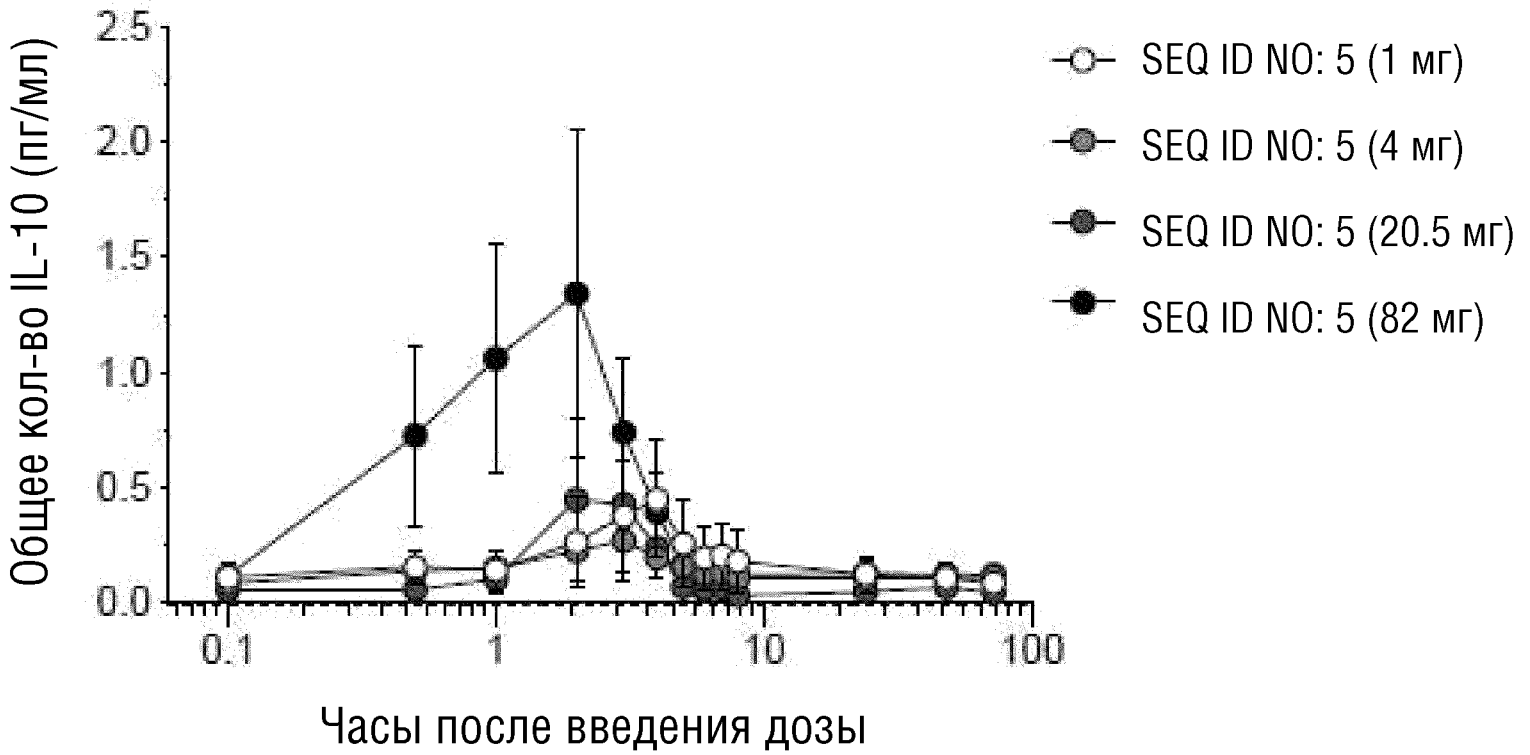
ФИГ.57А


A
Воздействие (пМ)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30 мг/кг)
rhIL-10 (rhIL-10 ст. кривая)
rhIL-10 (SEQ ID NO: 5 ст. кривая)
SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO: 5 ст. кривая)

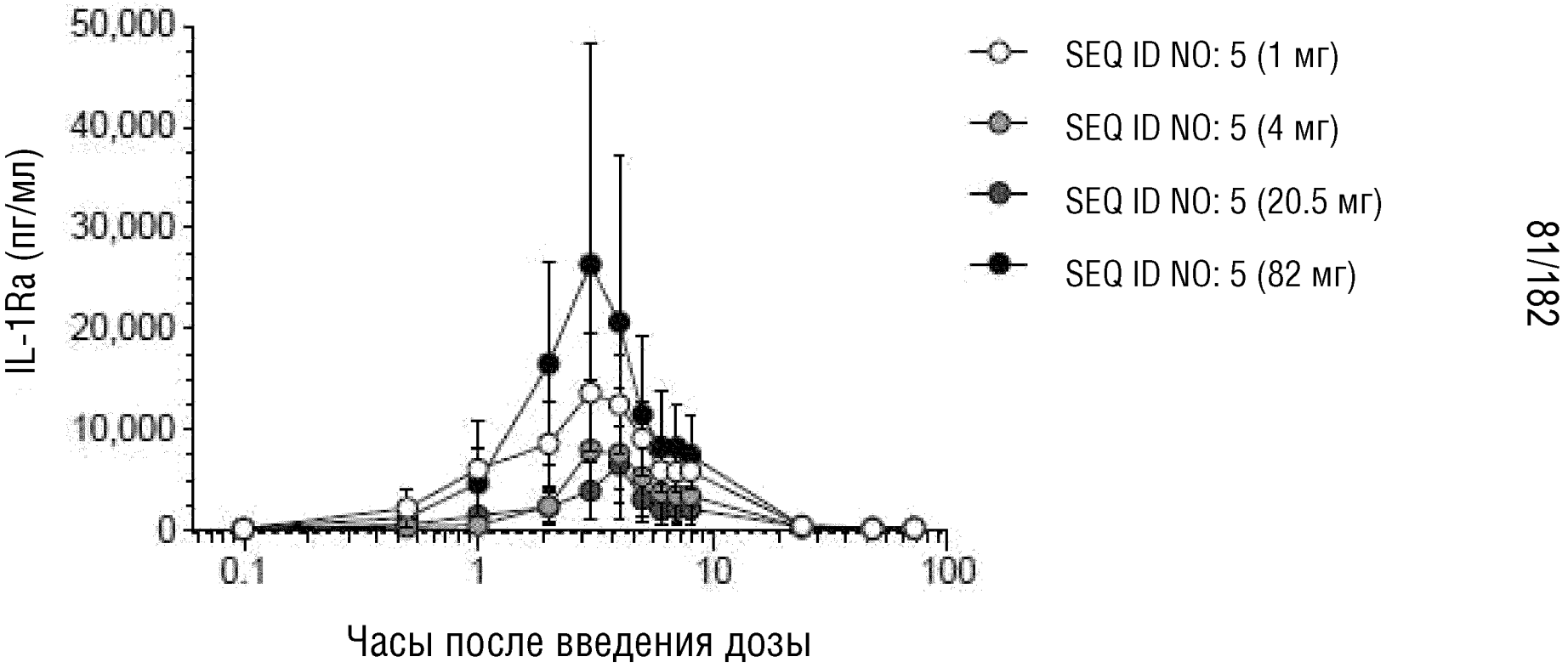
ФИГ.57B


B
IL-1Ra (пг/мл)
2000
1500
1000
800
600
400
200
0
Без обработки
Носитель
CsA (75 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (0.3 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (3.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (10.0 мг/кг)
SEQ ID NO: 5 (30.0 мг/кг)

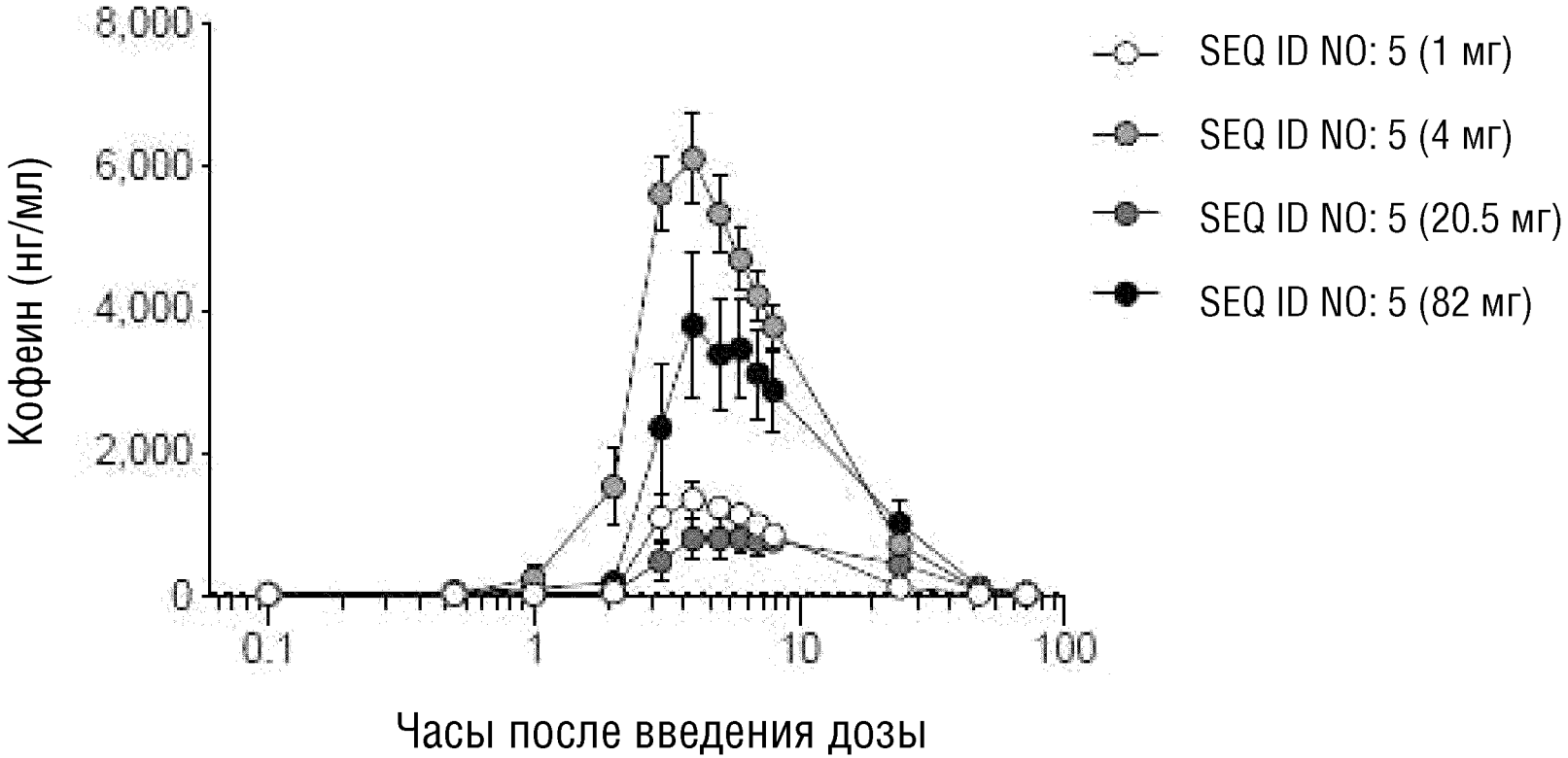
ФИГ.58


Общее кол-во IL-10 (пг/мл)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
Часы после введения дозы
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (4 мг)
SEQ ID NO: 5 (20.5 мг)
SEQ ID NO: 5 (82 мг)

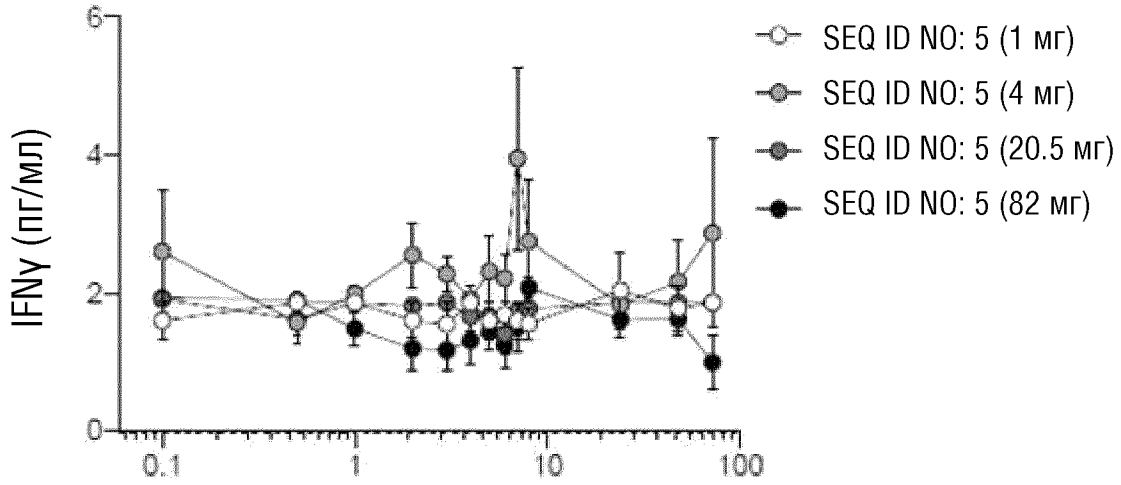
ФИГ.59


50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
IL-1Ra (пг/мл)
0.1
1
10
100
Часы после введения дозы
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (4 мг)
SEQ ID NO: 5 (20.5 мг)
SEQ ID NO: 5 (82 мг)

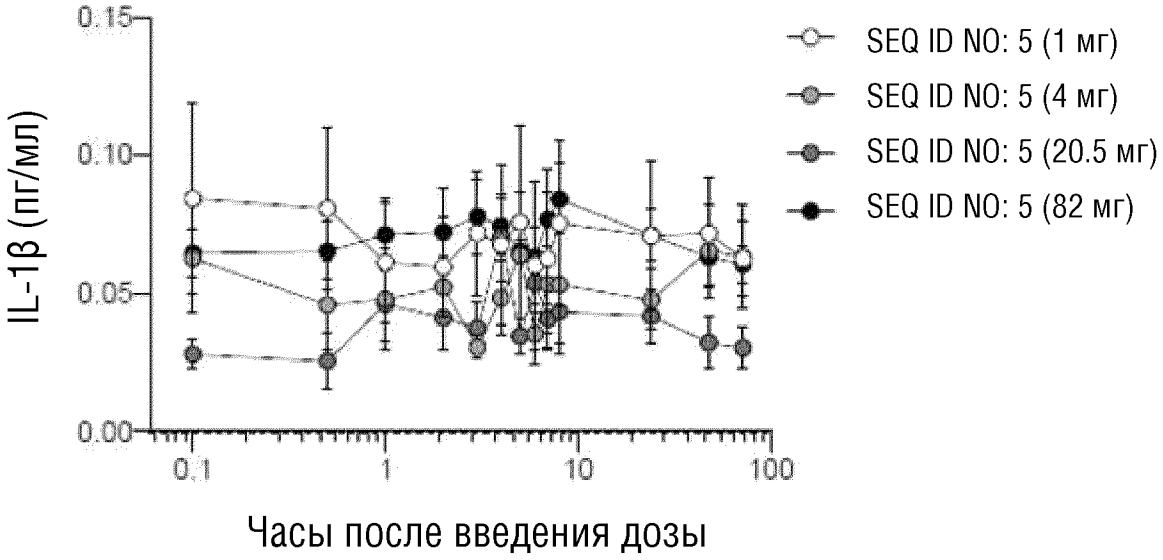
ФИГ.60


8,000
6,000
4,000
2,000
0
Кофеин (нг/мл)
0.1
1
10
100
Часы после введения дозы
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (4 мг)
SEQ ID NO: 5 (20.5 мг)
SEQ ID NO: 5 (82 мг)

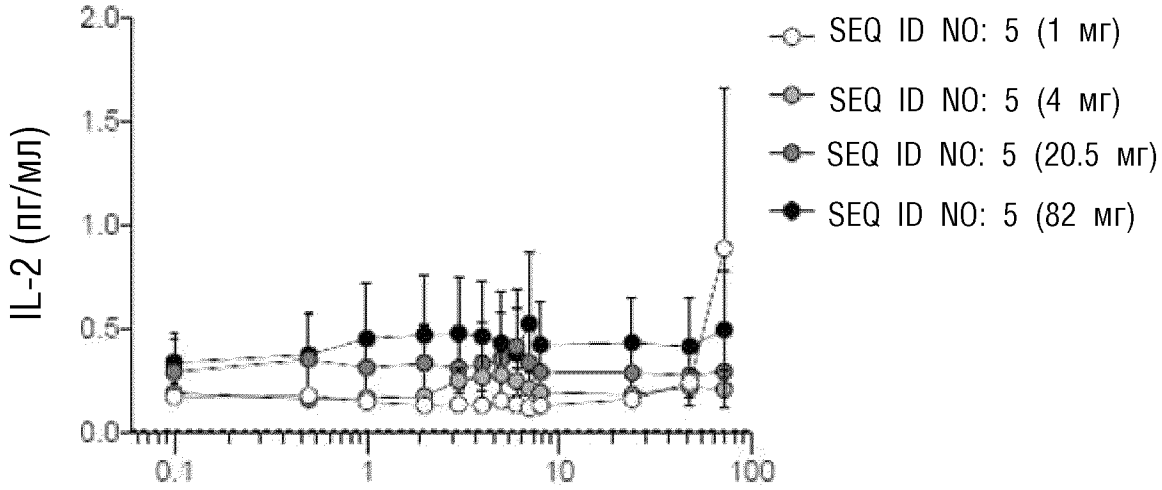
ФИГ.61A



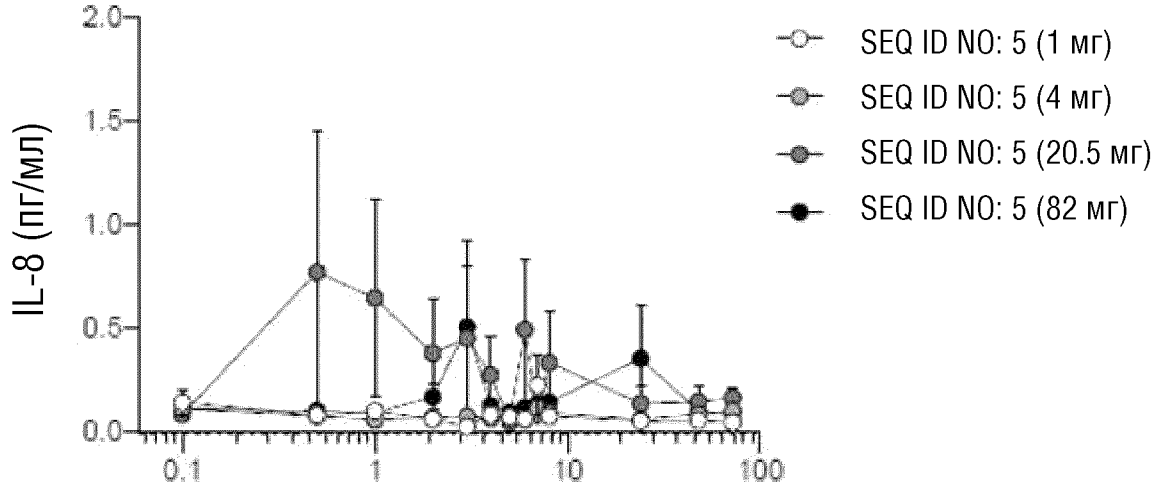
ФИГ.61B



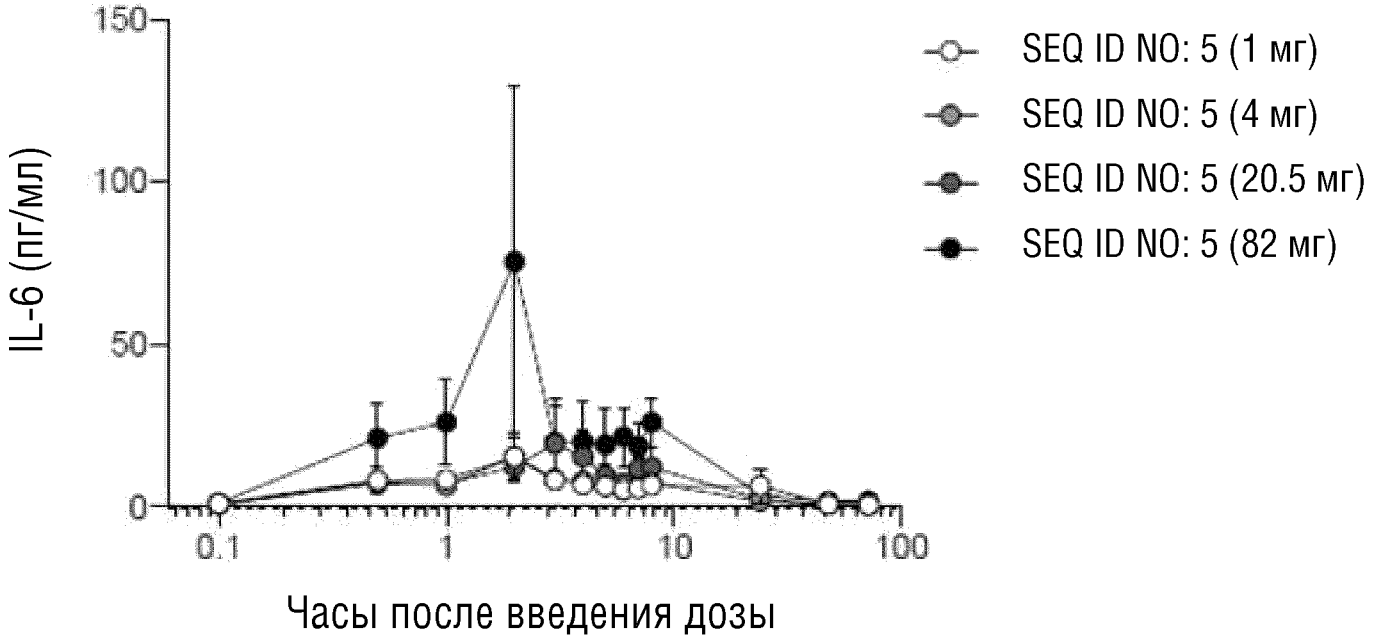
ФИГ.61C



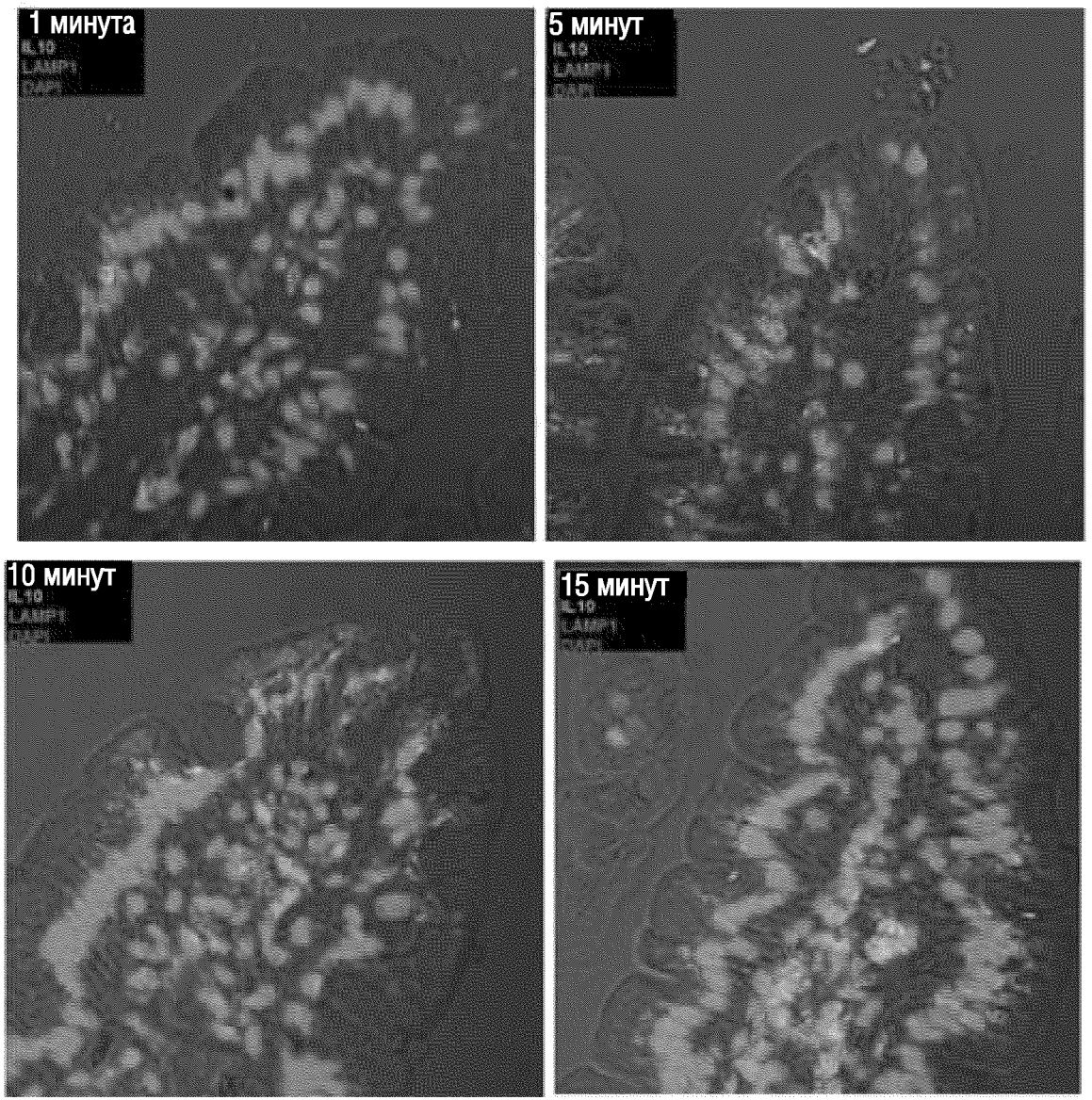
ФИГ.61D



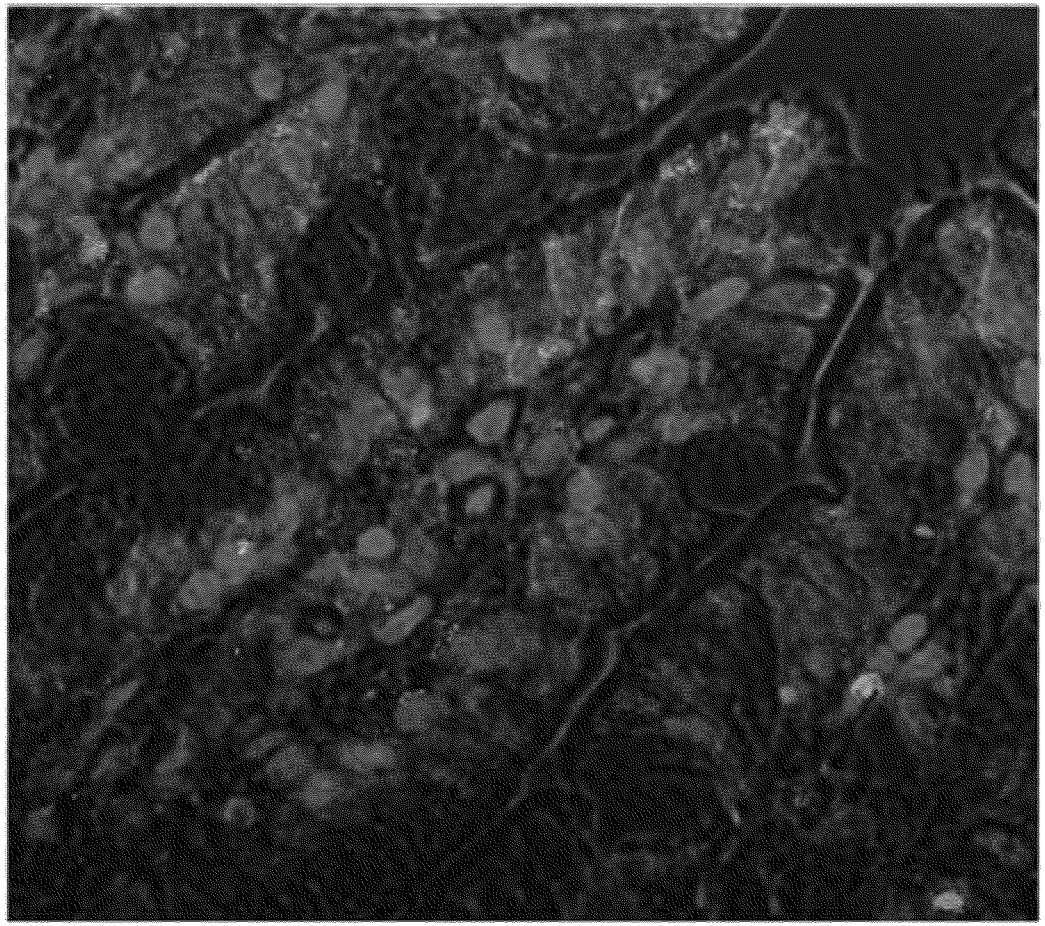
ФИГ.61E


150
100
50
0
IL-6 (пг/мл)
0.1
1
10
100
Часы после введения дозы
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (4 мг)
SEQ ID NO: 5 (20.5 мг)
SEQ ID NO: 5 (82 мг)

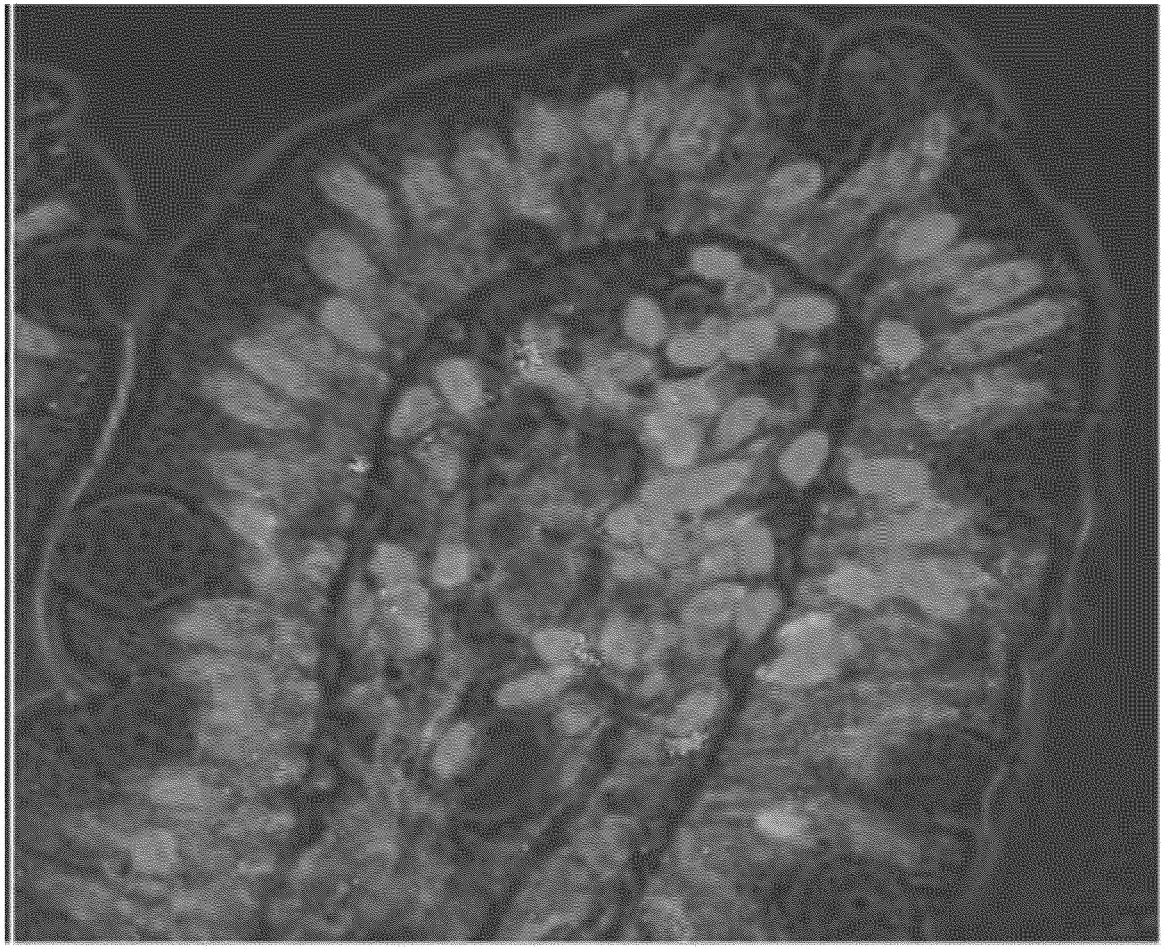
ФИГ.62



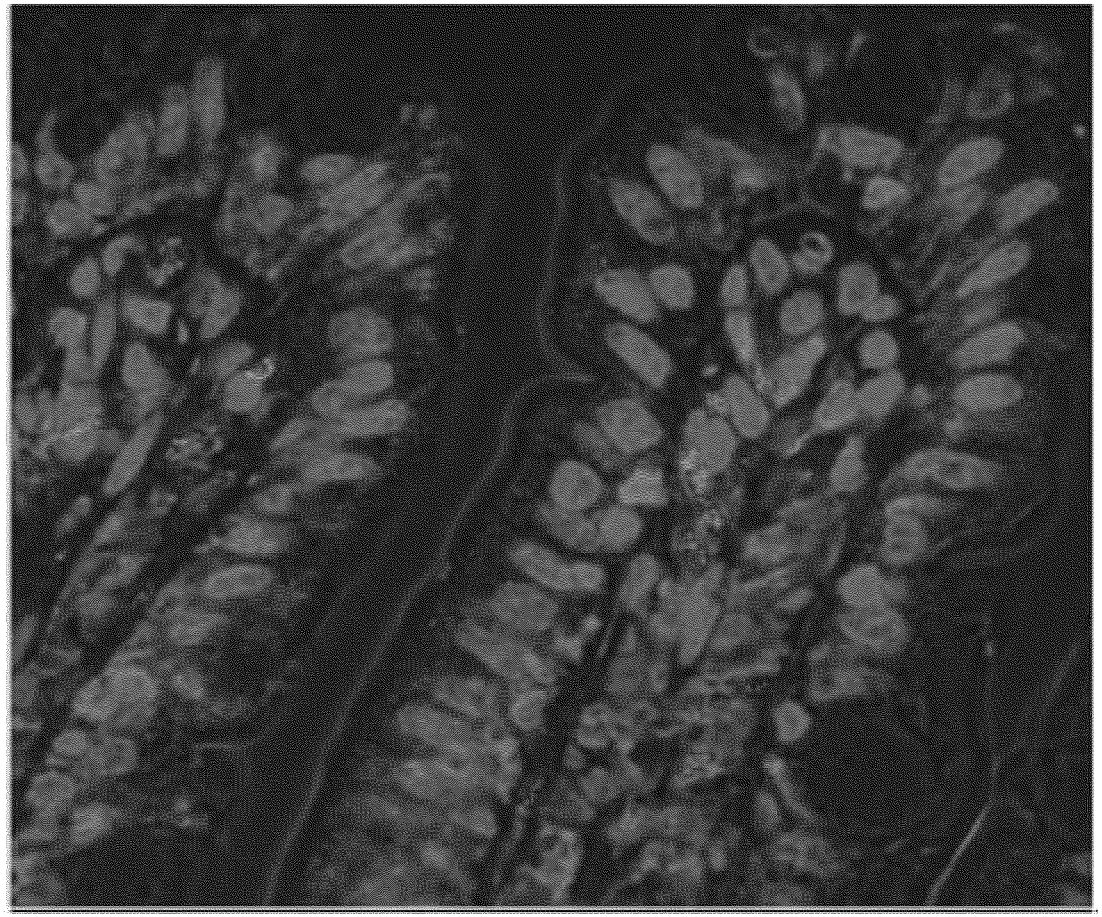
ФИГ.63



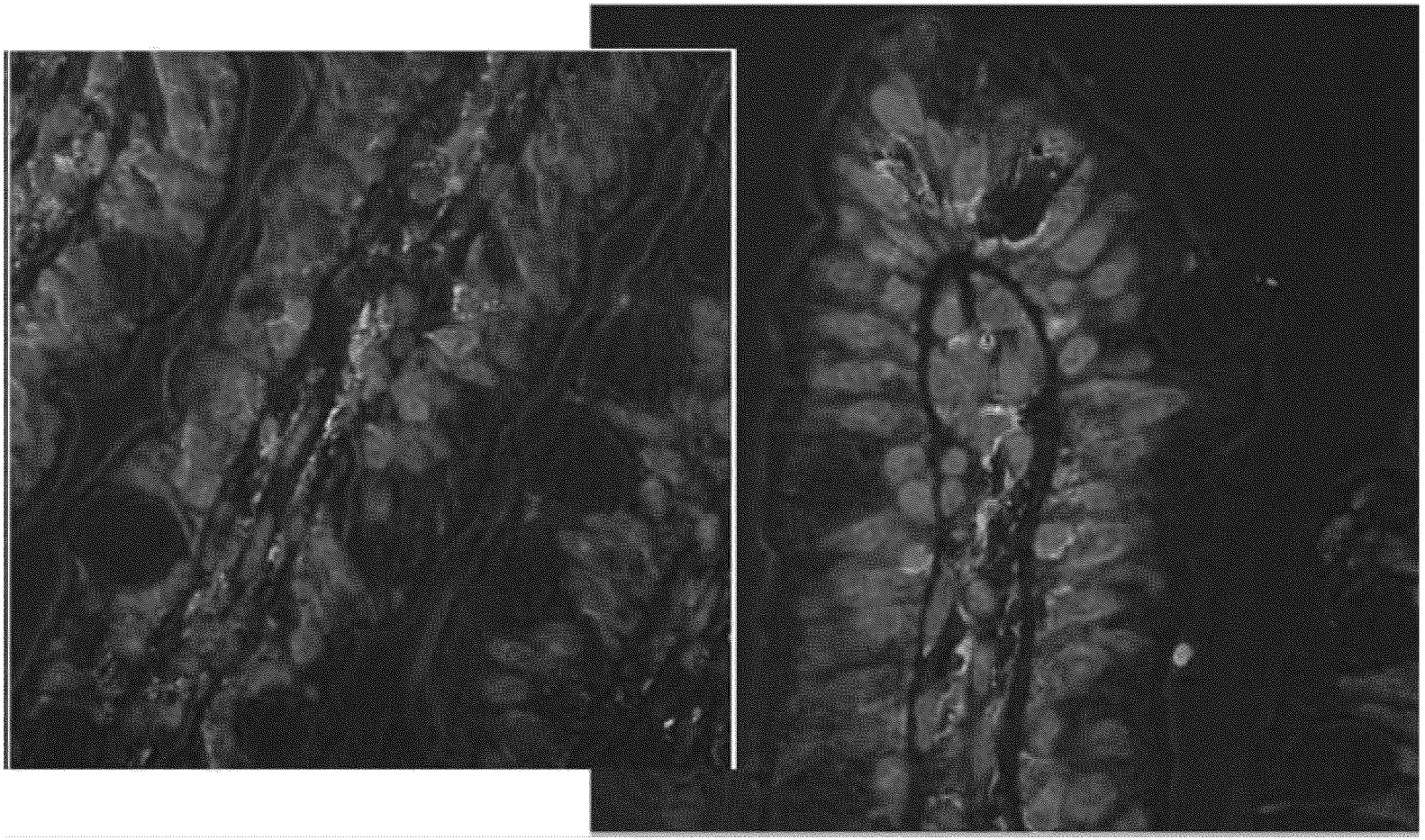
ФИГ.64



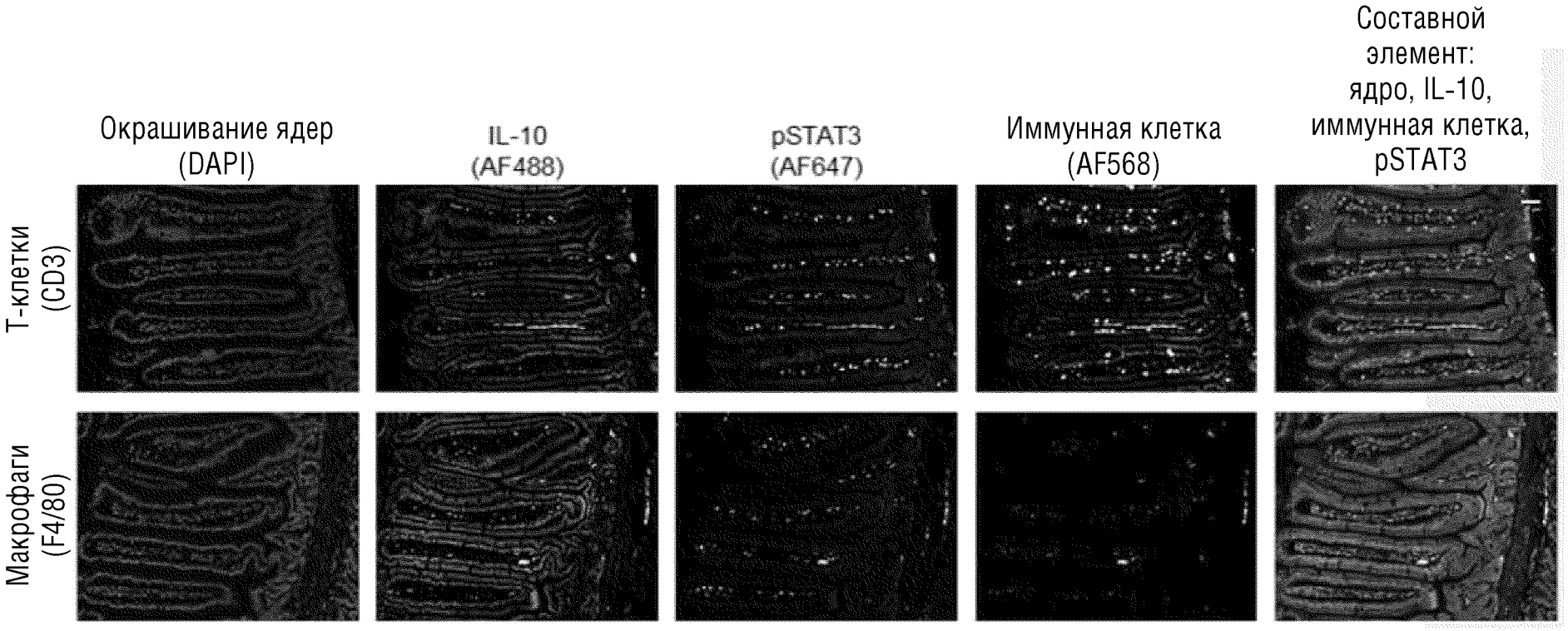
ФИГ.65



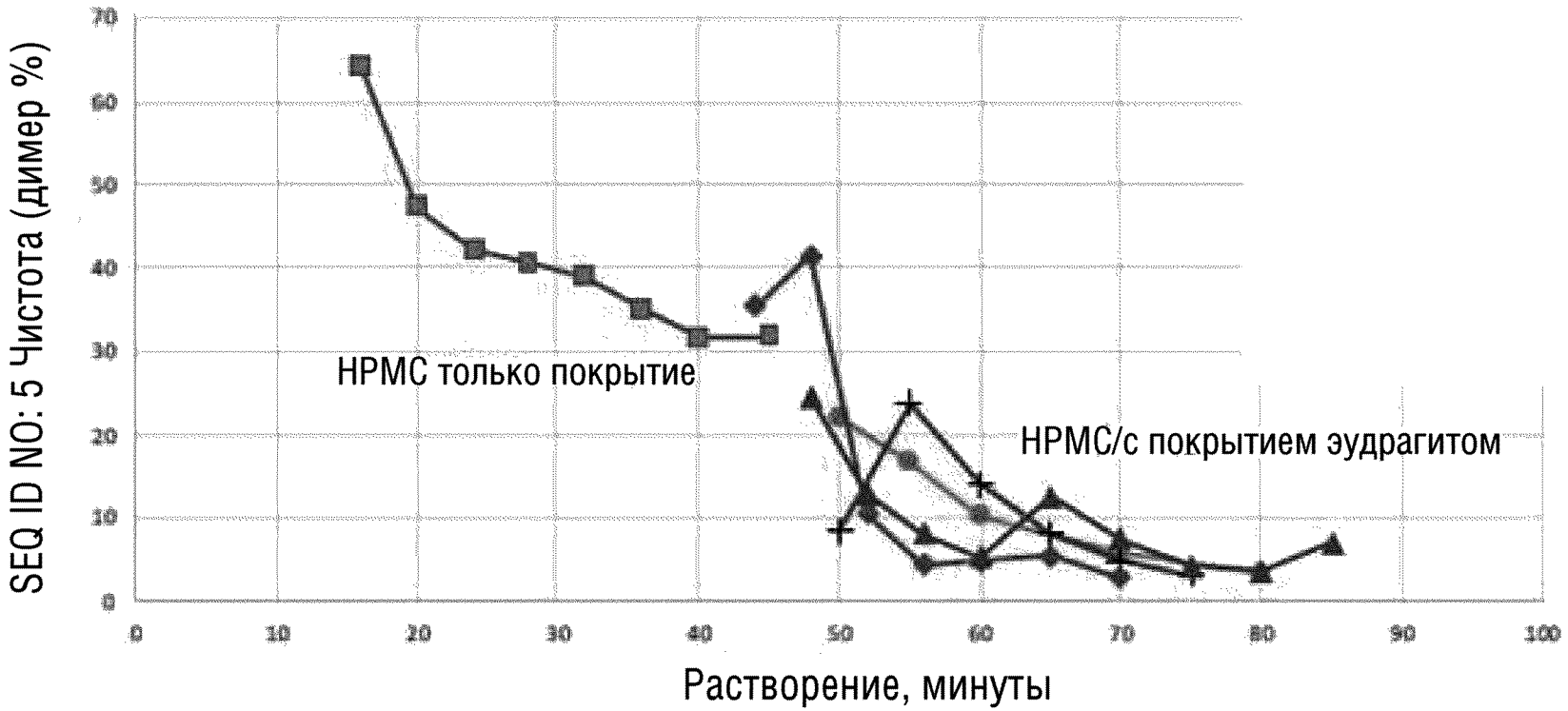
ФИГ.66



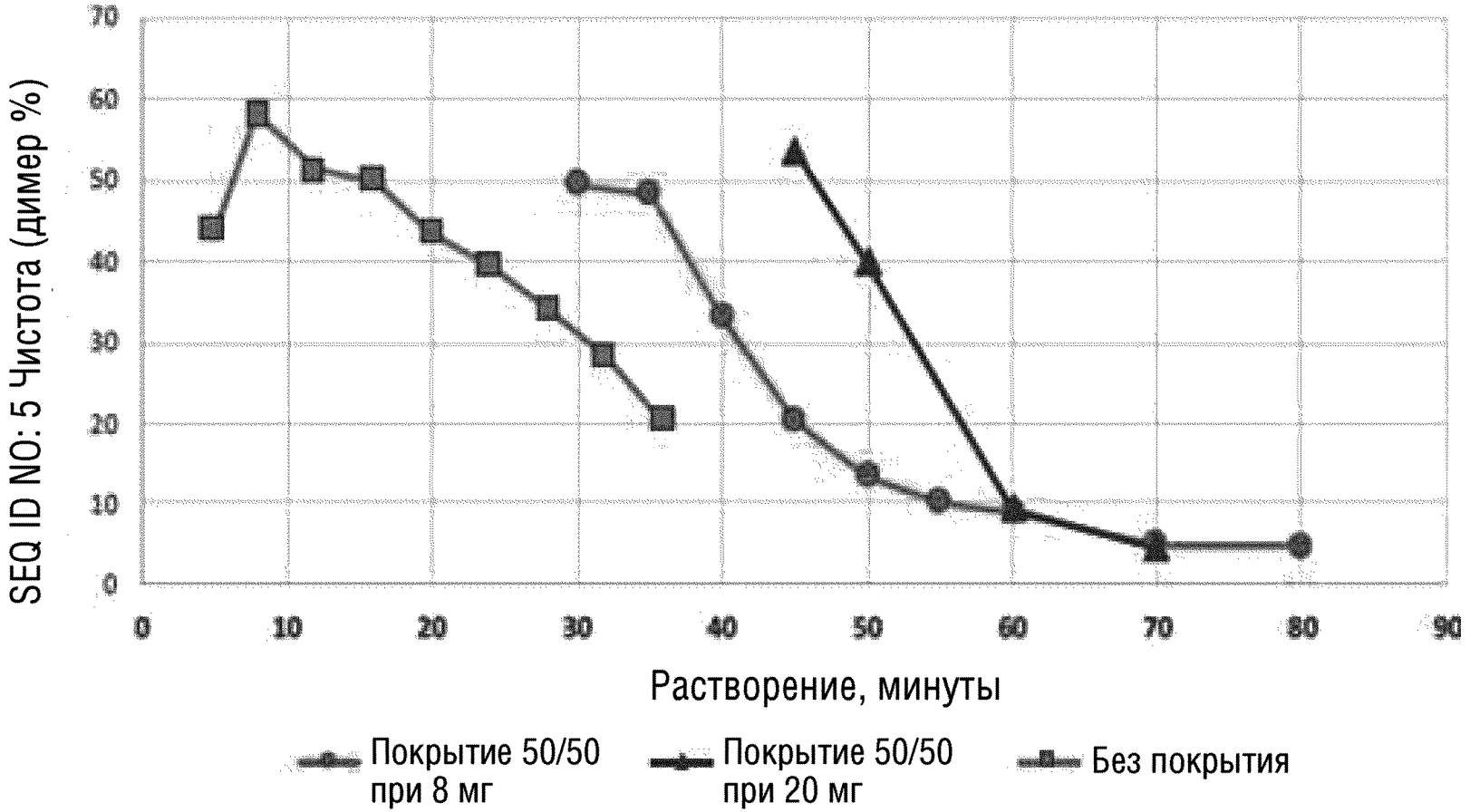
ФИГ.67


Окрашивание ядер (DAPI)
IL-10 (AF488)
pSTAT3 (AF647)
Иммунная клетка (AF568)
Составной элемент: ядро, IL-10, иммунная клетка, pSTAT3
Т-клетки (CD3)
Макрофаги (F4/80)

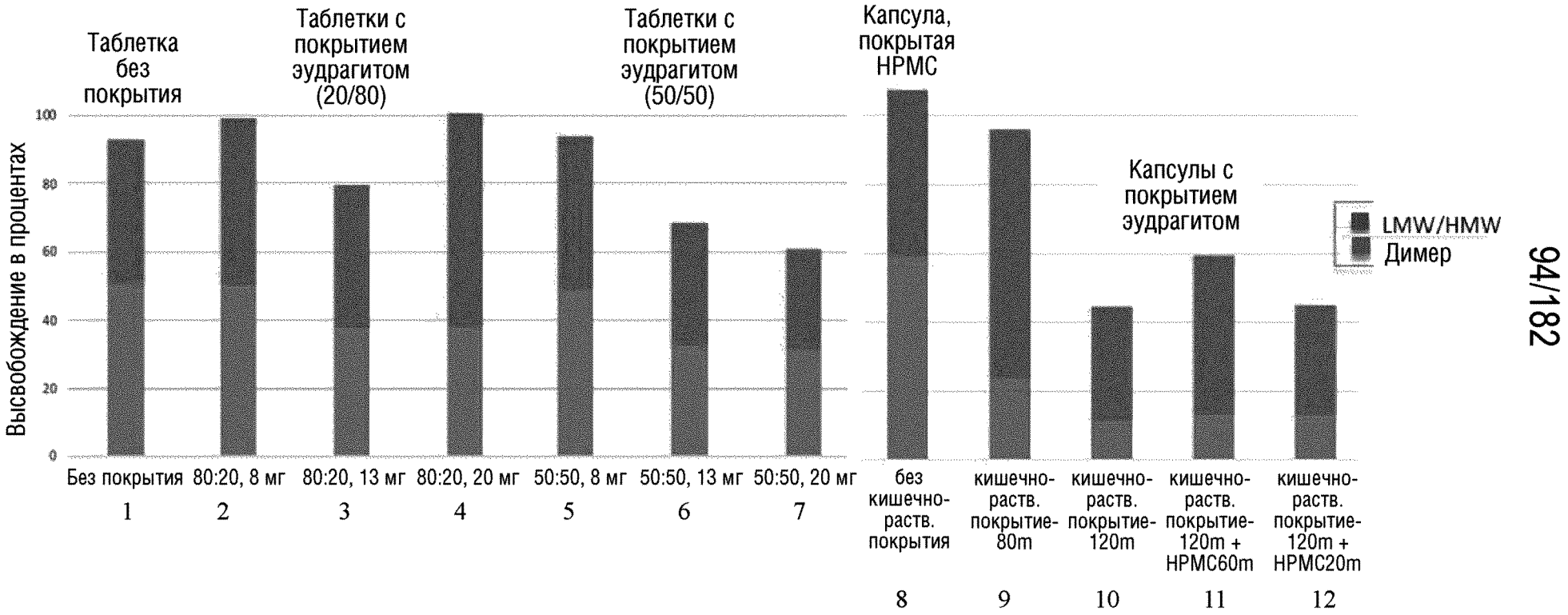
ФИГ.68


SEQ ID NO: 5 Чистота (димер %)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Растворение, минуты
HPMC только покрытие
HPMC/с покрытием эудрагитом

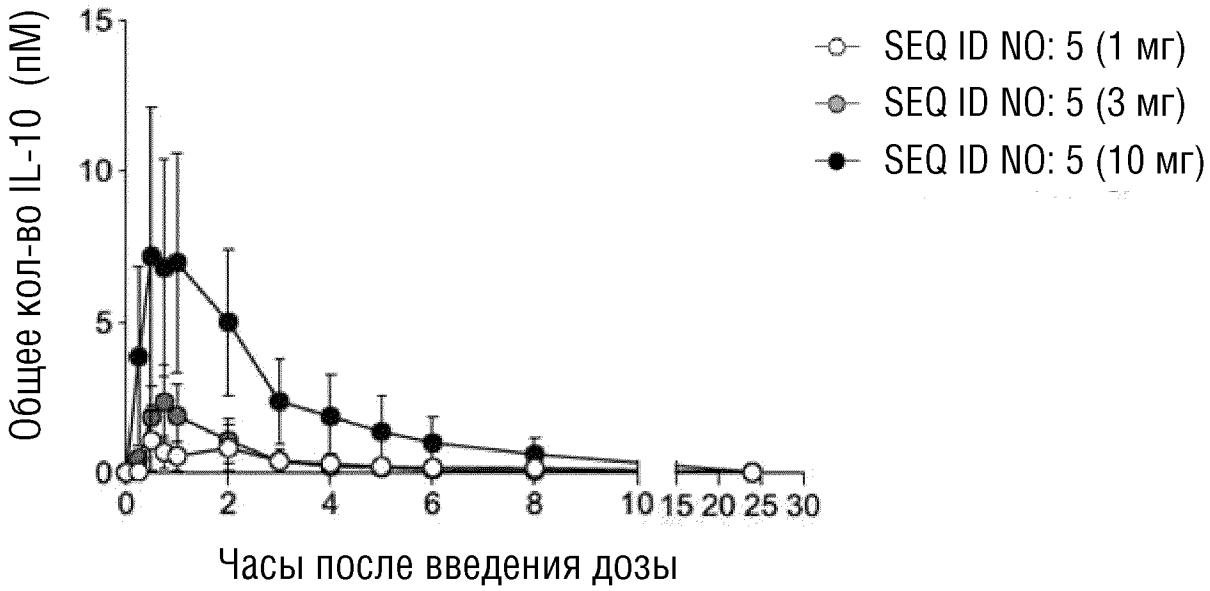
ФИГ.69


SEQ ID NO: 5 Чистота (димер %)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Растворение, минуты
Покрытие 50/50 при 8 мг
Покрытие 50/50 при 20 мг
Без покрытия

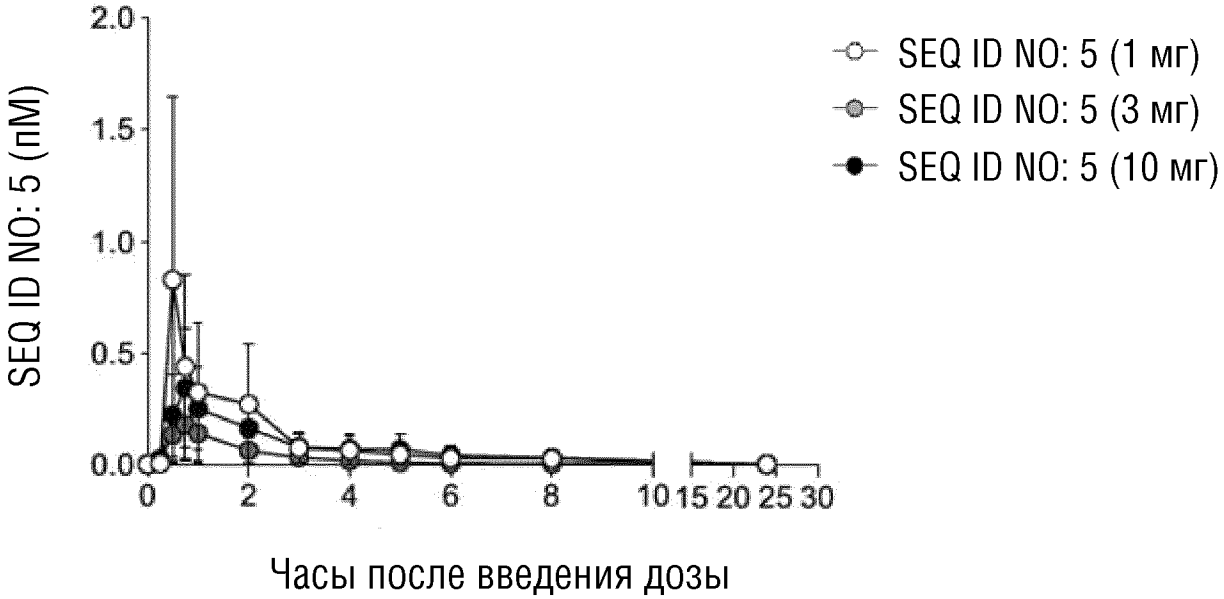
ФИГ.70


Таблетка без покрытия
Таблетки с покрытием эудрагитом (20/80)
Таблетки с покрытием эудрагитом (50/50)
Капсула, покрытая HPMC
Капсулы с покрытием эудрагитом
Высвобождение в процентах
100
80
60
40
20
0
LMW/HMW
Димер
Без покрытия
80:20, 8 мг
80:20, 13 мг
80:20, 20 мг
50:50, 8 мг
50:50, 13 мг
50:50, 20 мг
без кишечно-раств. покрытия
кишечно-раств. покрытие-80m
кишечно-раств. покрытие-120m
кишечно-раств. покрытие-120m + HPMC60m
кишечно-раств. покрытие-120m + HPMC20m
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

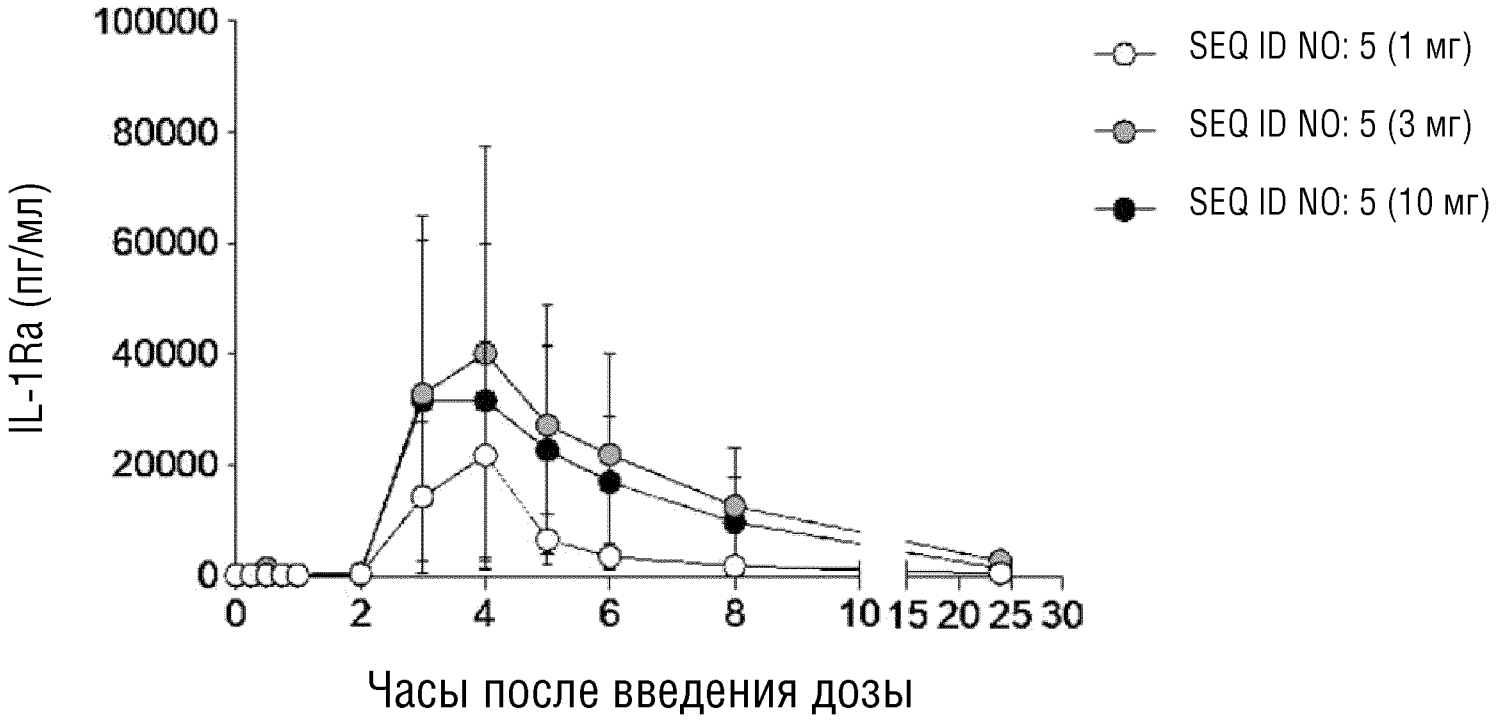
ФИГ.71A



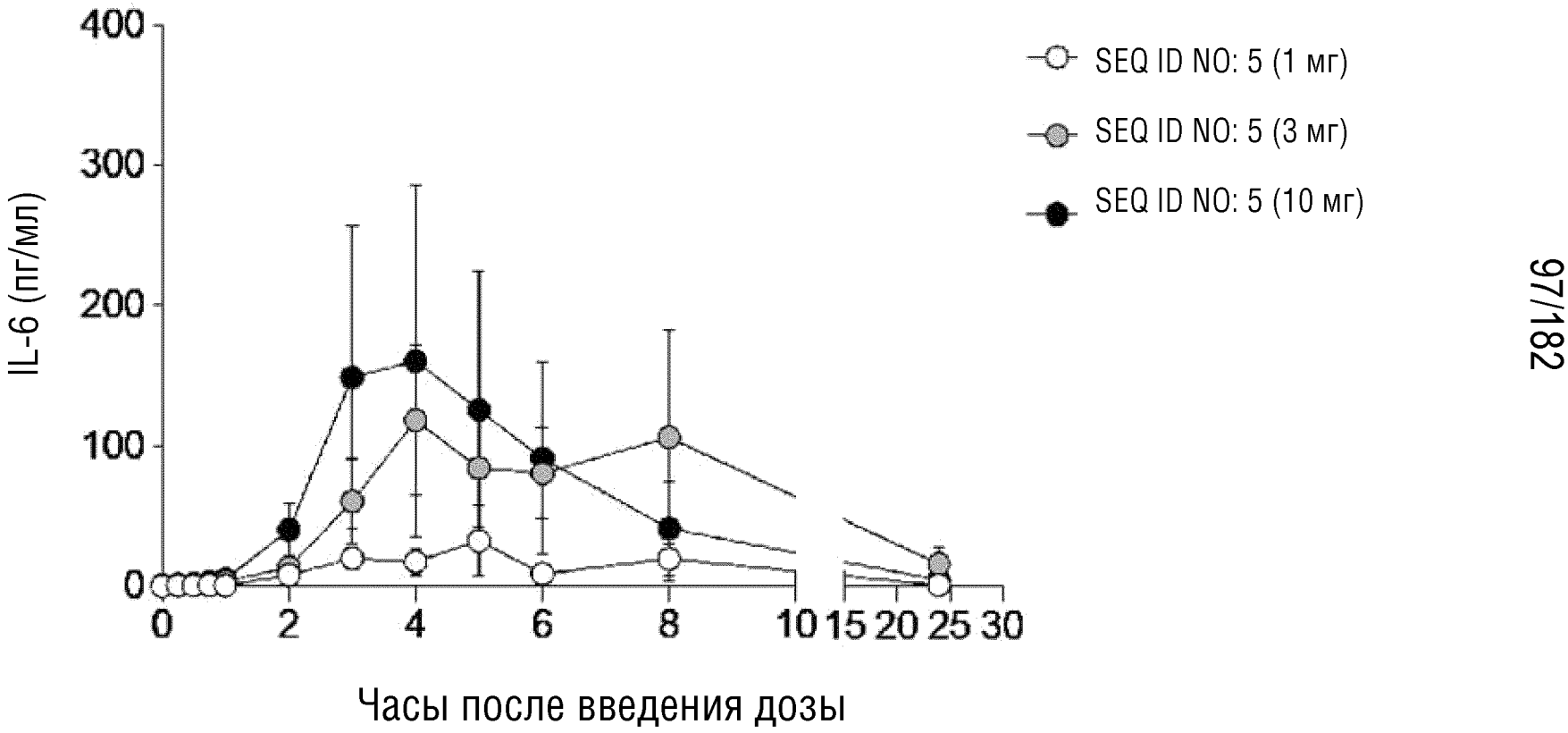
ФИГ.71B



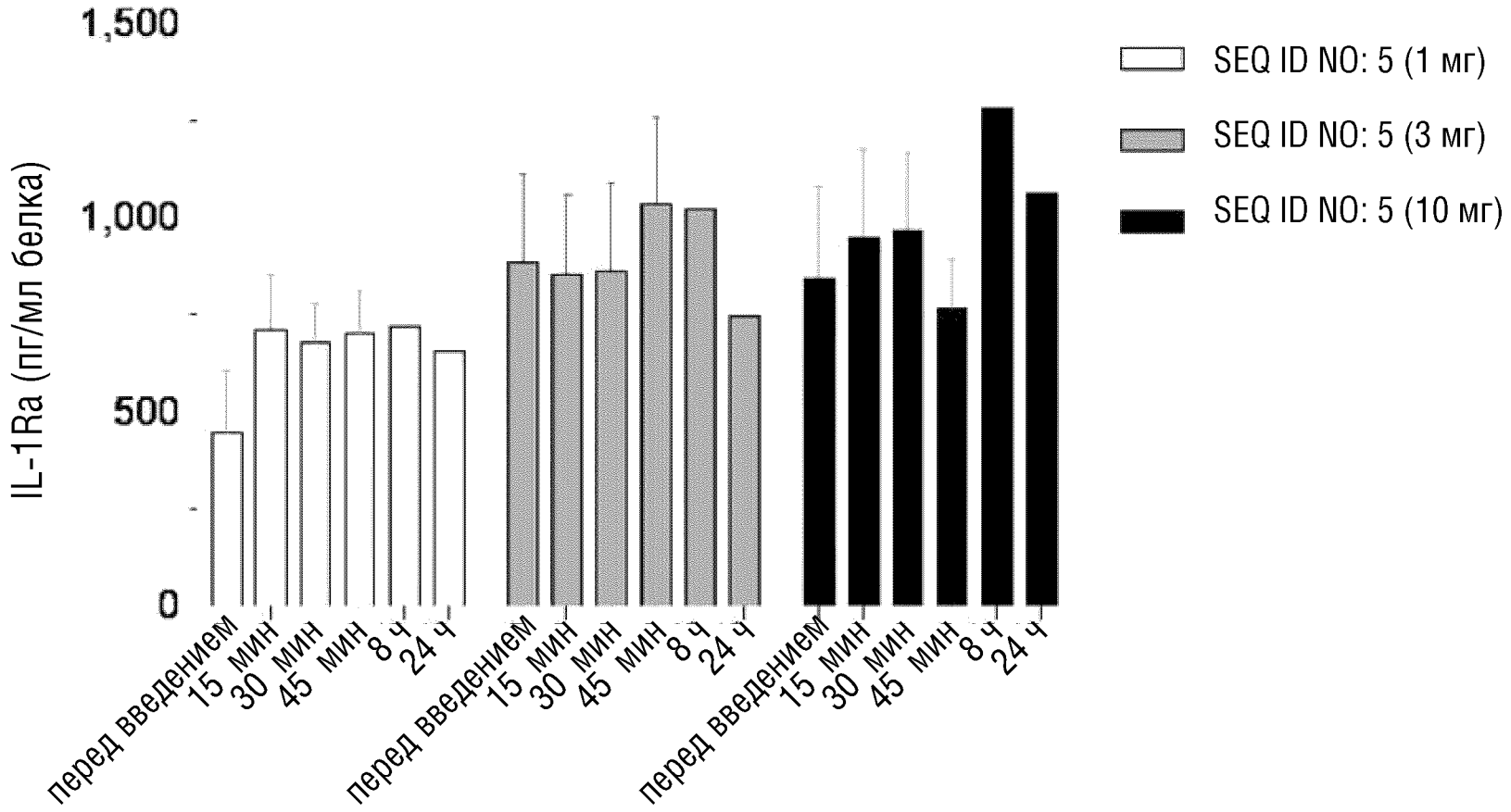
ФИГ.71C


100000
80000
60000
40000
20000
0
IL-1Ra (пг/мл)
0
2
4
6
8
10
15
20
25
30
Часы после введения дозы
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг)

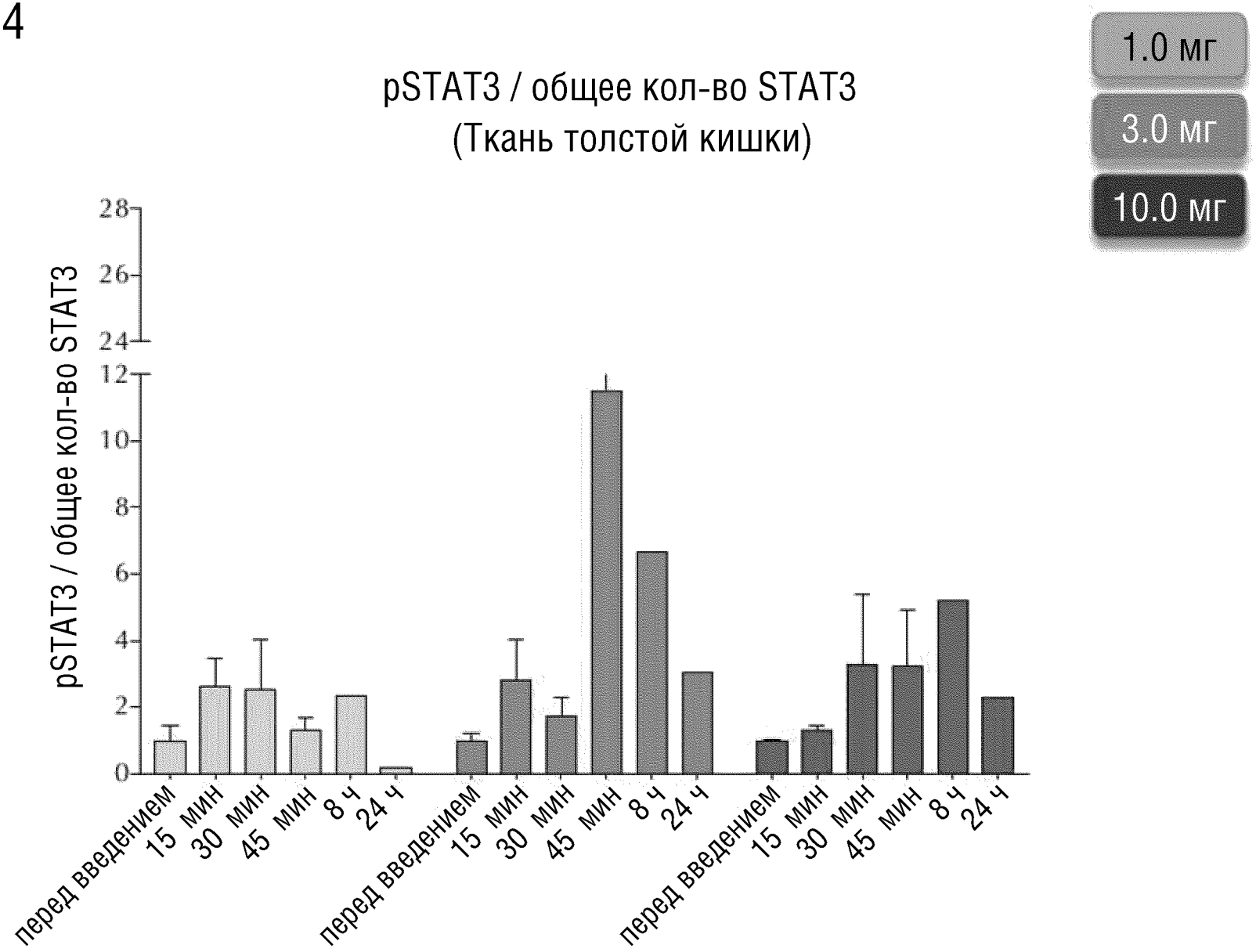
ФИГ.72


400
300
200
100
0
IL-6 (пг/мл)
0
2
4
6
8
10
15
20
25
30
Часы после введения дозы
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг)

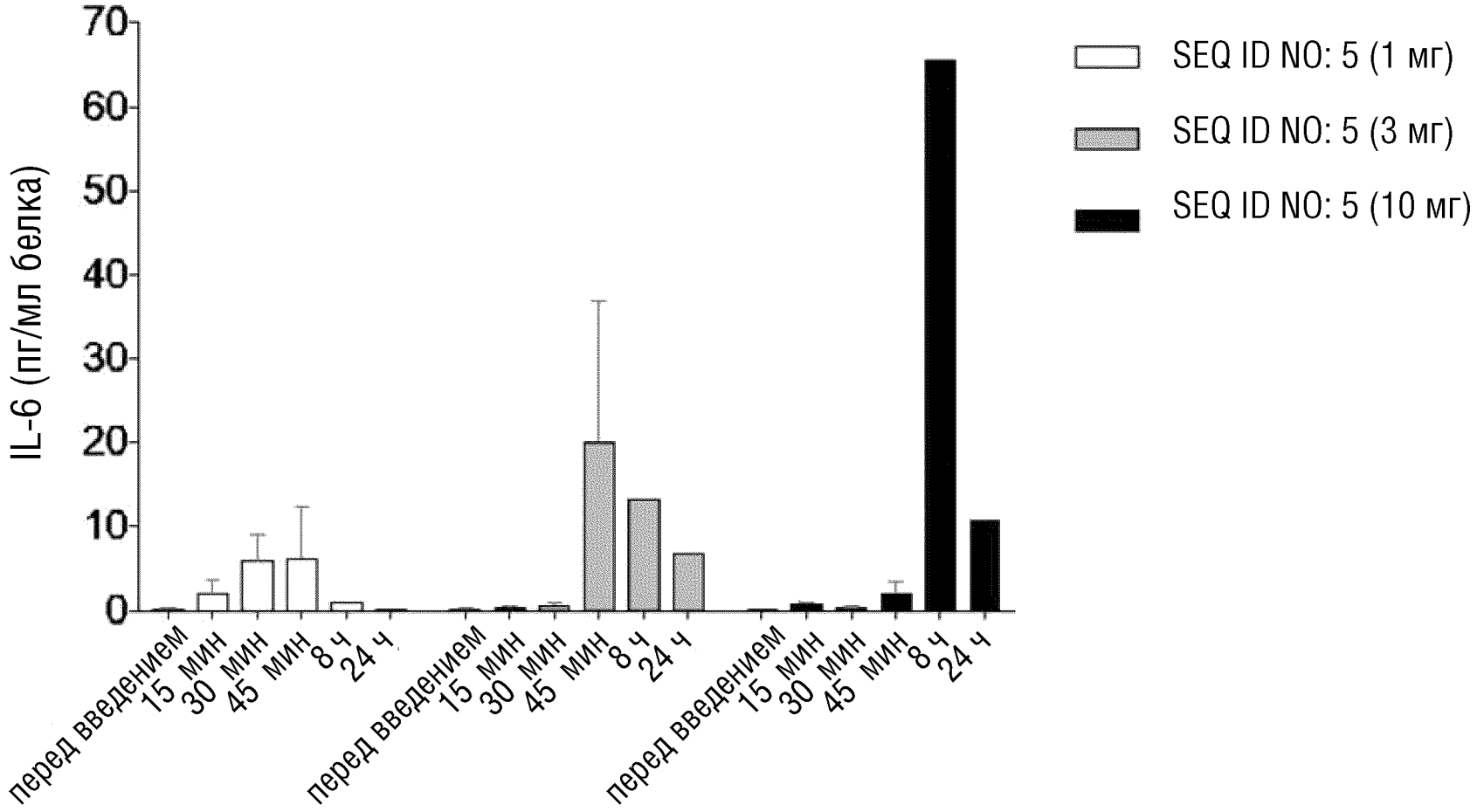
ФИГ.73


1,500
1,000
500
0
IL-1Ra (пг/мл белка)
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг)
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч

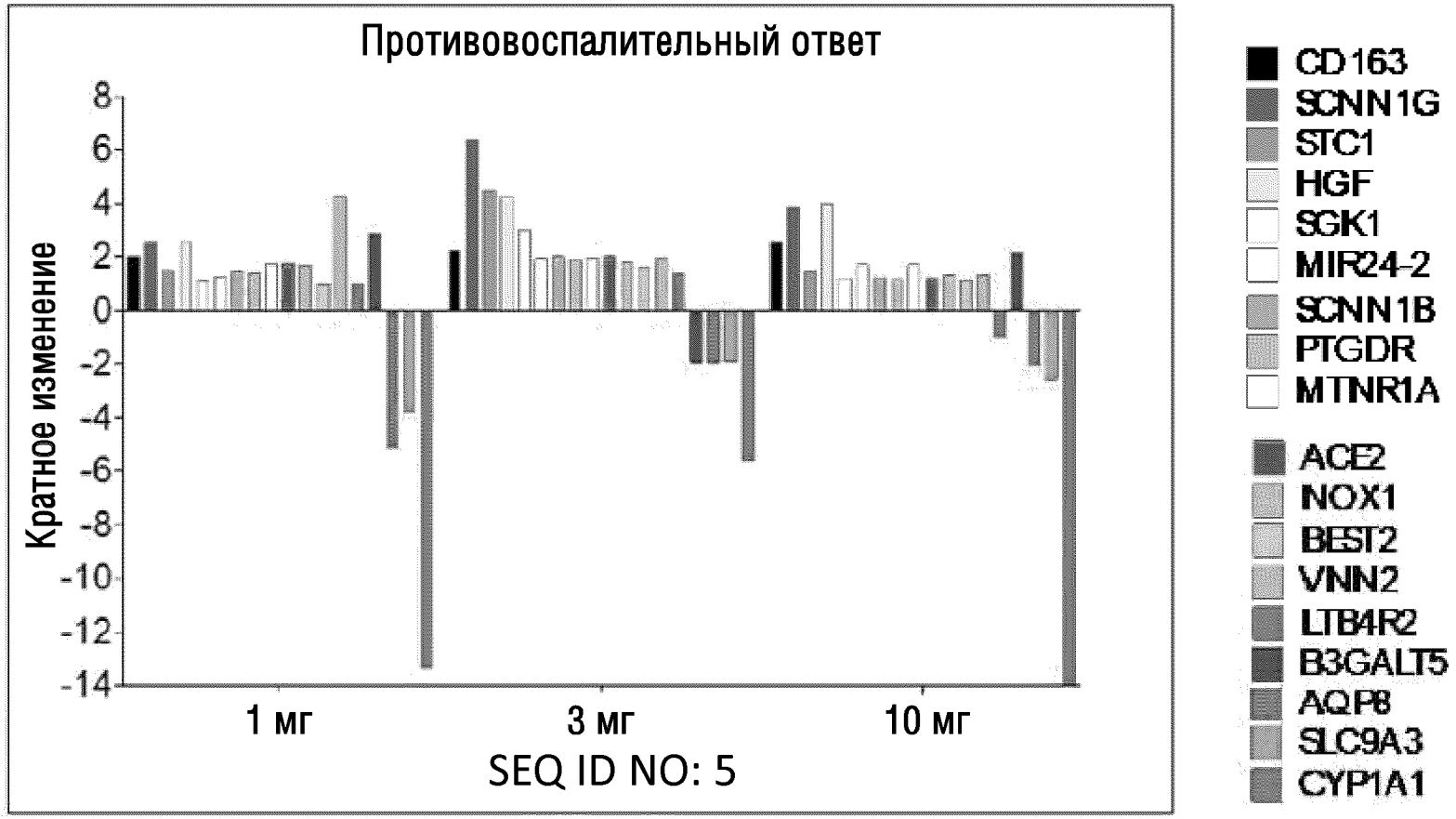
ФИГ.74


pSTAT3 / общее кол-во STAT3
(Ткань толстой кишки)
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг
pSTAT3 / общее кол-во STAT3
28
26
24
12
10
8
6
4
2
0
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч

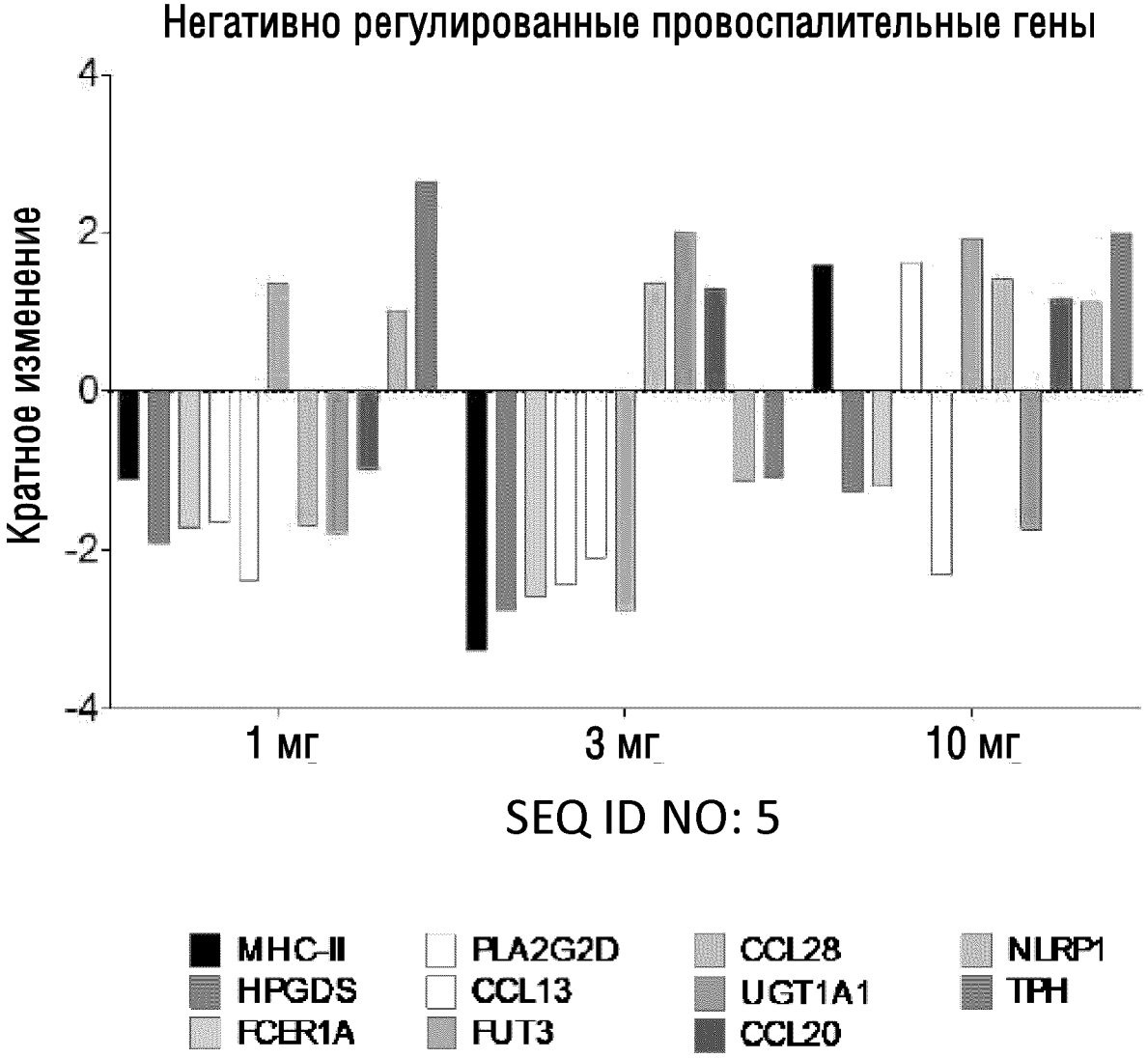
ФИГ.75


IL-6 (пг/мл белка)
70
60
50
40
30
20
10
0
SEQ ID NO: 5 (1 мг)
SEQ ID NO: 5 (3 мг)
SEQ ID NO: 5 (10 мг)
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч

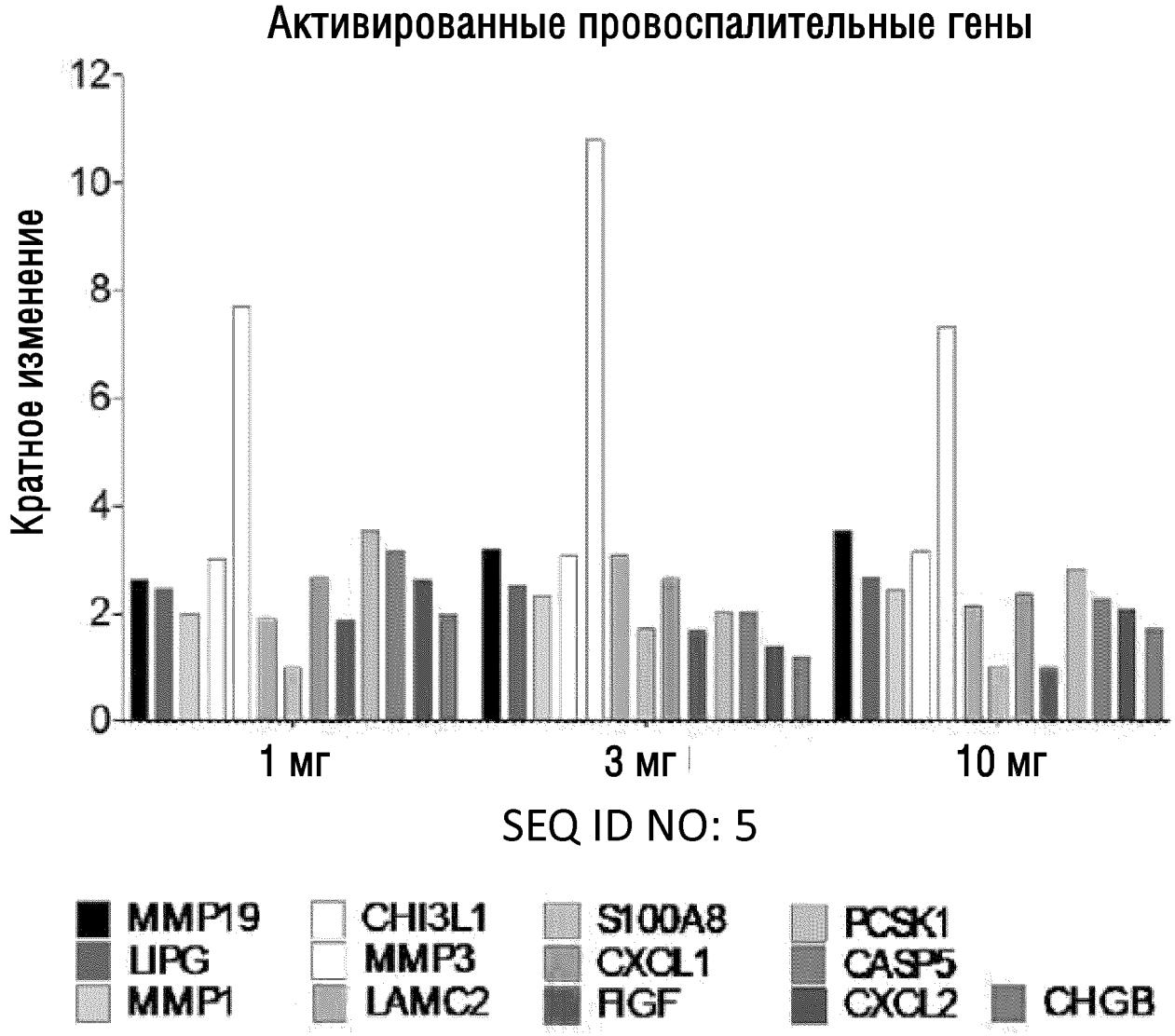
ФИГ.76


Противовоспалительный ответ
Кратное изменение
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
1 мг
3 мг
10 мг
SEQ ID NO: 5
CD163
SCNN1G
STC1
HGF
SGK1
MIR24-2
SCNN1B
PTGDR
MTNR1A
ACE2
NOX1
BEST2
VNN2
LTB4R2
B3GALT5
AQP8
SLC9A3
CYP1A1

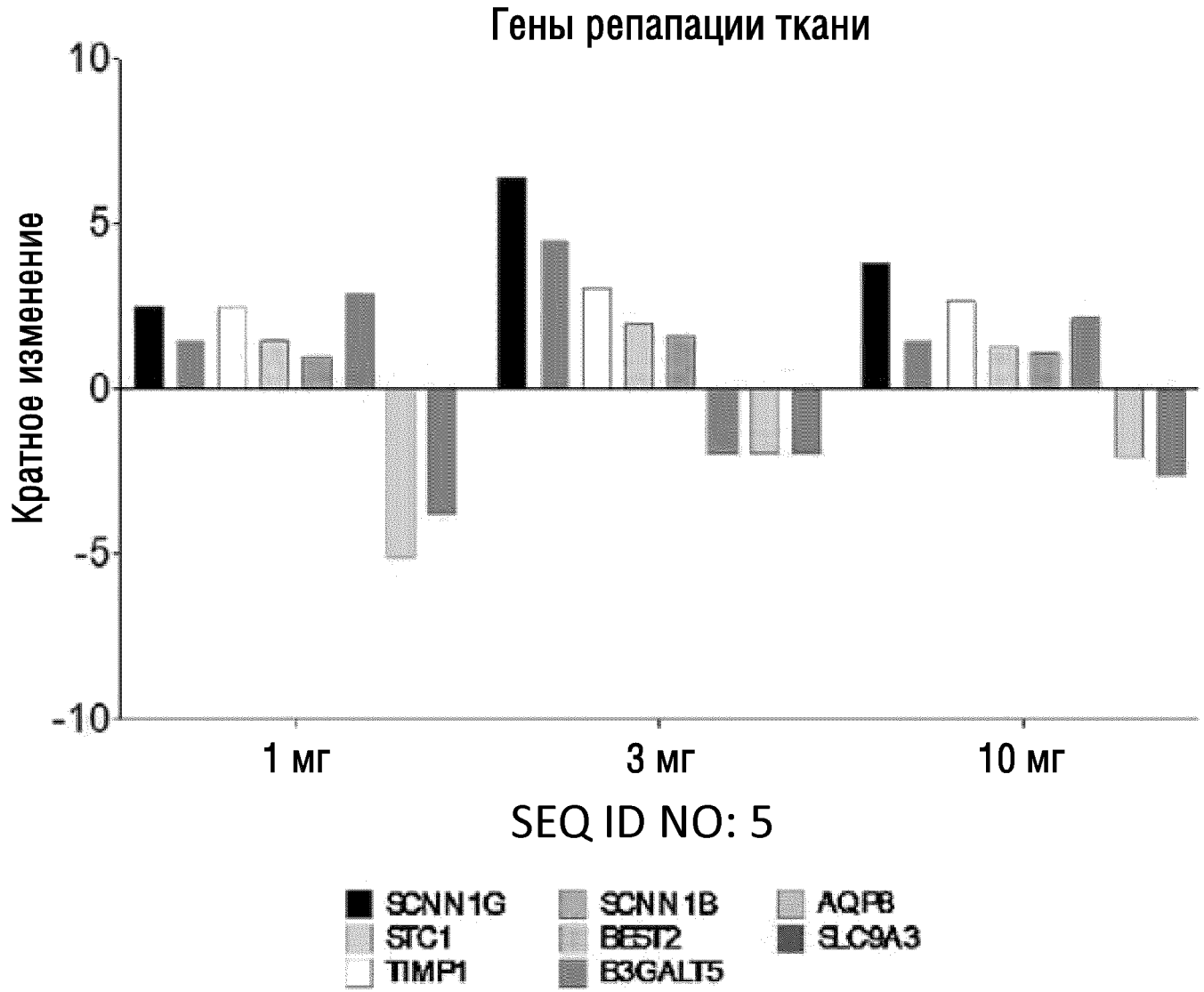
ФИГ.77


Негативно регулированные провоспалительные гены
Кратное изменение
4
2
0
-2
-4
1 мг
3 мг
10 мг
SEQ ID NO: 5
MHC-II
HPGDS
FCER1A
PLA2G2D
CCL13
FUT3
CCL28
UGT1A1
CCL20
NLRP1
TPH

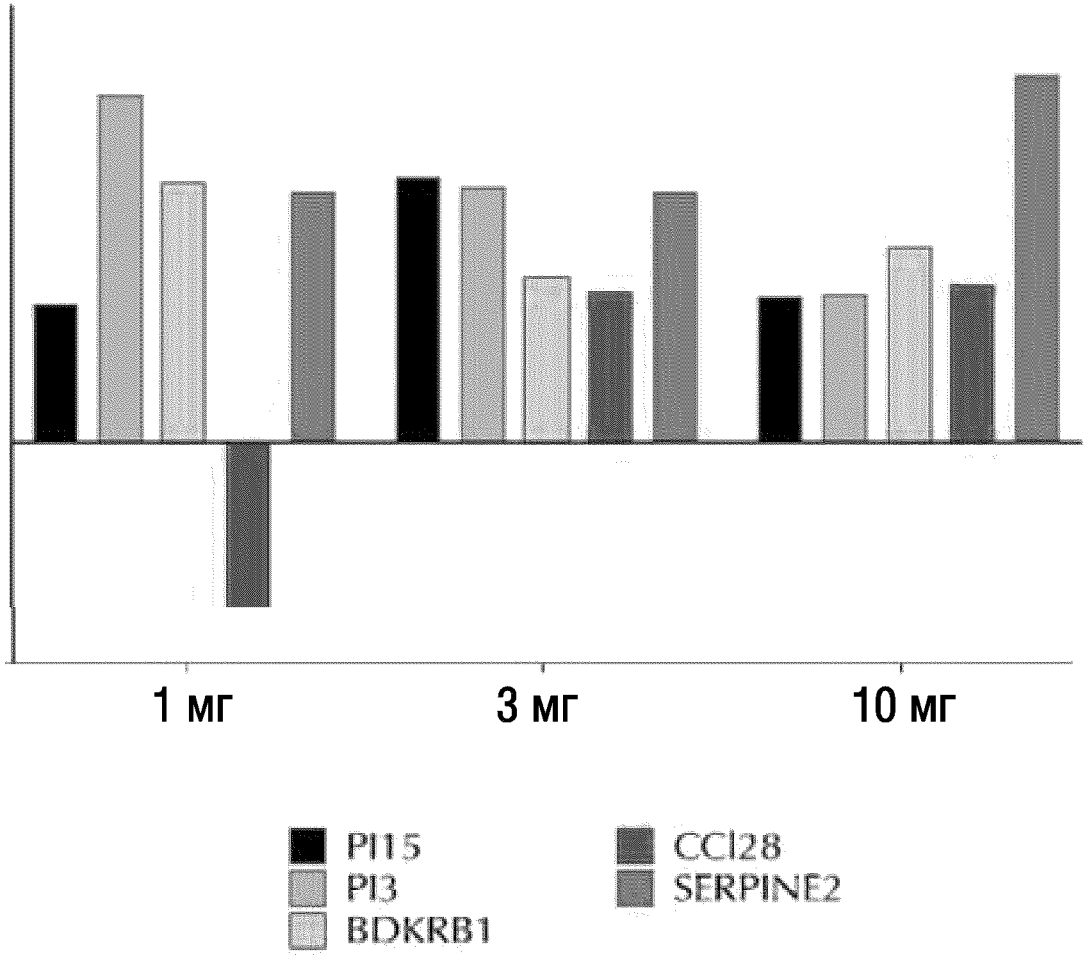
ФИГ.78


Активированные провоспалительные гены
Кратное изменение
12
10
8
6
4
2
0
1 мг
3 мг
10 мг
SEQ ID NO: 5
MMP19
LIPG
MMP1
CHI3L1
MMP3
LAMC2
S100A8
CXCL1
FIGF
PCSK1
CASP5
CXCL2
CHGB

ФИГ.79


Гены репапации ткани
Кратное изменение
10
5
0
-5
-10
1 мг
3 мг
10 мг
SEQ ID NO: 5
SCNN1G
STC1
TIMP1
SCNN1B
BEST2
B3GALT5
AQP8
SLC9A3

ФИГ.80



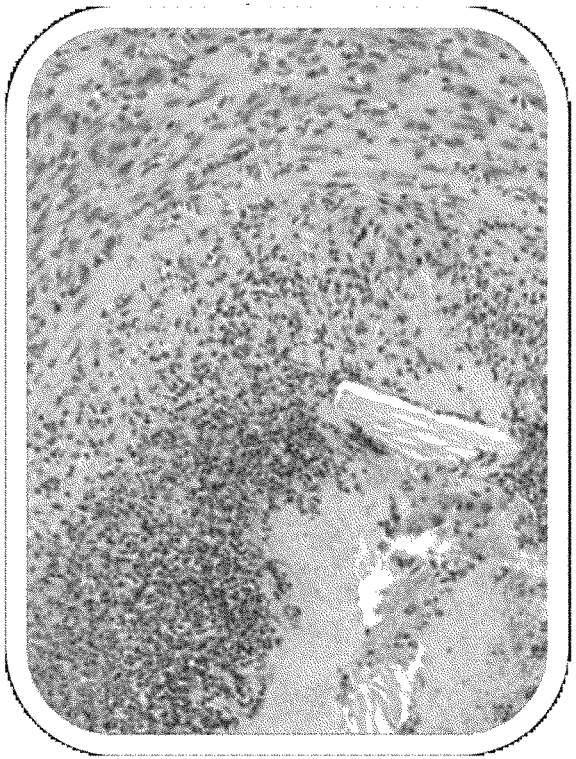
ФИГ.81A

БЕЗ ОБРАБОТКИ
(НЕТ ЗАБОЛЕВАНИЯ)



ФИГ.81B

ЗАБОЛЕВАНИЕ: ПОЛУЧАВШИЙ
ЛЕЧЕНИЕ НОСИТЕЛЕМ/ПЛАЦЕБО

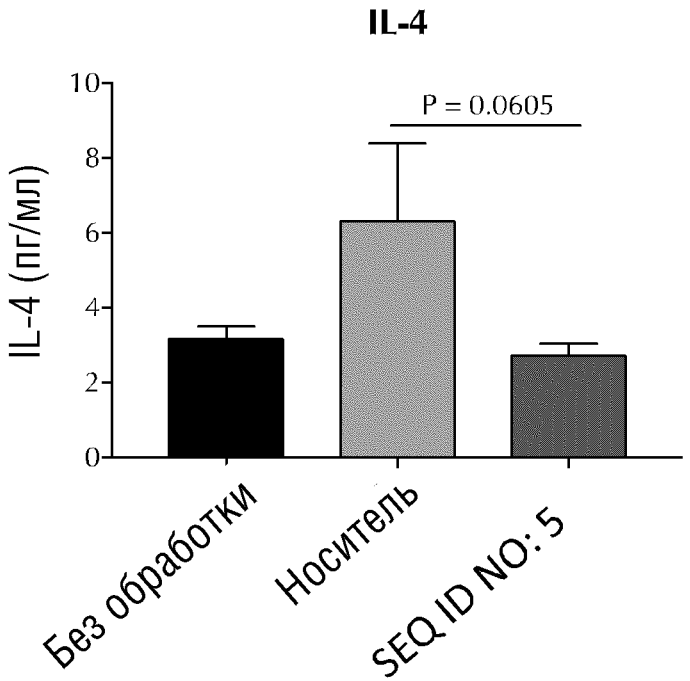


ФИГ.81C

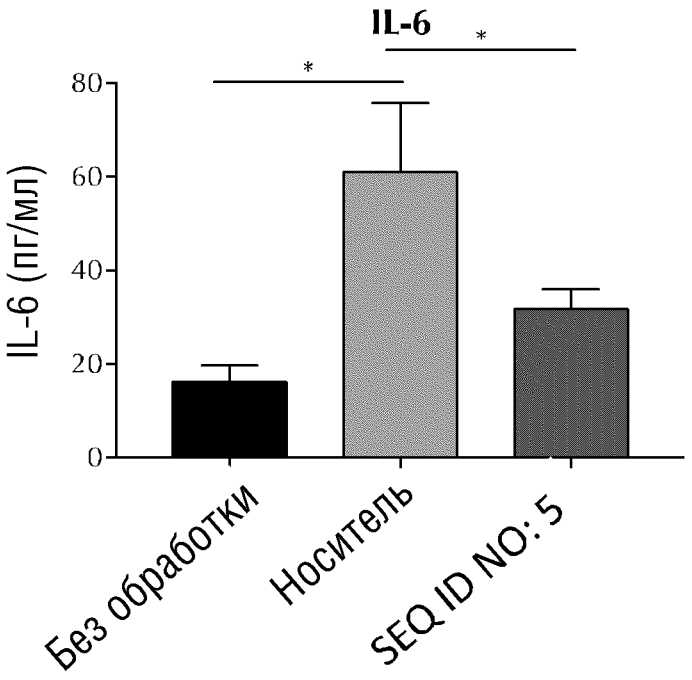
ЗАБОЛЕВАНИЕ:
ЛЕЧЕНИЕ SEQ ID NO:5



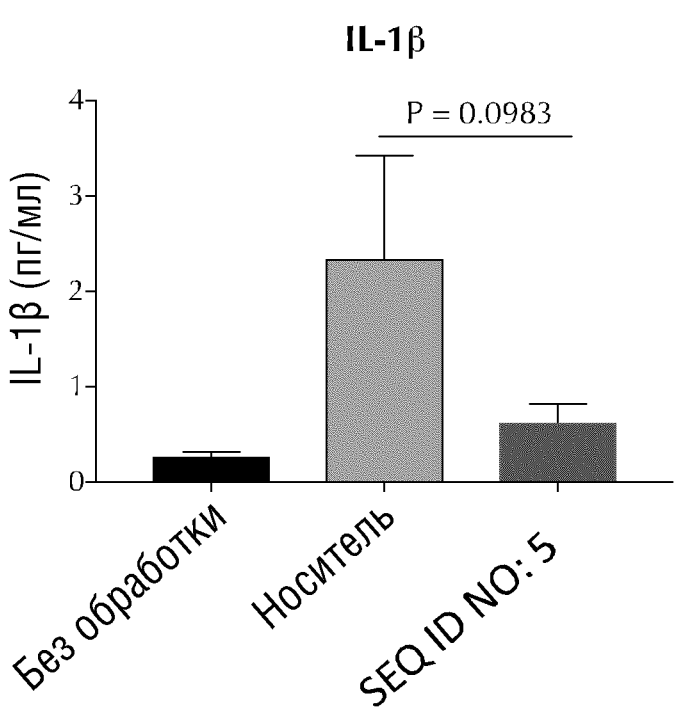
ФИГ.82A



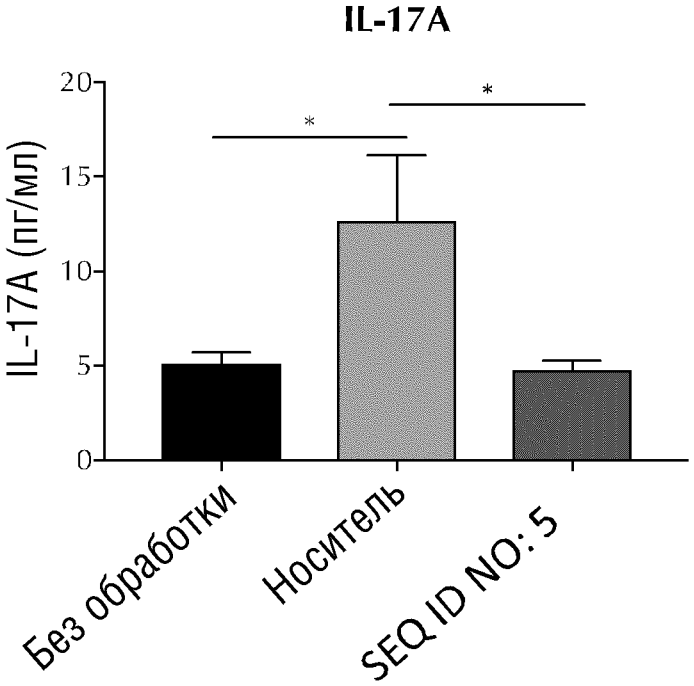
ФИГ.82B



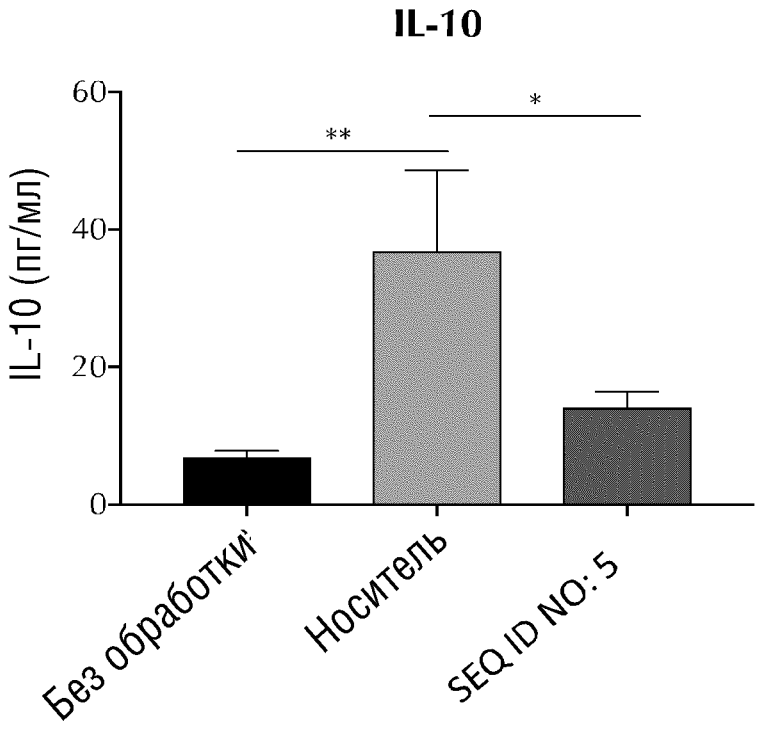
ФИГ.82C



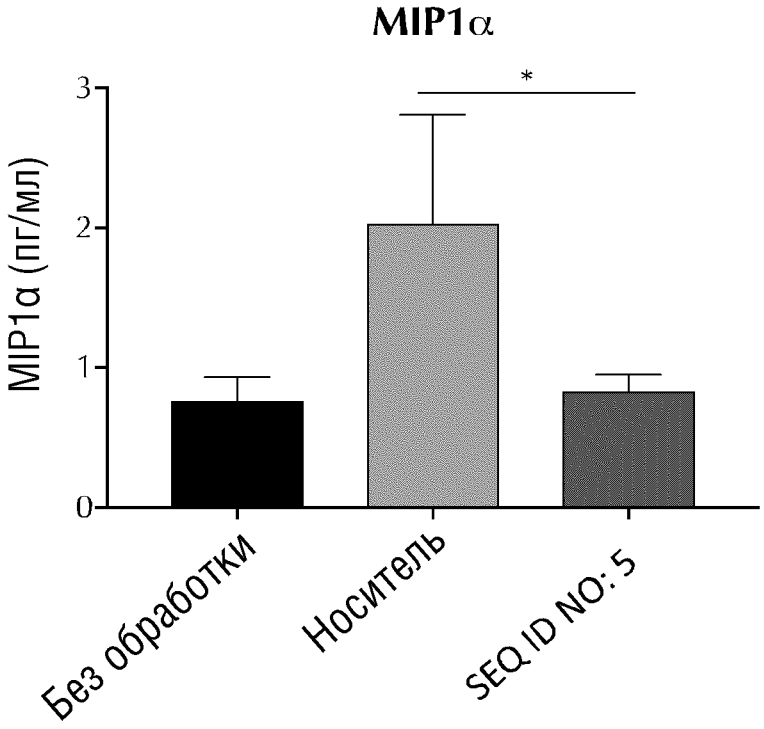
ФИГ.82D



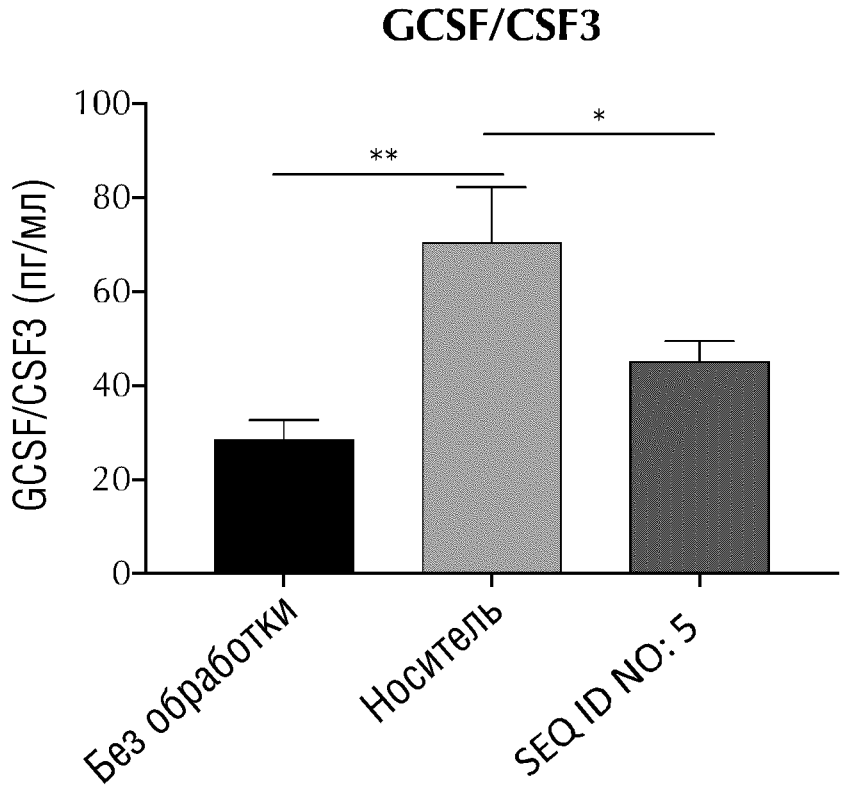
ФИГ.82E



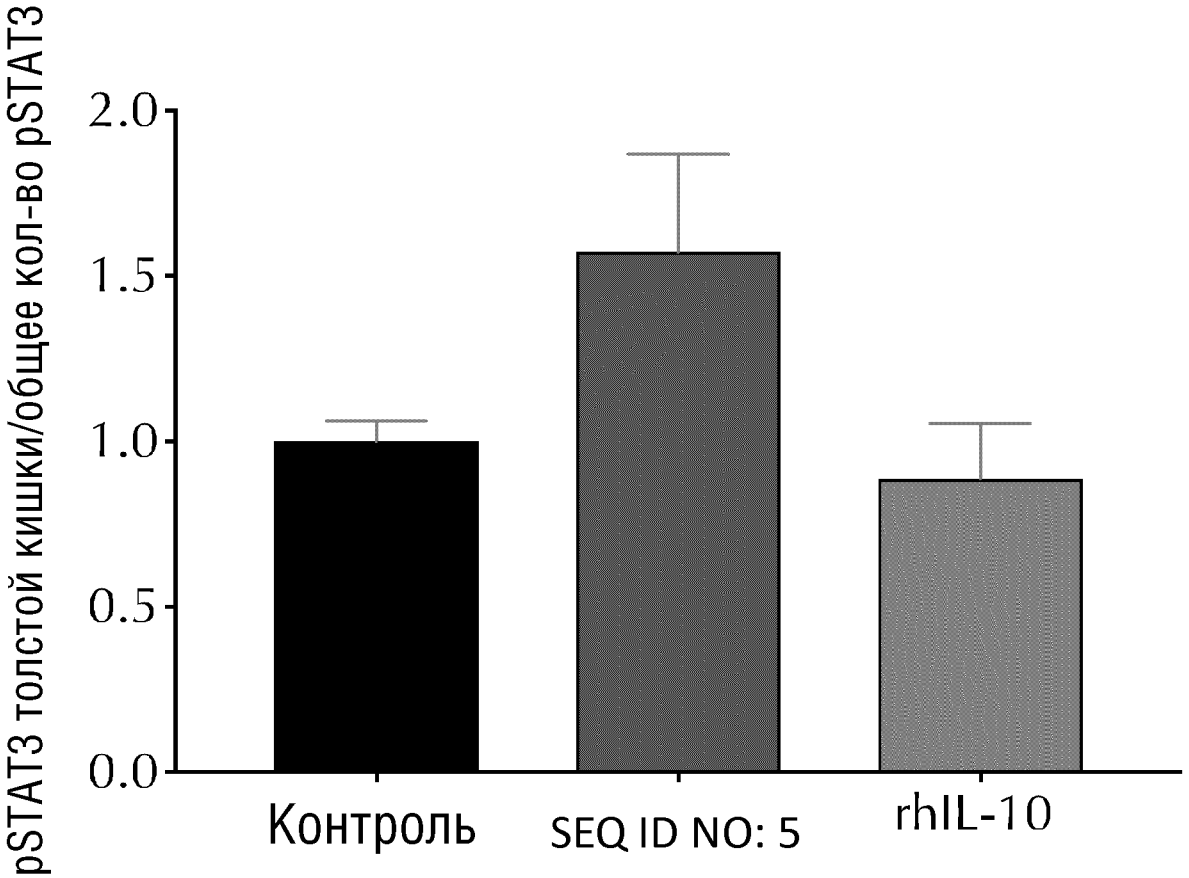
ФИГ.82F



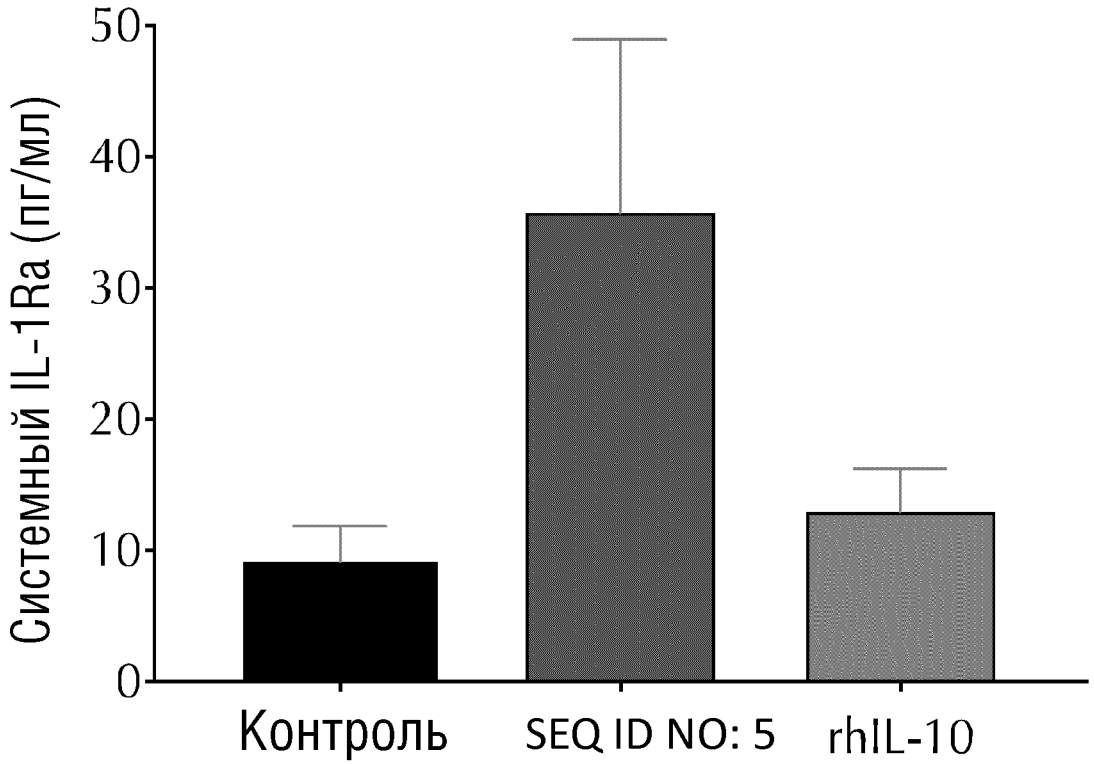
ФИГ.82G


GCSF/CSF3
GCSF/CSF3 (пг/мл)
100
80
60
40
20
0
**
*
Без обработки
Носитель
SEQ ID NO: 5

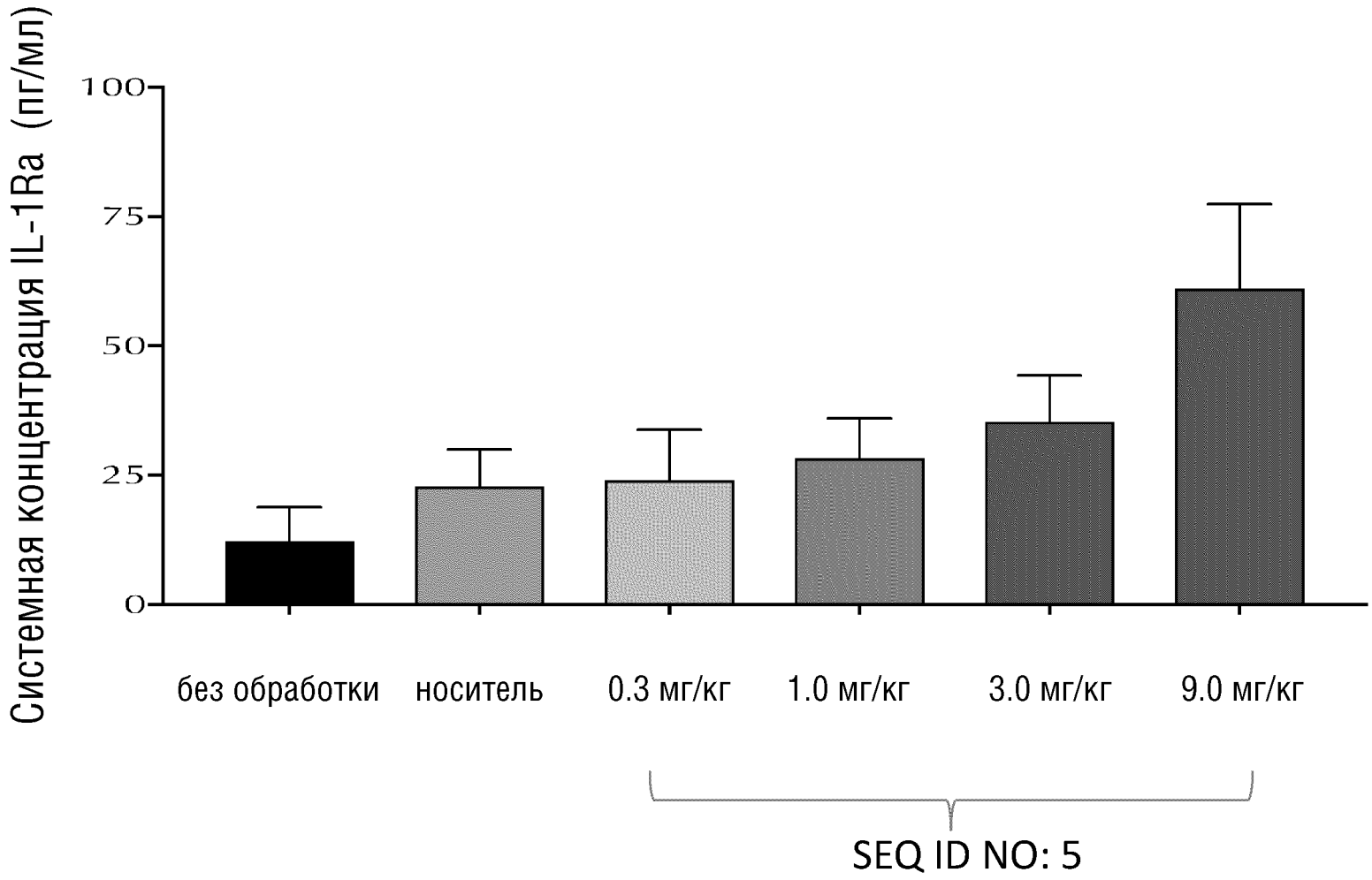
ФИГ.83А


pSTAT3 толстой кишки/общее кол-во pSTAT3
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Контроль
SEQ ID NO: 5
rhIL-10

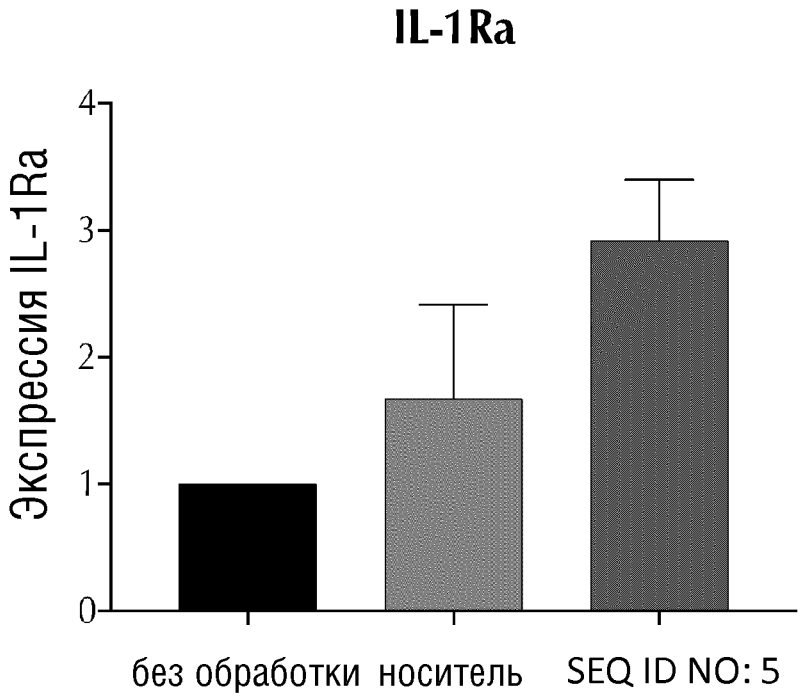
ФИГ.83B


Системный IL-1Ra (пг/мл)
50
40
30
20
10
0
Контроль
SEQ ID NO: 5
rhIL-10

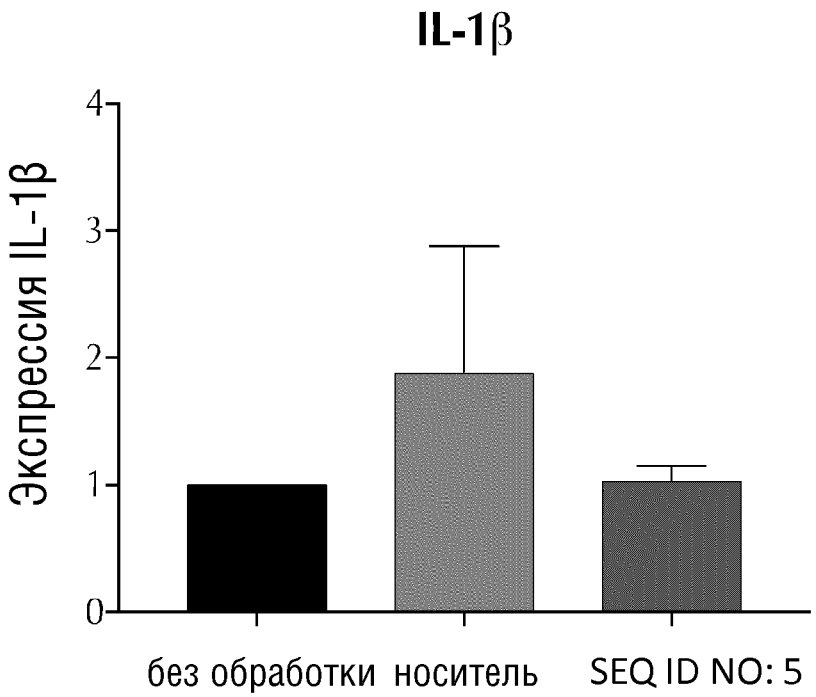
ФИГ.84


Системная концентрация IL-1Ra (пг/мл)
100
75
50
25
0
без обработки
носитель
0.3 мг/кг
1.0 мг/кг
3.0 мг/кг
9.0 мг/кг
SEQ ID NO: 5

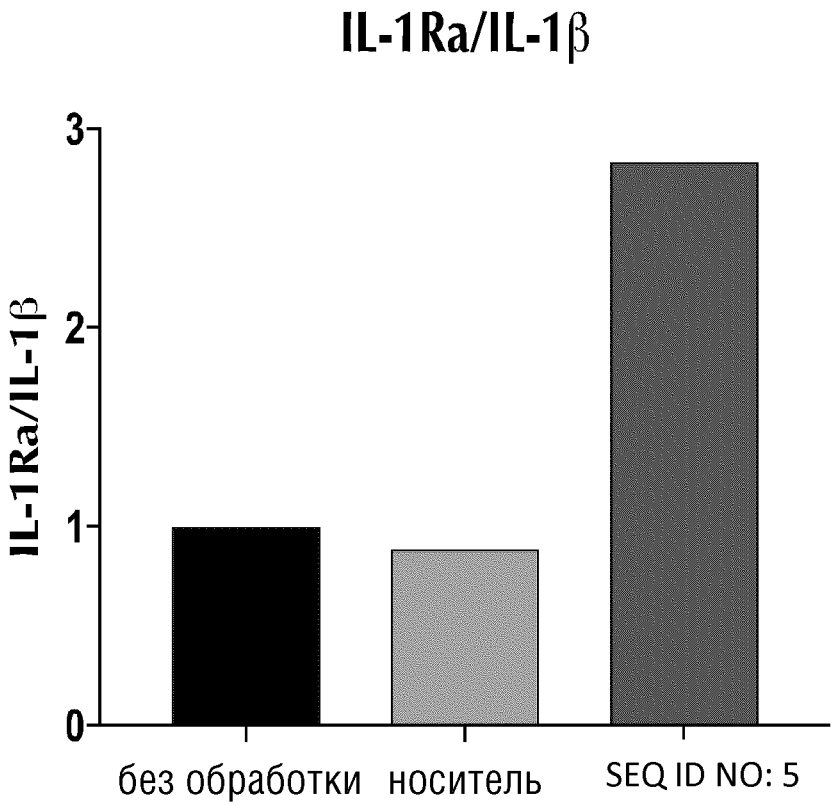
ФИГ.85A



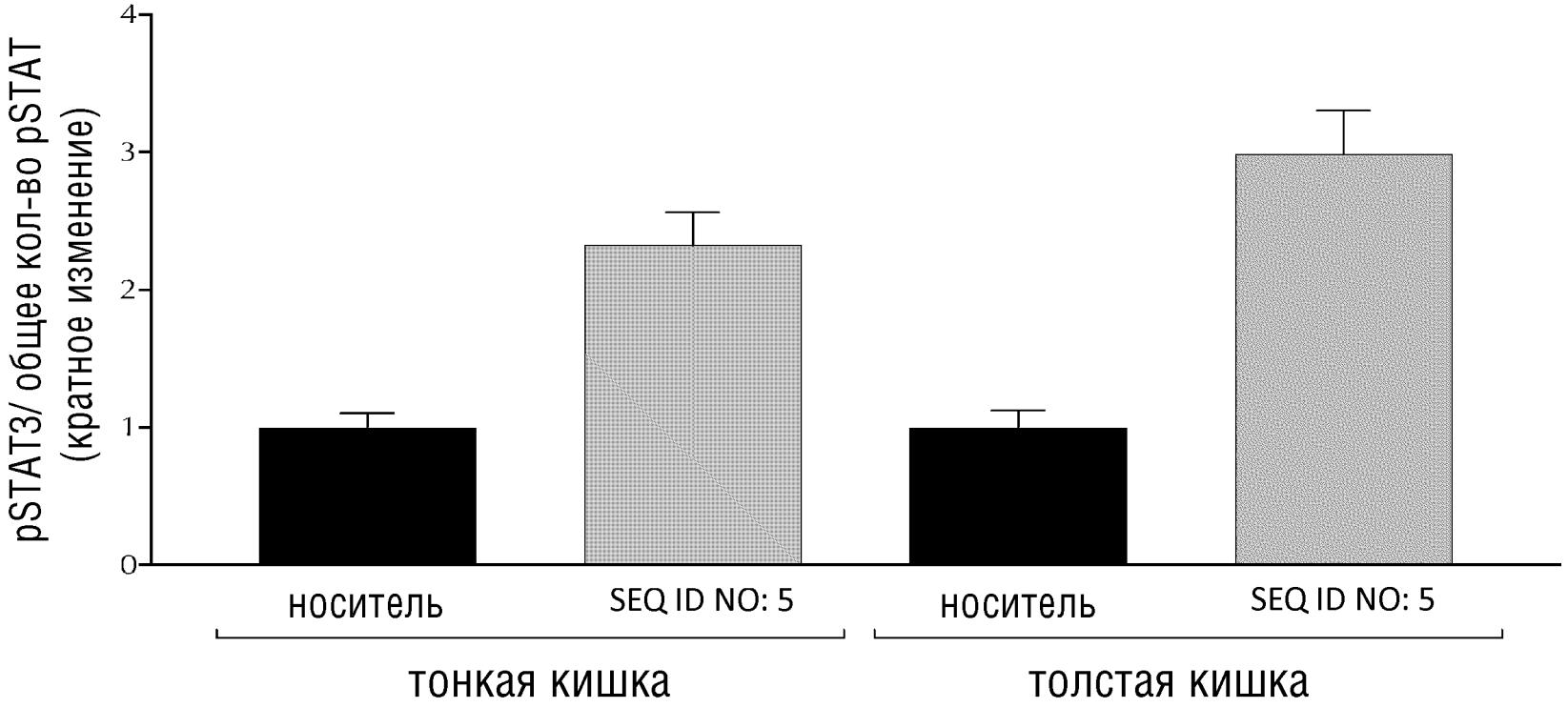
ФИГ.85B



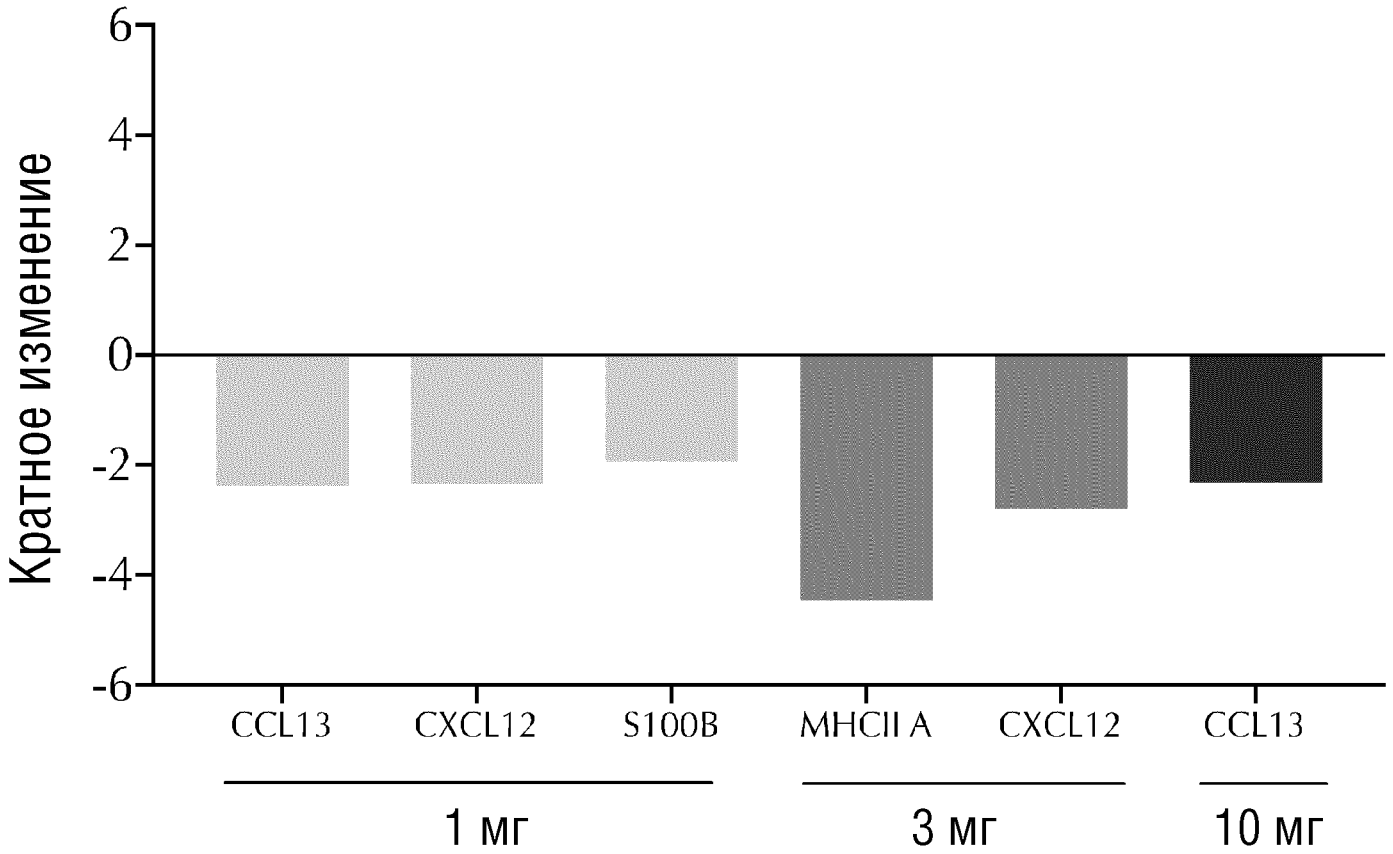
ФИГ.85C


IL-1Ra/IL-1β
IL-1Ra/IL-1β
3
2
1
0
без обработки
носитель
SEQ ID NO: 5

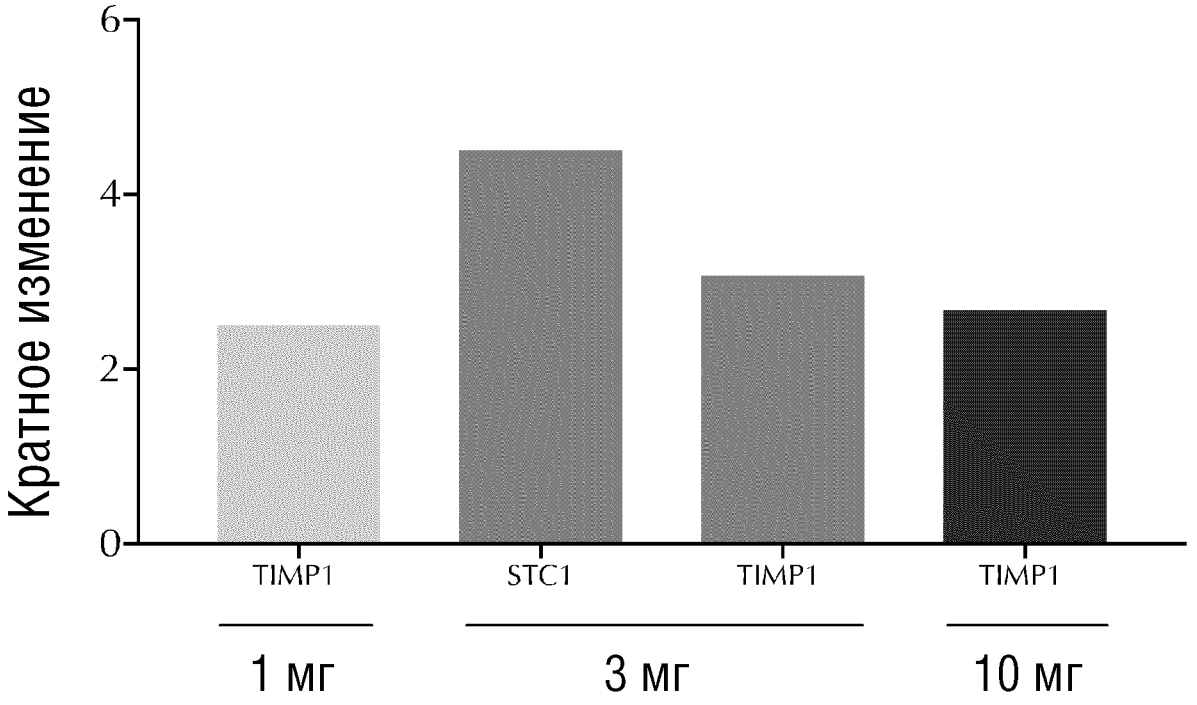
ФИГ.86


pSTAT3/ общее кол-во pSTAT
(кратное изменение)
4
3
2
1
0
носитель
SEQ ID NO: 5
носитель
SEQ ID NO: 5
тонкая кишка
толстая кишка

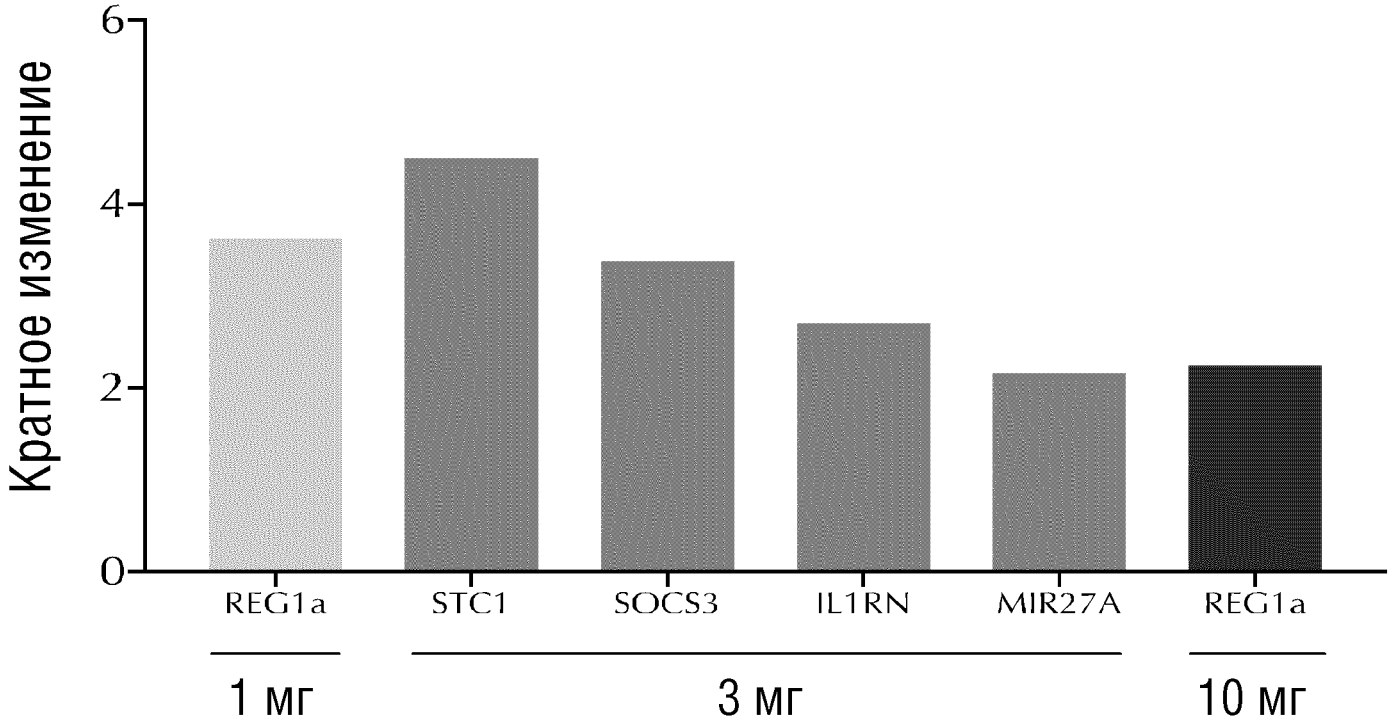
ФИГ.87


Кратное изменение
6
4
2
0
-2
-4
-6
CCL13
CXCL12
S100B
MHCII A
CXCL12
CCL13
1 мг
3 мг
10 мг

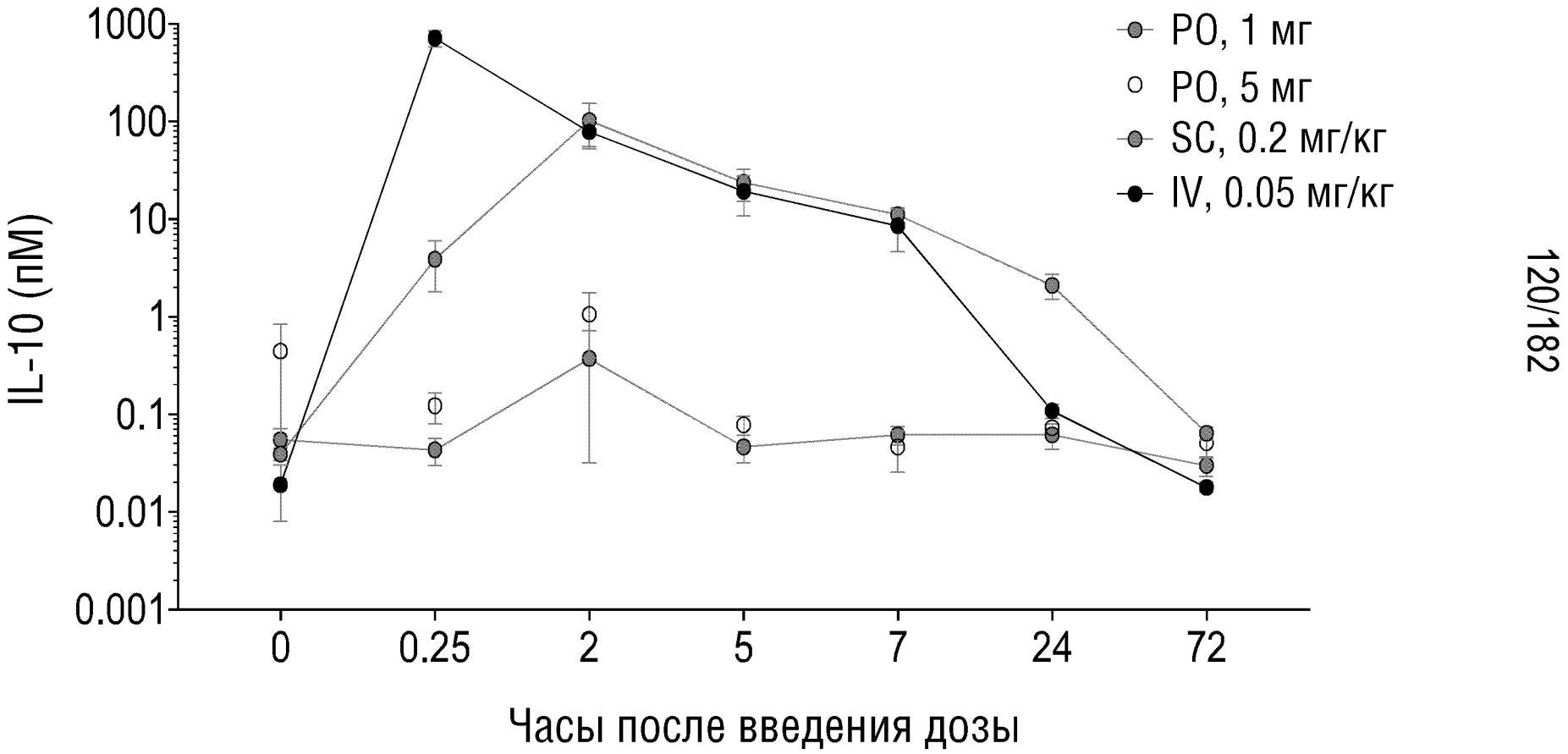
ФИГ.88



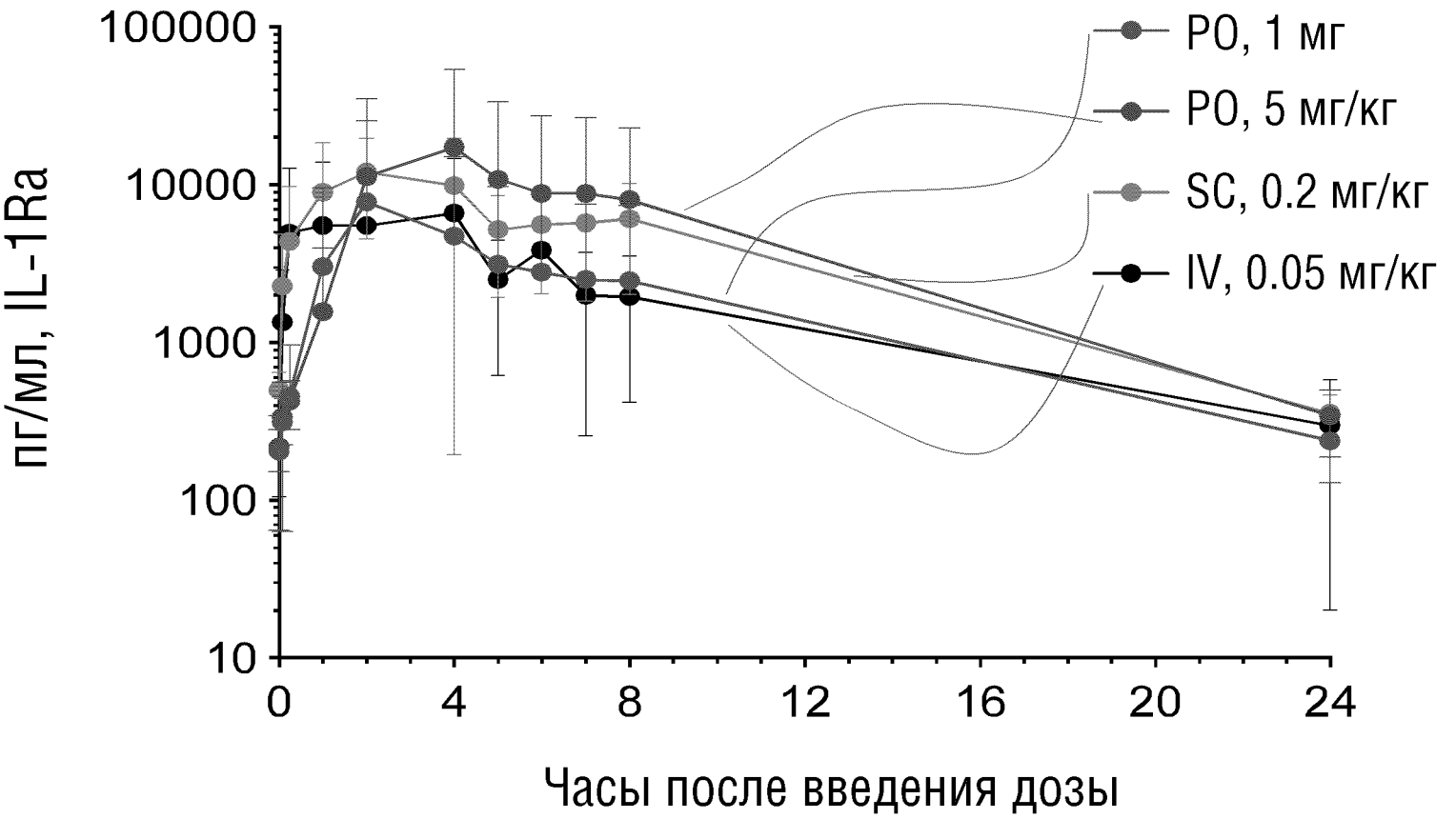
ФИГ.89


Кратное изменение
6
4
2
0
REG1a
STC1
SOCS3
IL1RN
MIR27A
REG1a
1 мг
3 мг
10 мг

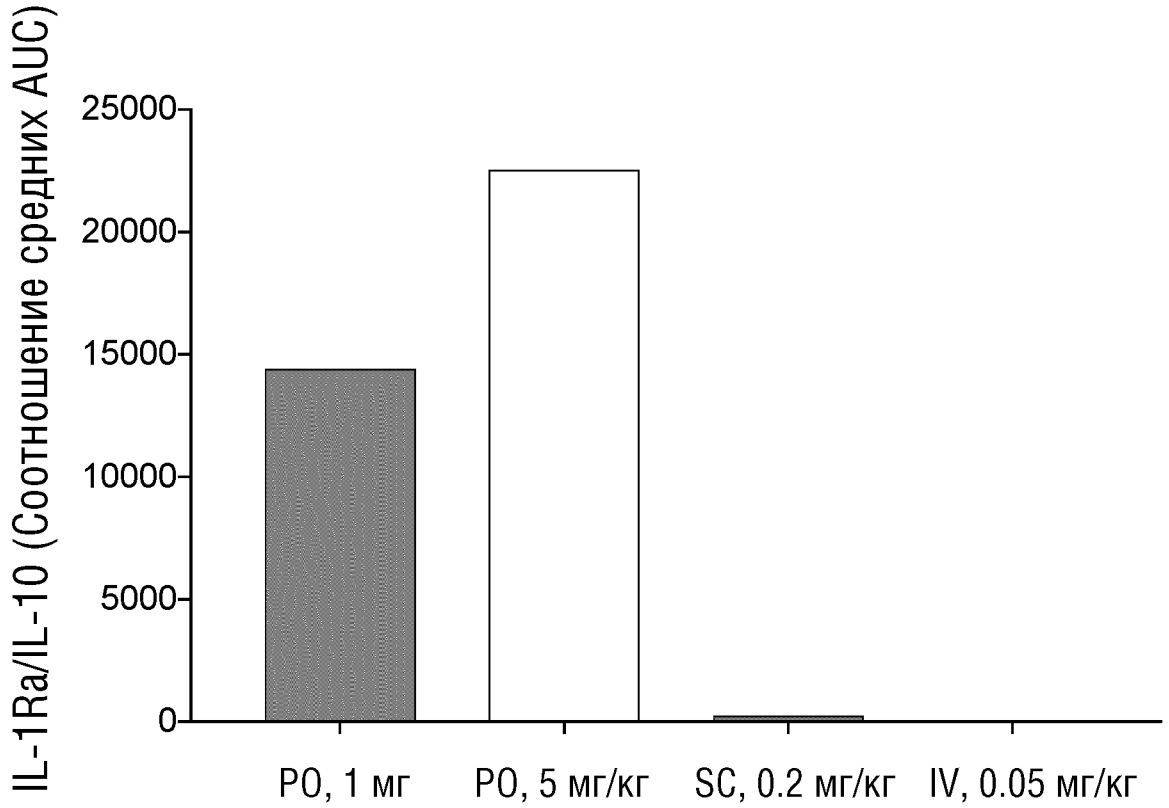
ФИГ.90А


1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
IL-10 (пМ)
0
0.25
2
5
7
24
72
Часы после введения дозы
PO, 1 мг
PO, 5 мг
SC, 0.2 мг/кг
IV, 0.05 мг/кг

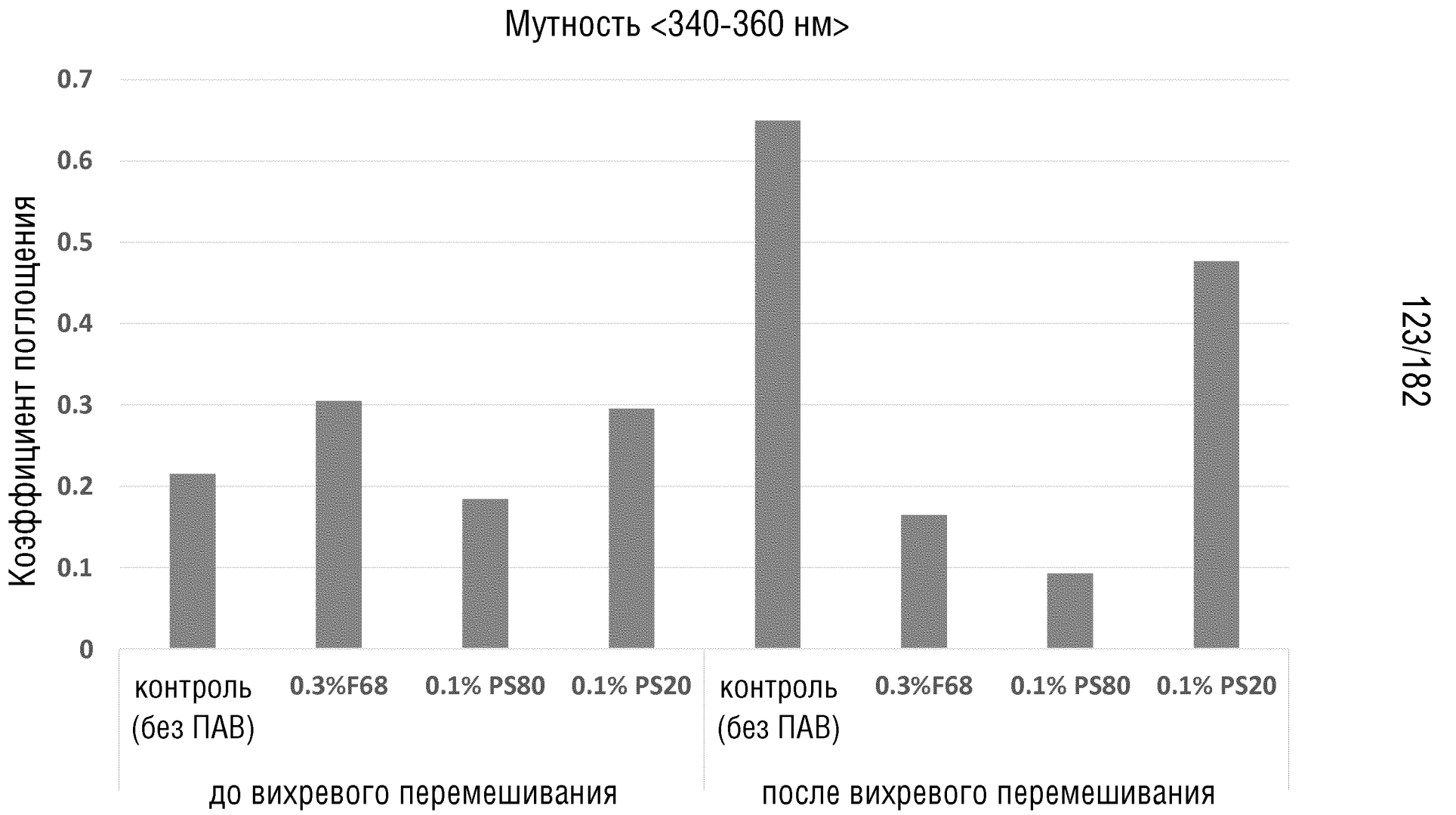
ФИГ.90В


100000
10000
1000
100
10
пг/мл, IL-1Ra
0
4
8
12
16
20
24
Часы после введения дозы
PO, 1 мг
PO, 5 мг/кг
SC, 0.2 мг/кг
IV, 0.05 мг/кг

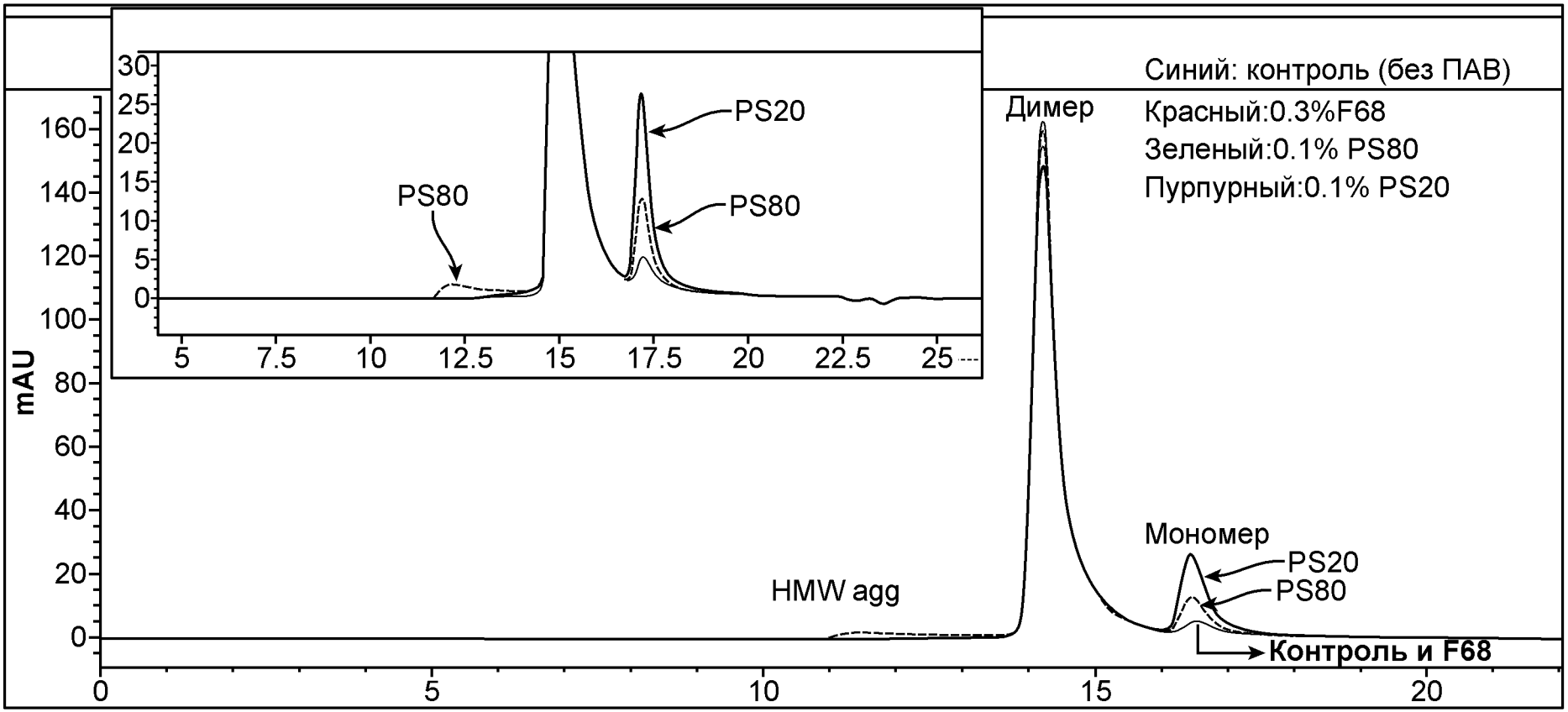
ФИГ.91


IL-1Ra/IL-10 (Соотношение средних AUC)
25000
20000
15000
10000
5000
0
PO, 1 мг
PO, 5 мг/кг
SC, 0.2 мг/кг
IV, 0.05 мг/кг

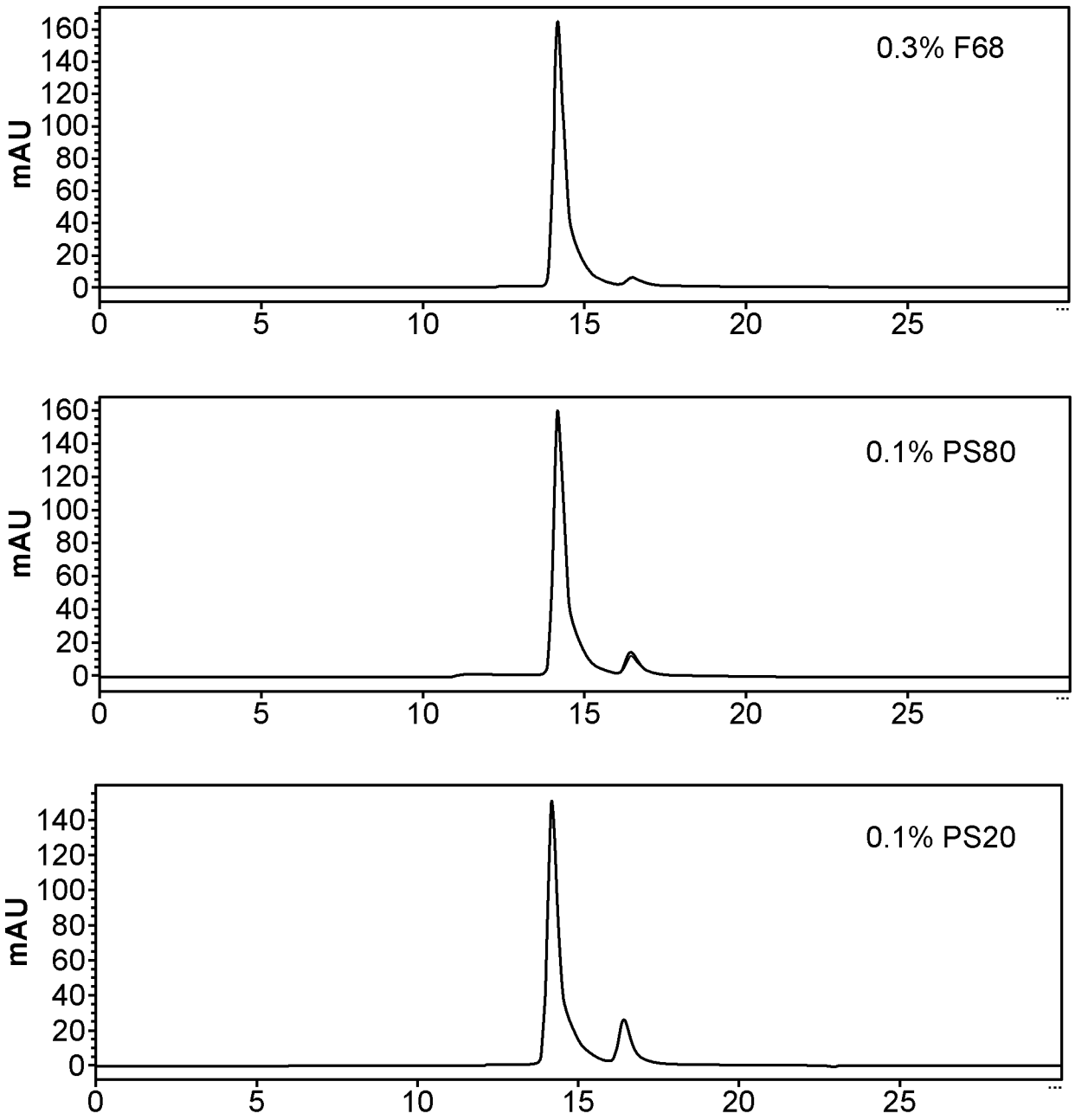
ФИГ.92


Мутность <340-360 нм>
Коэффициент поглощения
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
контроль (без ПАВ)
0.3%F68
0.1% PS80
0.1% PS20
контроль (без ПАВ)
0.3%F68
0.1% PS80
0.1% PS20
до вихревого перемешивания
после вихревого перемешивания

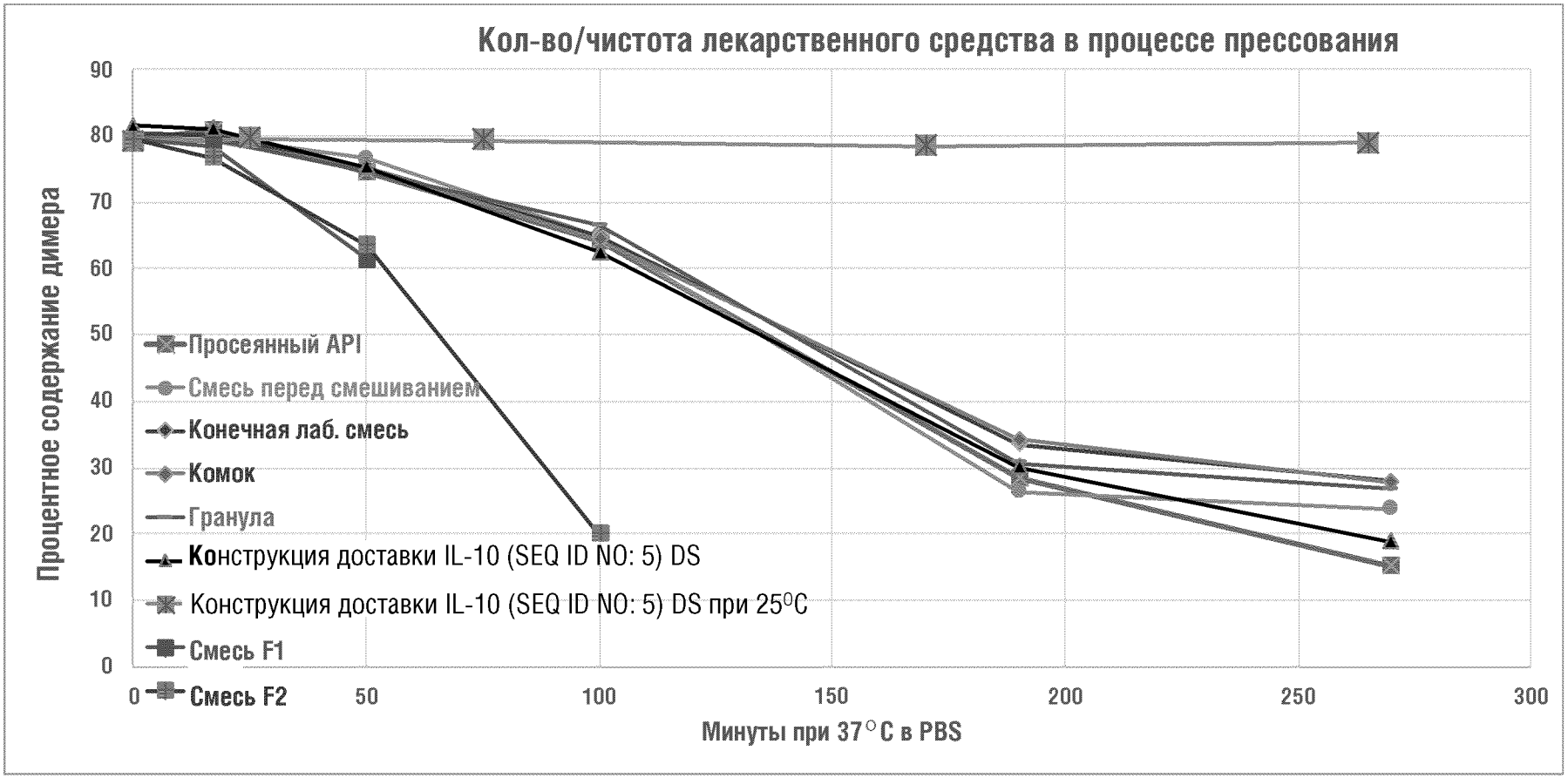
ФИГ.93


Синий: контроль (без ПАВ)
Красный:0.3%F68
Зеленый:0.1% PS80
Пурпурный:0.1% PS20
Димер
Мономер
PS20
PS80
HMW agg
Контроль и F68
PS80
PS20
PS80
mAU

ФИГ.94

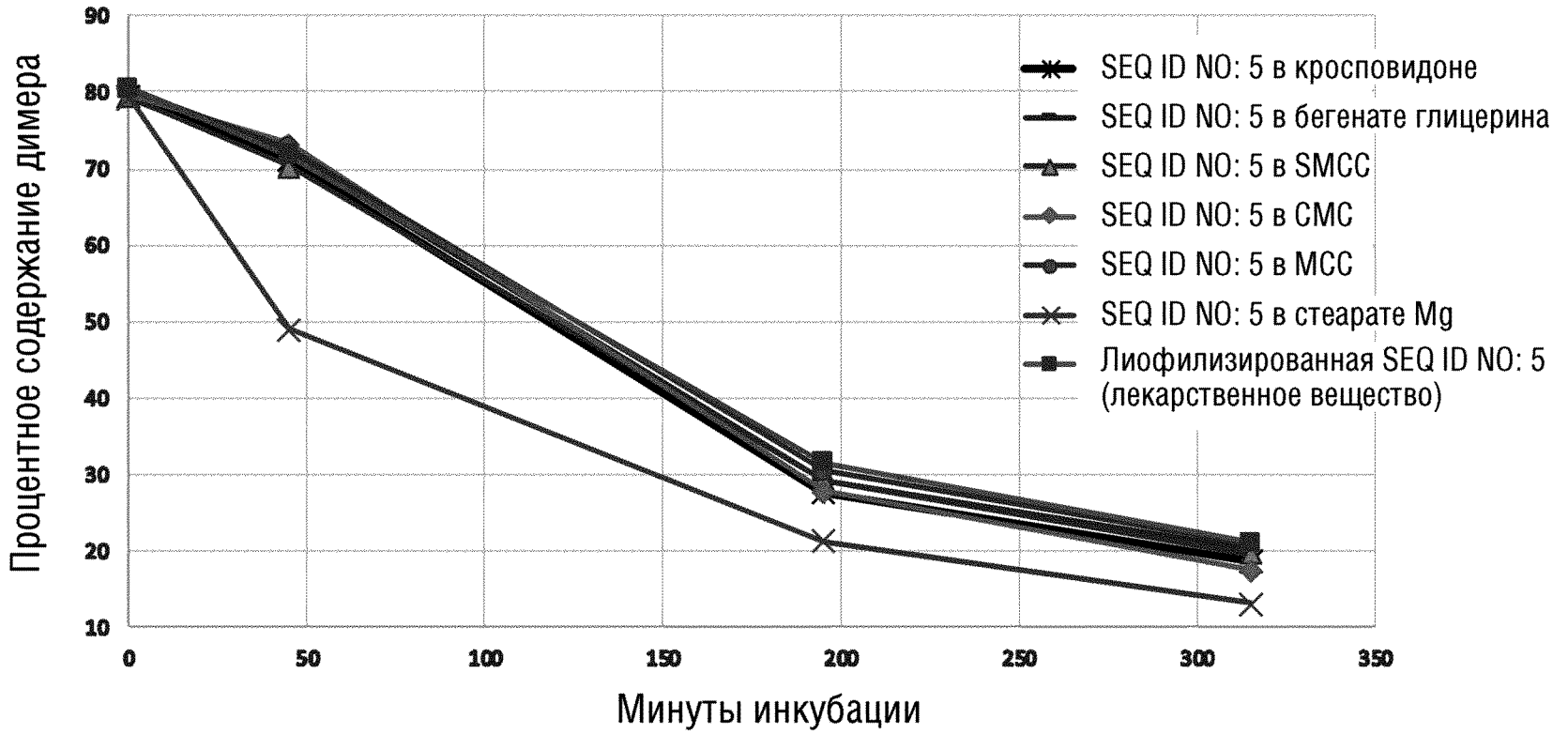


ФИГ.95


Кол-во/чистота лекарственного средства в процессе прессования
Процентное содержание димера
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
300
Минуты при 37°C в PBS
Просеянный API
Смесь перед смешиванием
Конечная лаб. смесь
Комок
Гранула
Конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) DS
Конструкция доставки IL-10 (SEQ ID NO: 5) DS при 25°C
Смесь F1
Смесь F2

ФИГ.96

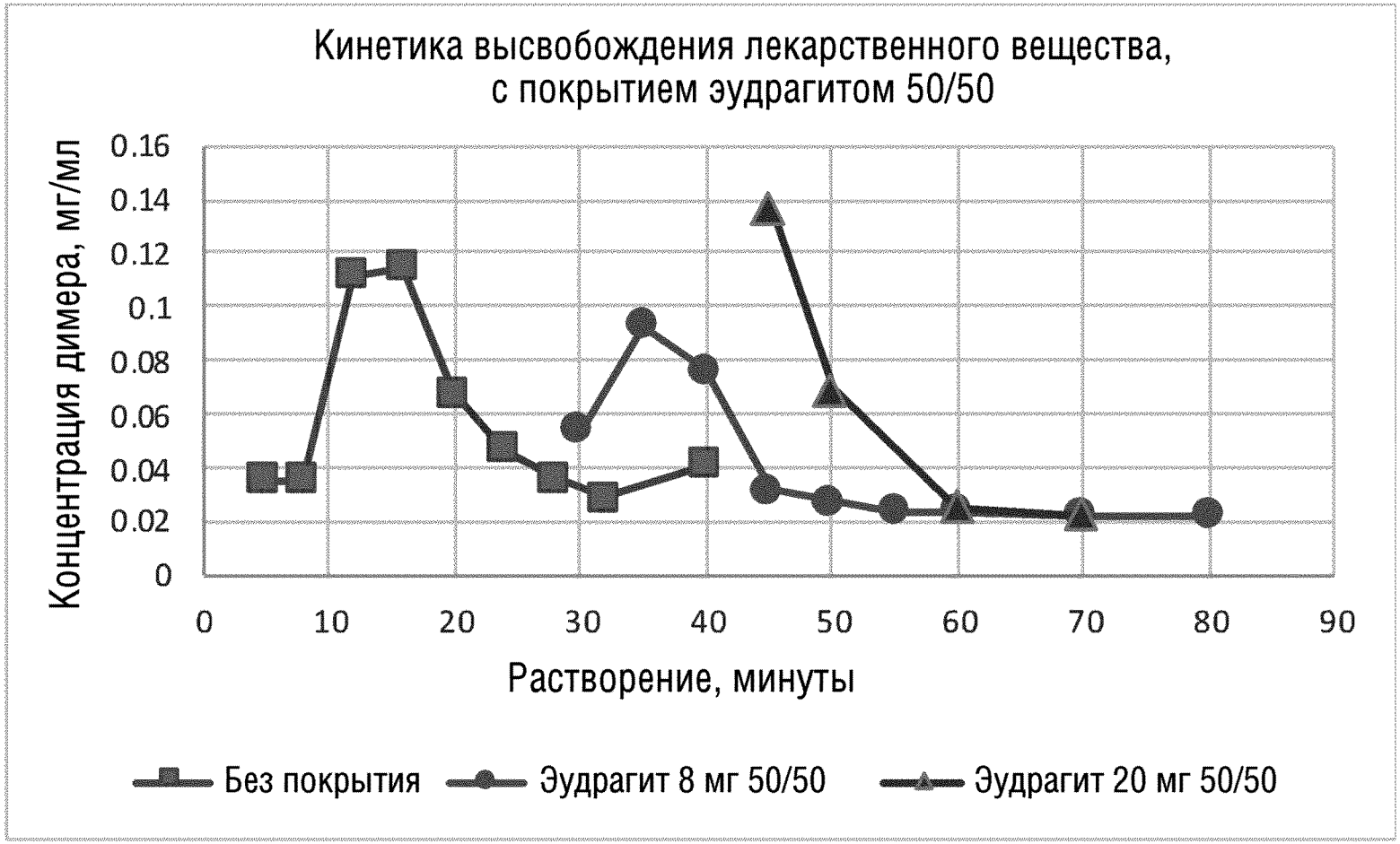
Совместимость раствора вспомогательных средств при таблетировании конструкции доставки IL-1



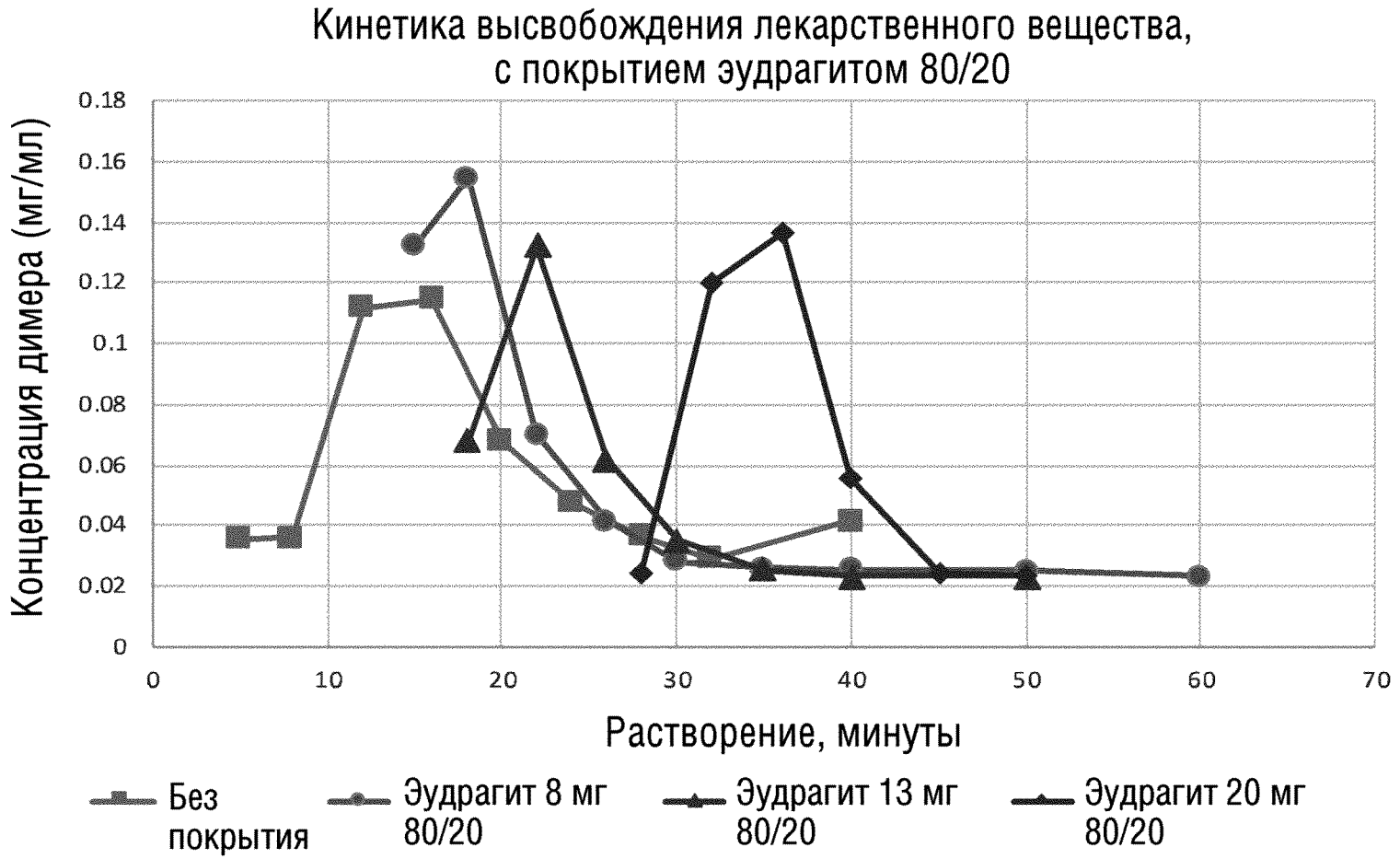
ФИГ.97


Совместимость смазывающего вещества при прессовании конструкции доставки IL-10
Процентное содержание димера
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Минут инкубации
PEG 6K
Стеарилфумарат натрия
Лаурилсульфат натрия
Тальк
Бегенат глицерина
Конструкции доставки IL-10 (SEQID NO: 5) DS

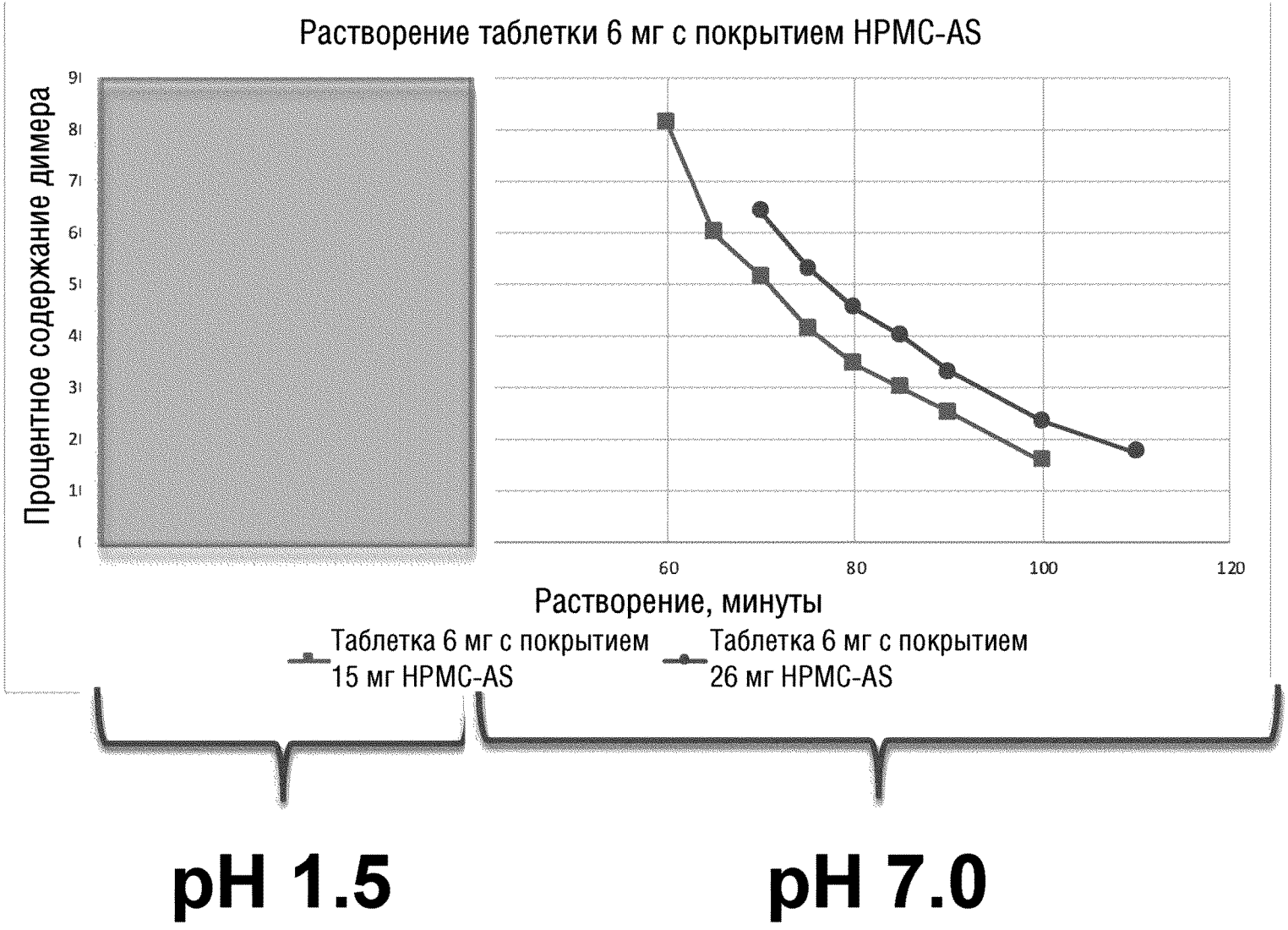
ФИГ.98


Кинетика высвобождения лекарственного вещества,
с покрытием эудрагитом 50/50
Концентрация димера, мг/мл
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Растворение, минуты
Без покрытия
Эудрагит 8 мг 50/50
Эудрагит 20 мг 50/50

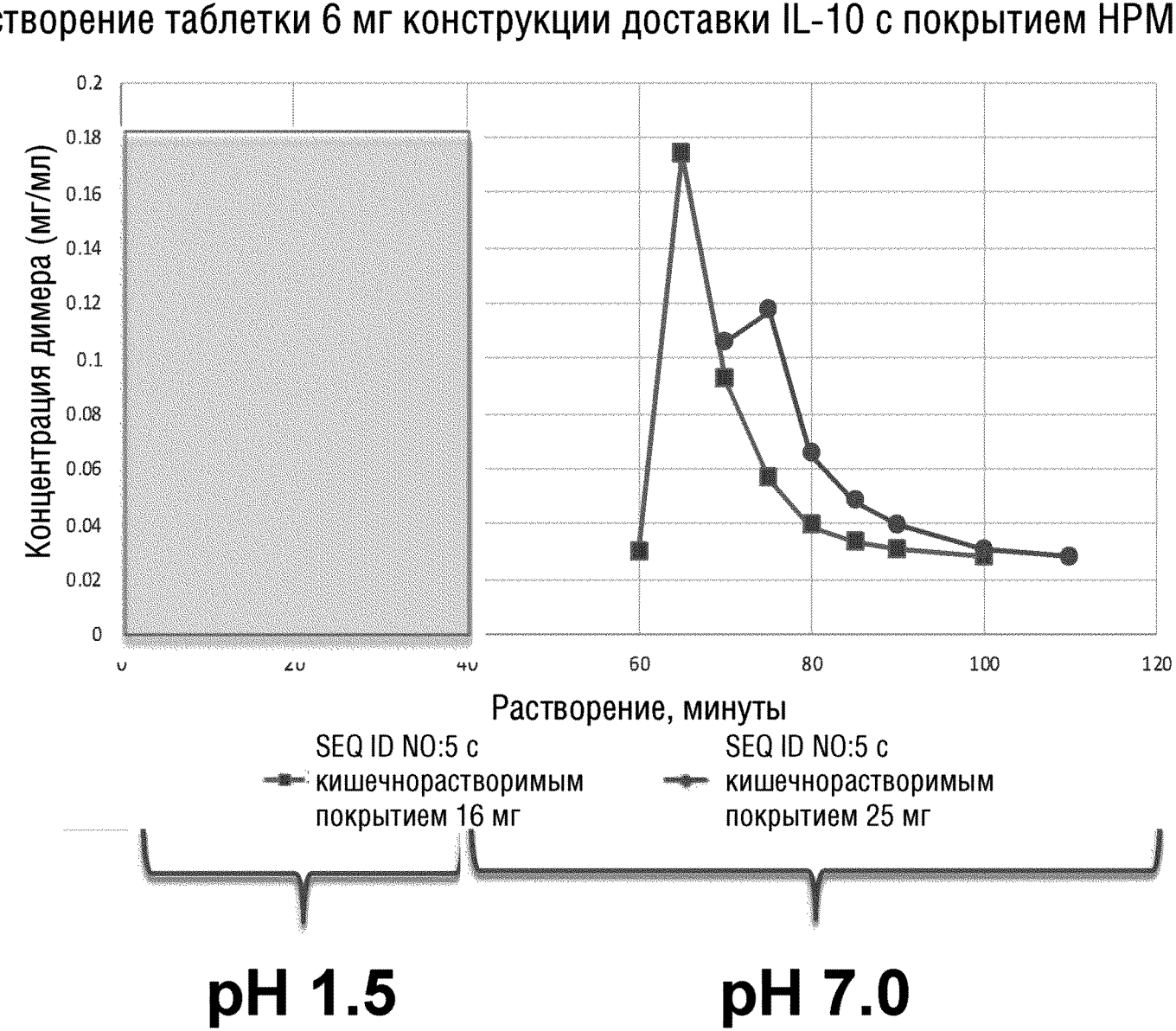
ФИГ.99


Кинетика высвобождения лекарственного вещества,
с покрытием эудрагитом 80/20
Концентрация димера (мг/мл)
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Растворение, минуты
Без покрытия
Эудрагит 8 мг 80/20
Эудрагит 13 мг 80/20
Эудрагит 20 мг 80/20

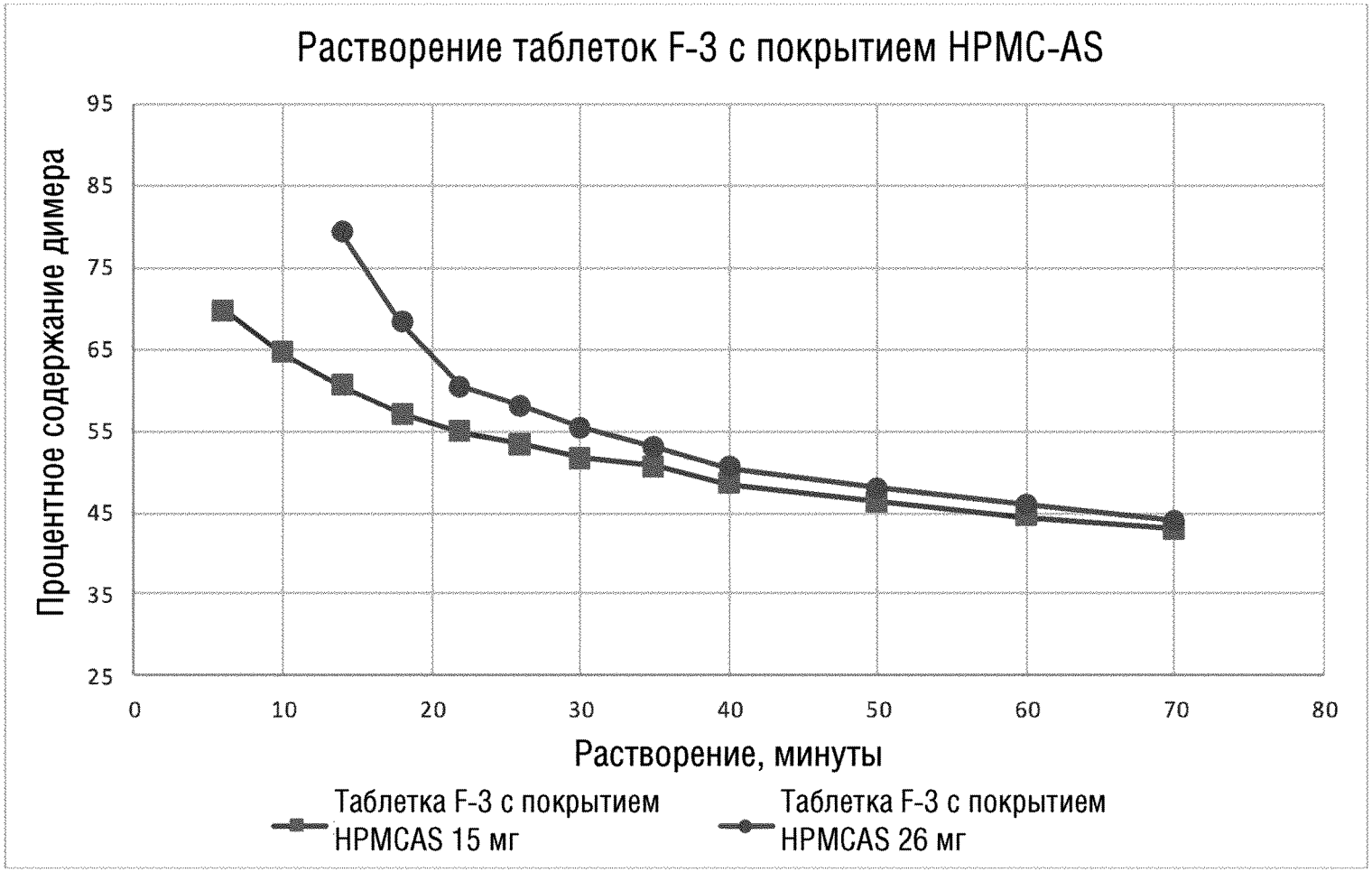
ФИГ.100


Растворение таблетки 6 мг с покрытием HPMC-AS
Процентное содержание димера
60
80
100
120
Растворение, минуты
Таблетка 6 мг с покрытием 15 мг HPMC-AS
Таблетка 6 мг с покрытием 26 мг HPMC-AS
pH 1.5
pH 7.0

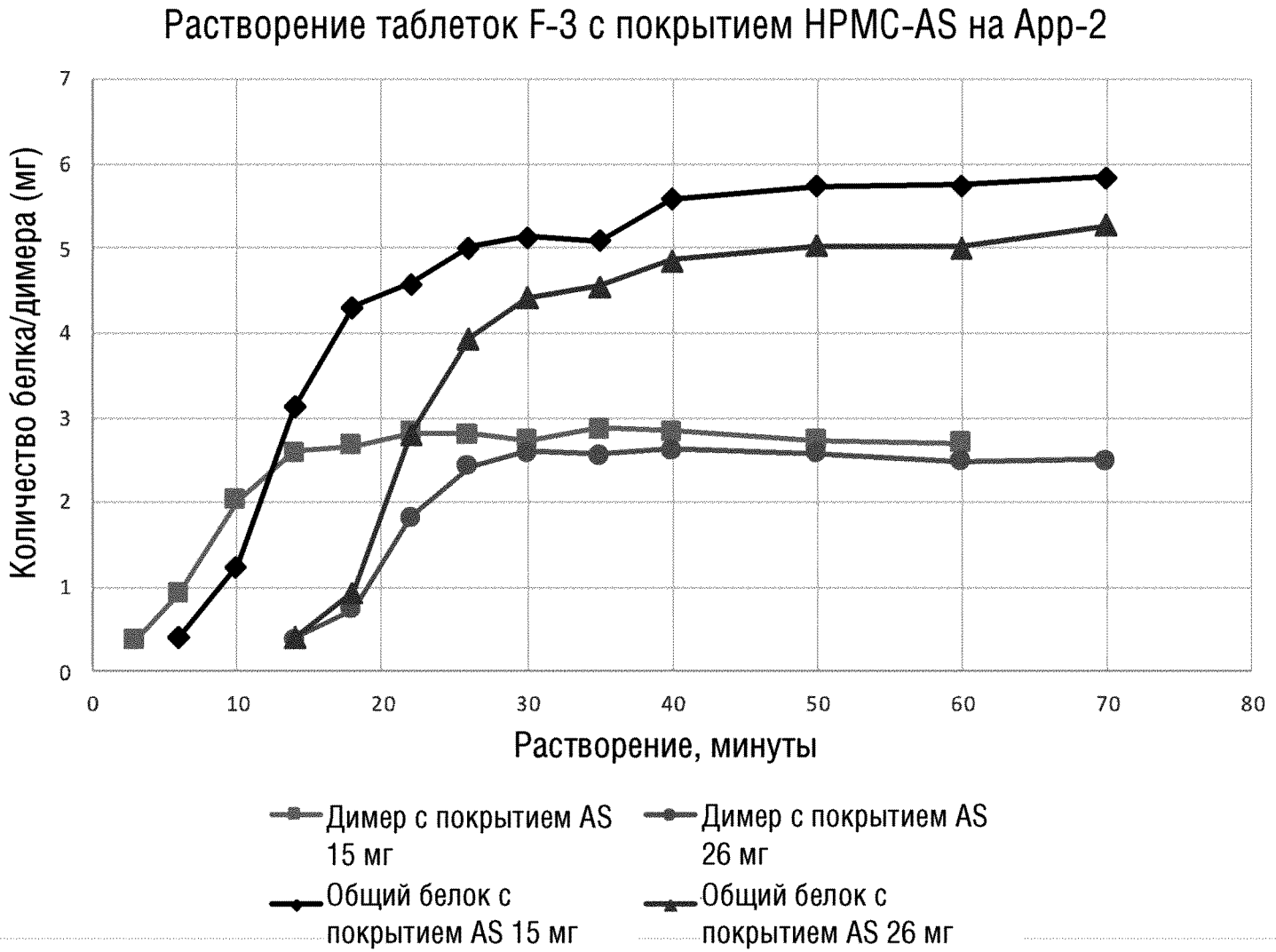
ФИГ.101


Растворение таблетки 6 мг конструкции доставки IL-10 с покрытием HPMC-AS
Концентрация димера (мг/мл)
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
20
40
60
80
100
120
Растворение, минуты
SEQ ID NO:5 с кишечнорастворимым покрытием 16 мг
SEQ ID NO:5 с кишечнорастворимым покрытием 25 мг
pH 1.5
pH 7.0

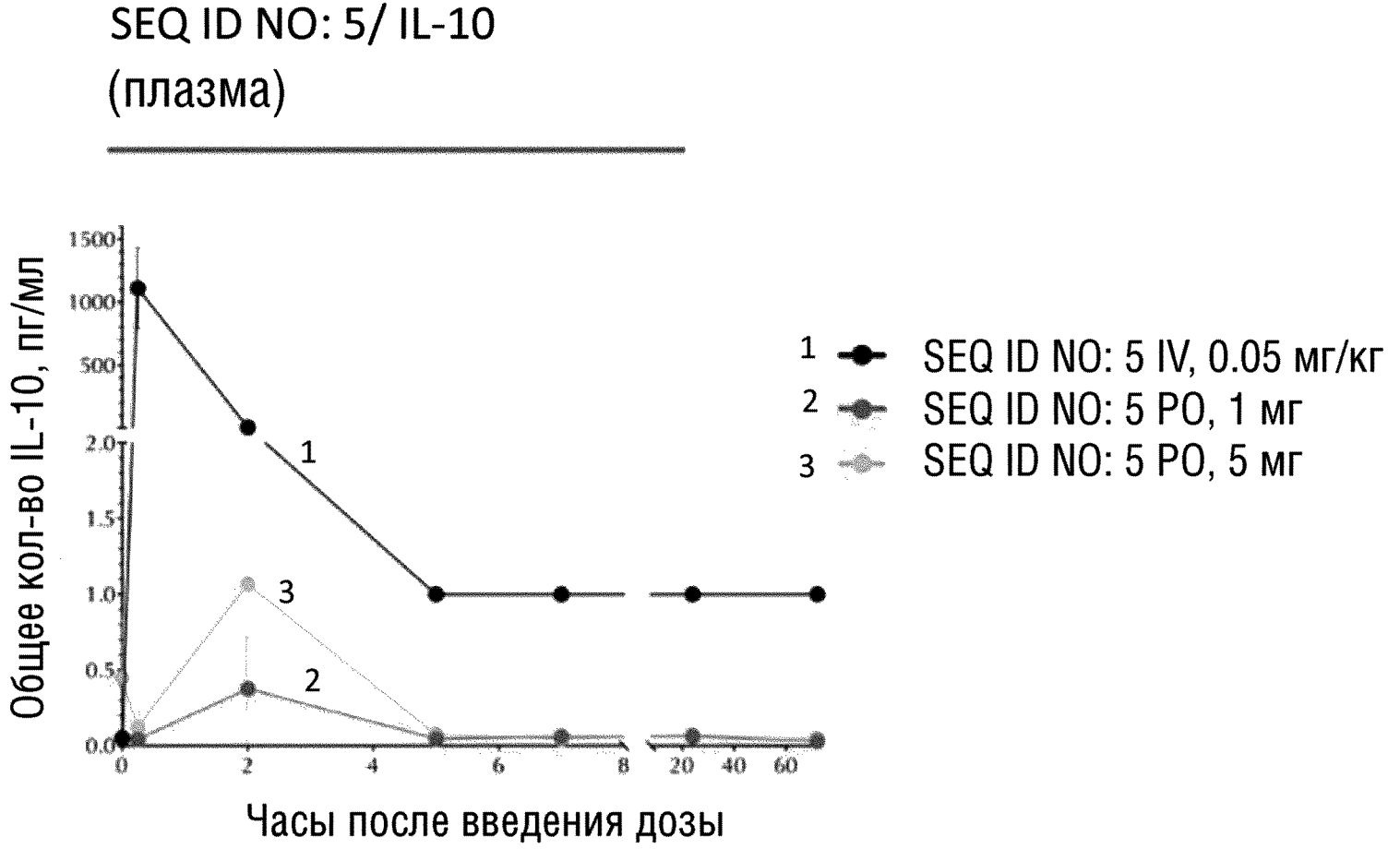
ФИГ.102


Растворение таблеток F-3 с покрытием HPMC-AS
Процентное содержание димера
95
85
75
65
55
45
35
25
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Растворение, минуты
Таблетка F-3 с покрытием HPMCAS 15 мг
Таблетка F-3 с покрытием HPMCAS 26 мг

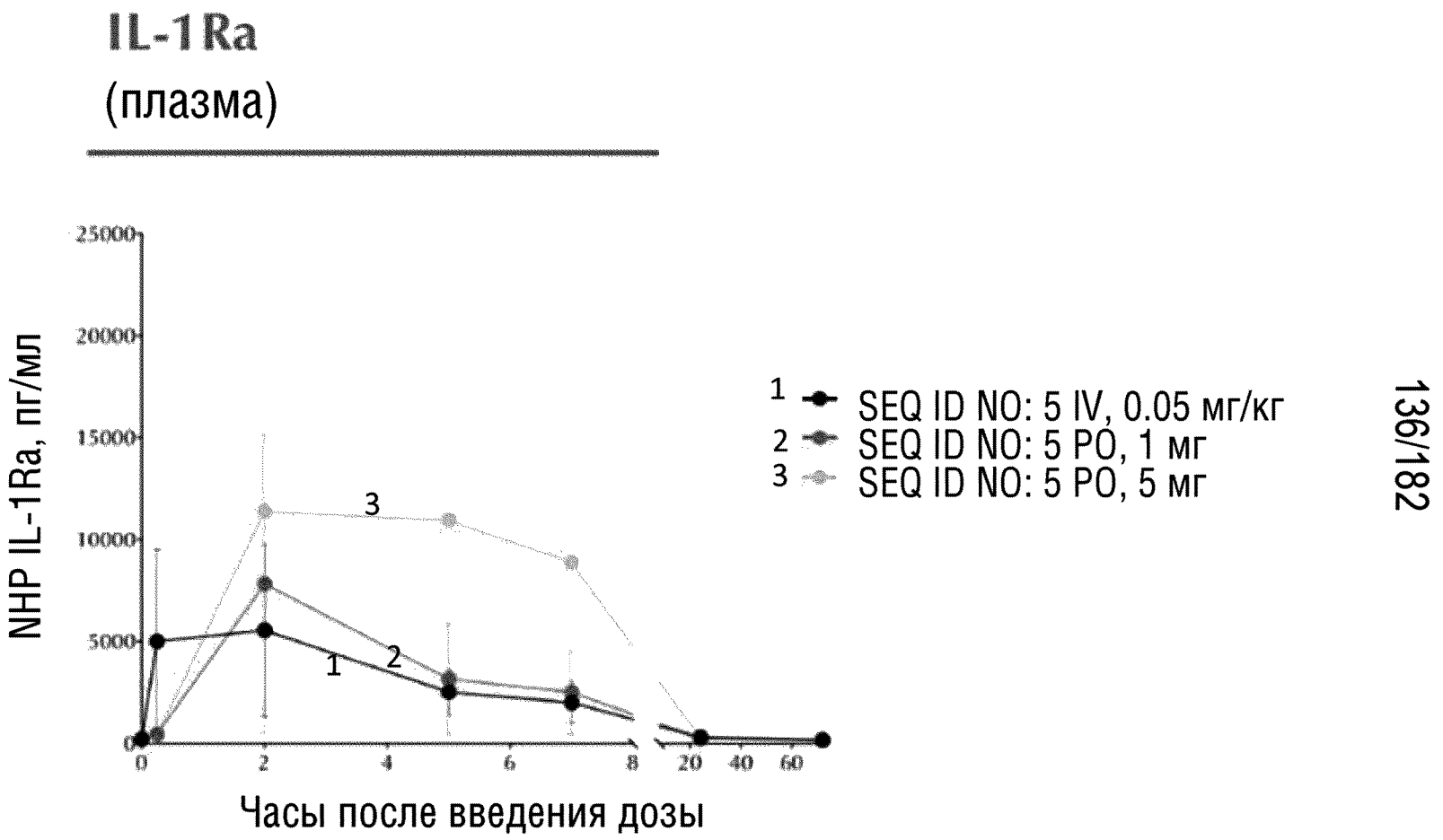
ФИГ.103


Растворение таблеток F-3 с покрытием HPMC-AS на App-2
Количество белка/димера (мг)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Растворение, минуты
Димер с покрытием AS 15 мг
Димер с покрытием AS 26 мг
Общий белок с покрытием AS 15 мг
Общий белок с покрытием AS 26 мг

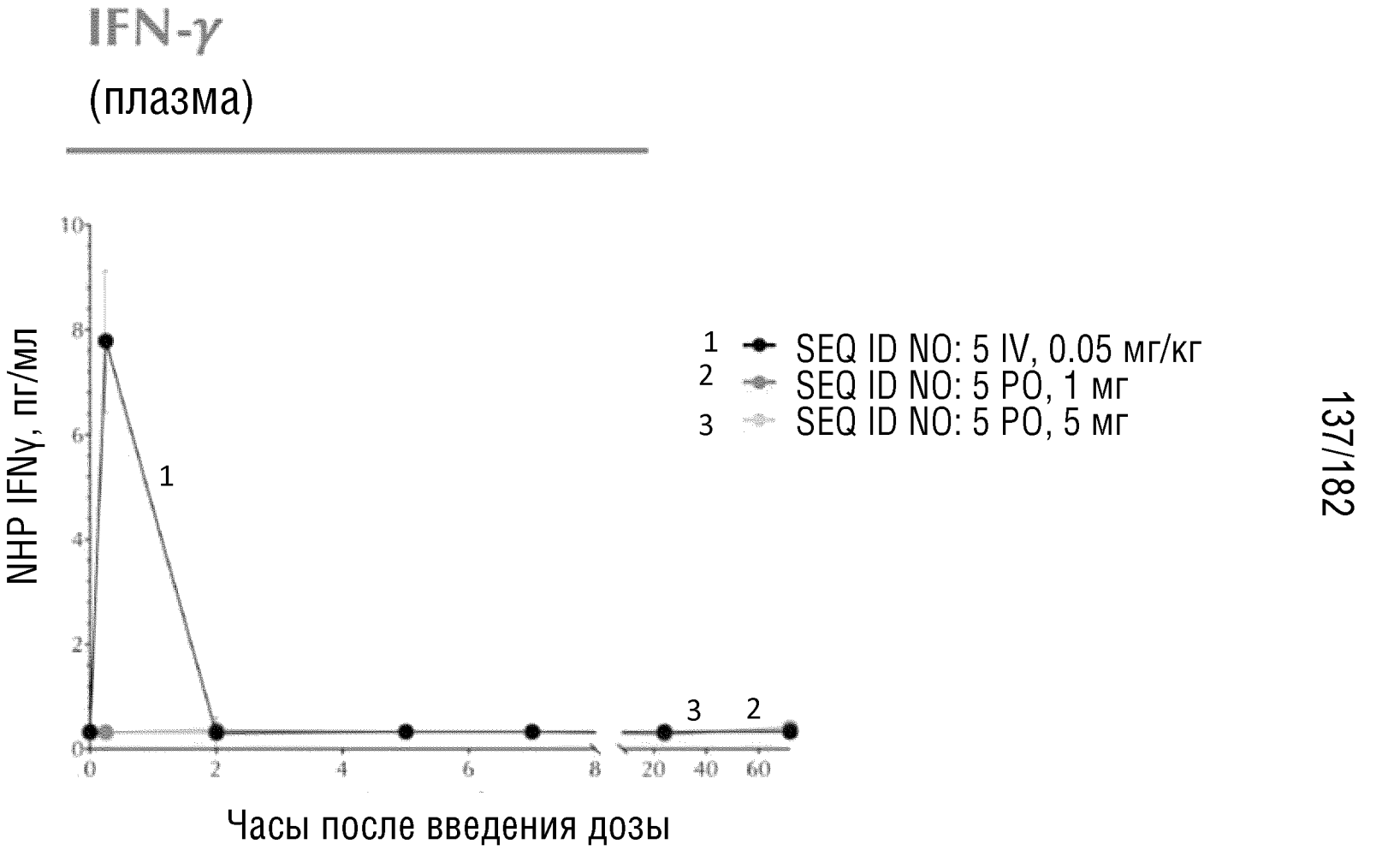
ФИГ.104А


SEQ ID NO: 5/ IL-10
(плазма)
Общее кол-во IL-10, пг/мл
1500
1000
500
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
20
40
60
1
2
3
Часы после введения дозы
1 SEQ ID NO: 5 IV, 0.05 мг/кг
2 SEQ ID NO: 5 PO, 1 мг
3 SEQ ID NO: 5 PO, 5 мг

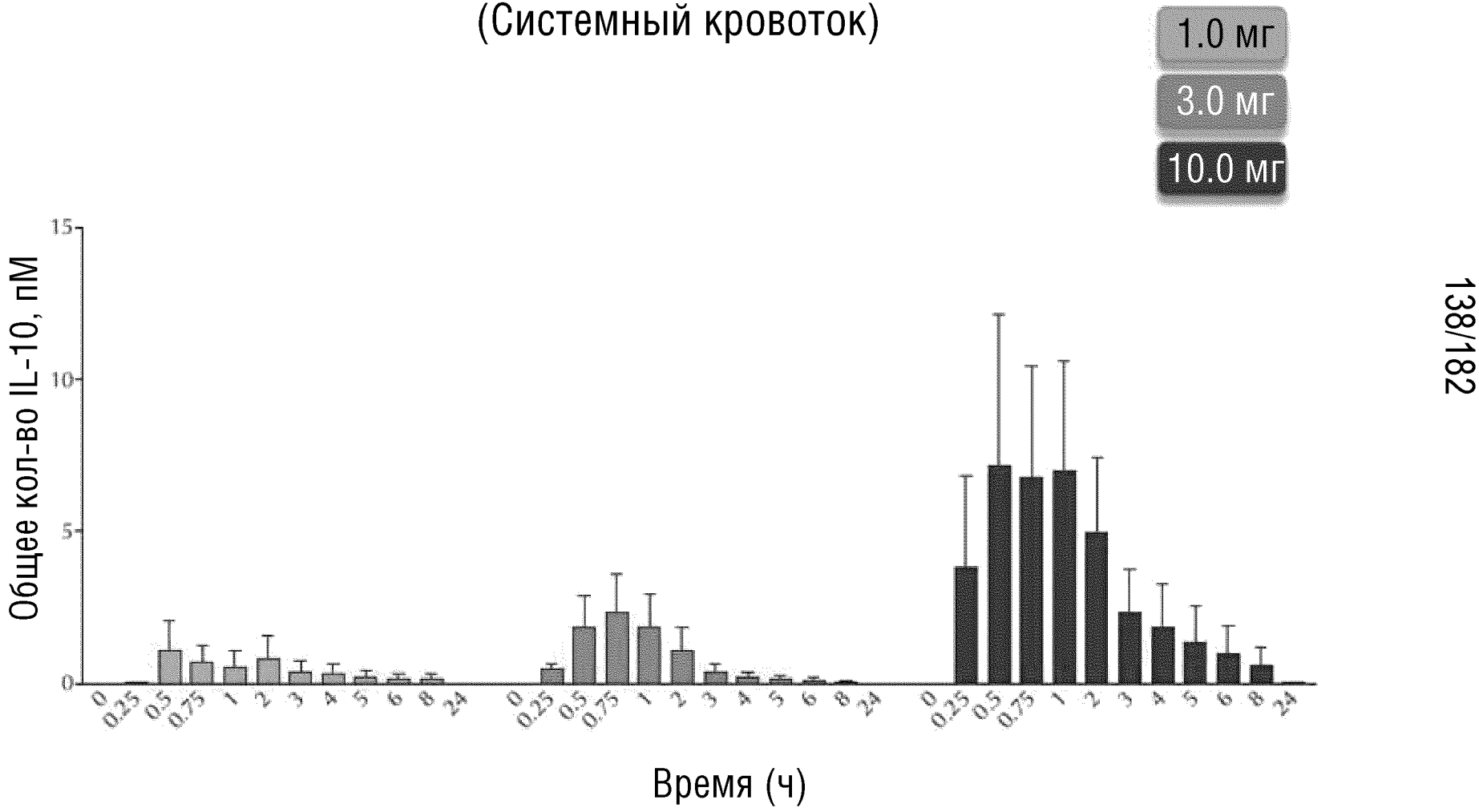
ФИГ.104B


IL-1Ra
(плазма)
NHP IL-1Ra, пг/мл
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
20
40
60
Часы после введения дозы
1
2
3
1 SEQ ID NO: 5 IV, 0.05 мг/кг
2 SEQ ID NO: 5 PO, 1 мг
3 SEQ ID NO: 5 PO, 5 мг

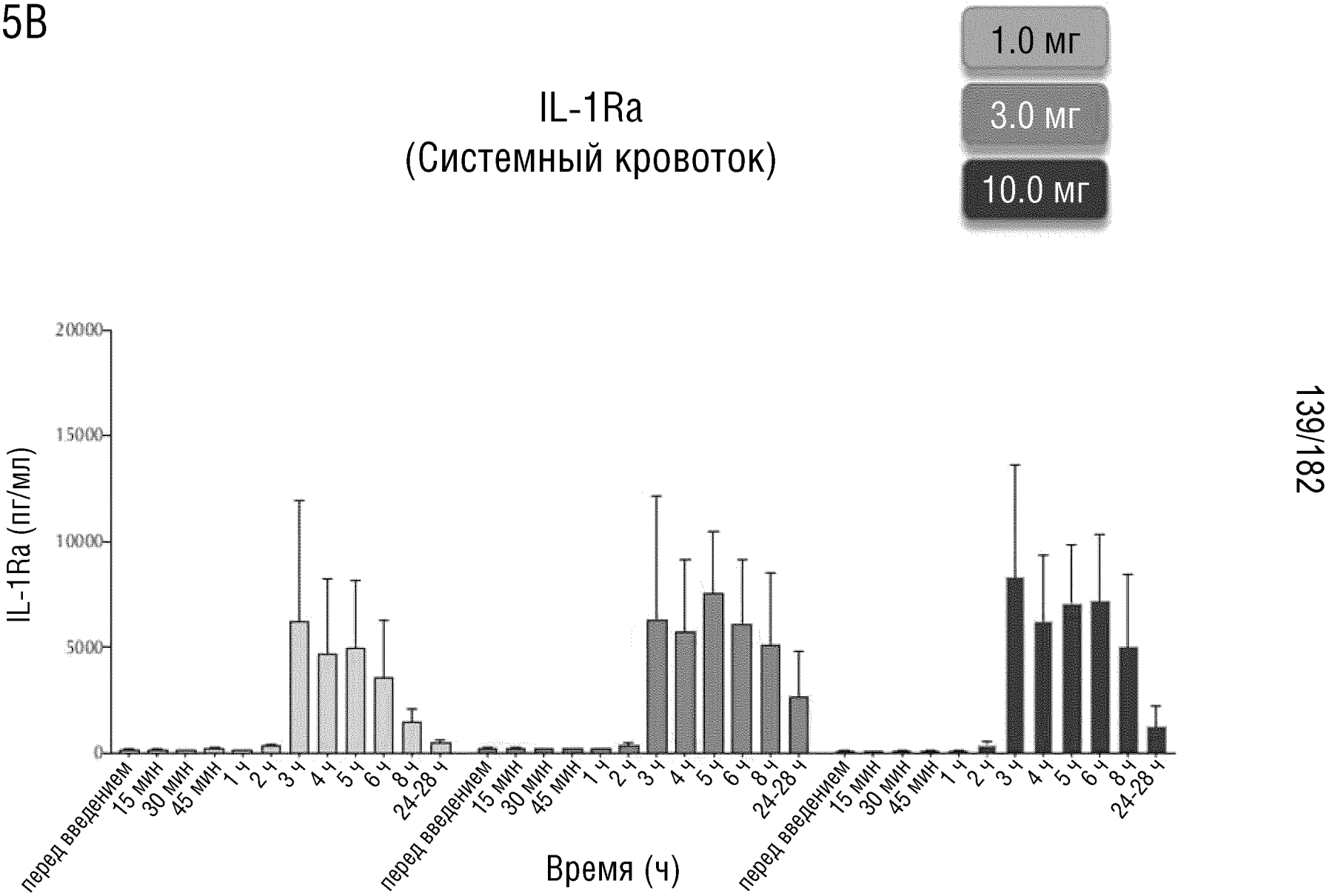
ФИГ.104C


IFN-γ
(плазма)
NHP IFNγ, пг/мл
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
8
20
40
60
1
2
3
1 SEQ ID NO: 5 IV, 0.05 мг/кг
2 SEQ ID NO: 5 PO, 1 мг
3 SEQ ID NO: 5 PO, 5 мг
Часы после введения дозы

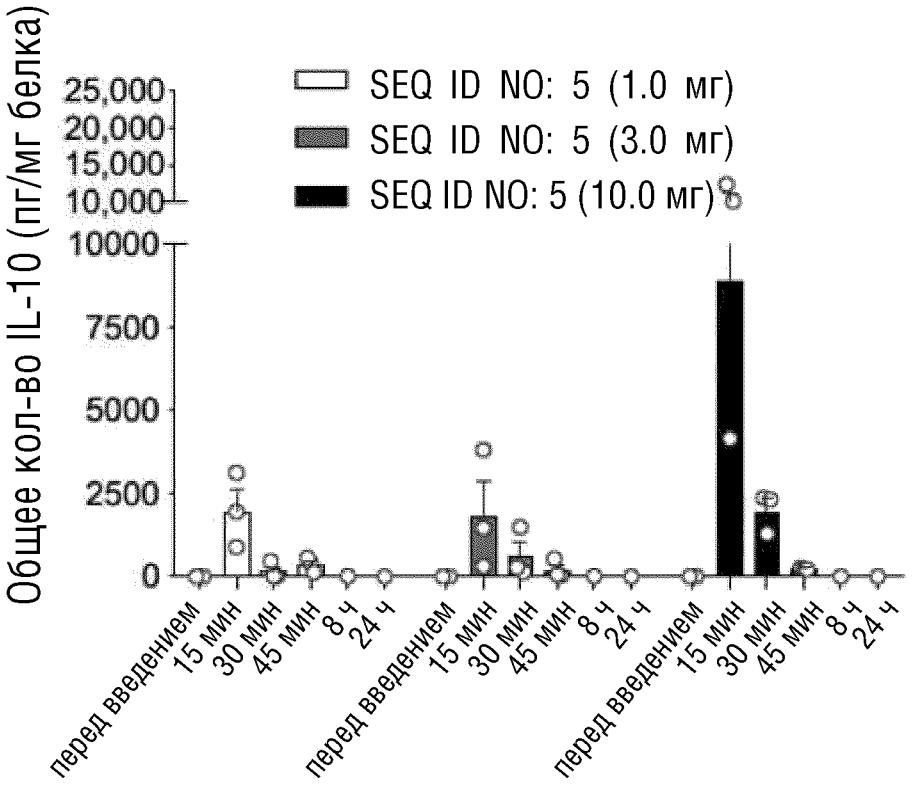
ФИГ.105А


Общее кол-во IL-10
(Системный кровоток)
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг
Общее кол-во IL-10, пМ
15
10
5
0
0
0.25
0.5
0.75
1
2
3
4
5
6
8
24
Время (ч)

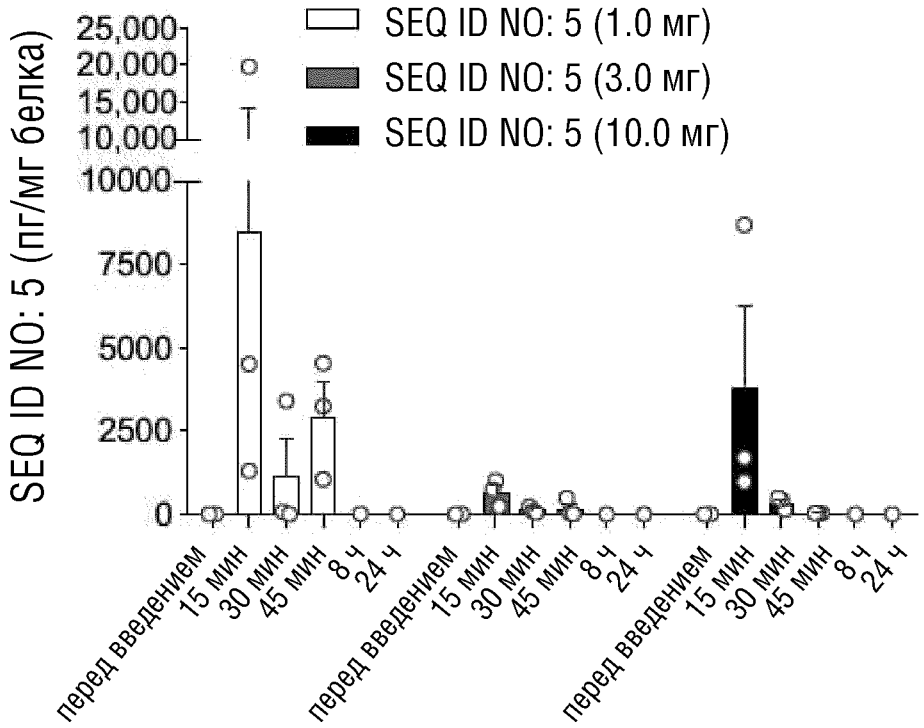
ФИГ.105B


1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг
IL-1Ra
(Системный кровоток)
IL-1Ra (пг/мл)
20000
15000
10000
5000
0
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
1 ч
2 ч
3 ч
4 ч
5 ч
6 ч
8 ч
24-28 ч
Время (ч)

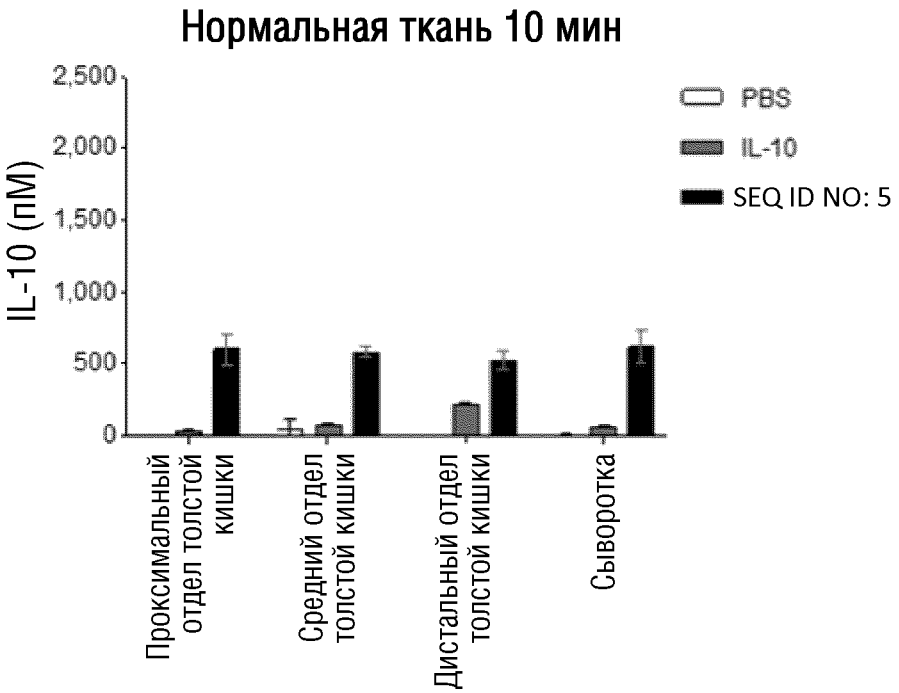
ФИГ.105C



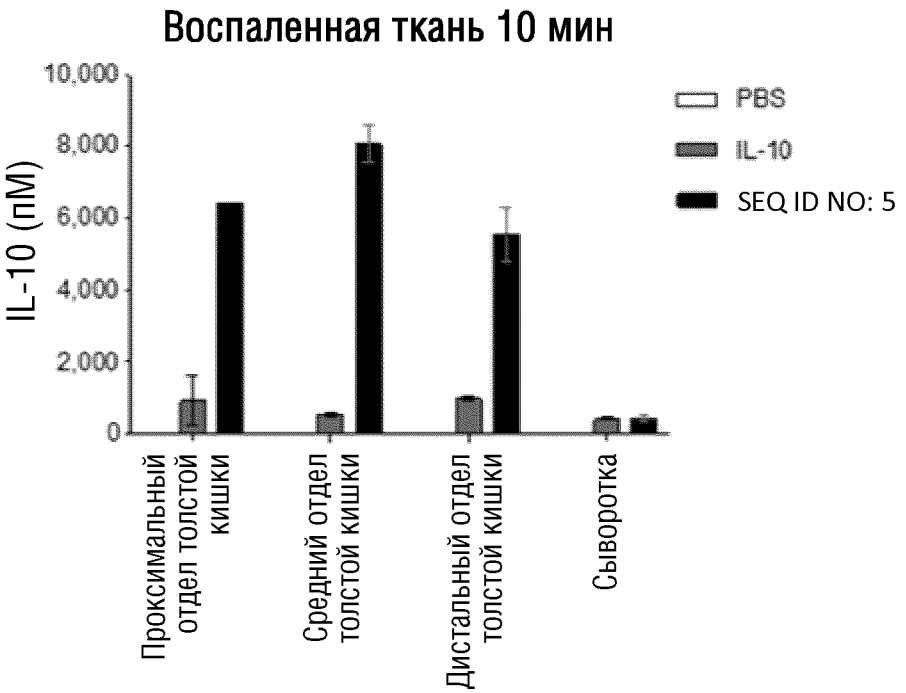
ФИГ.105D



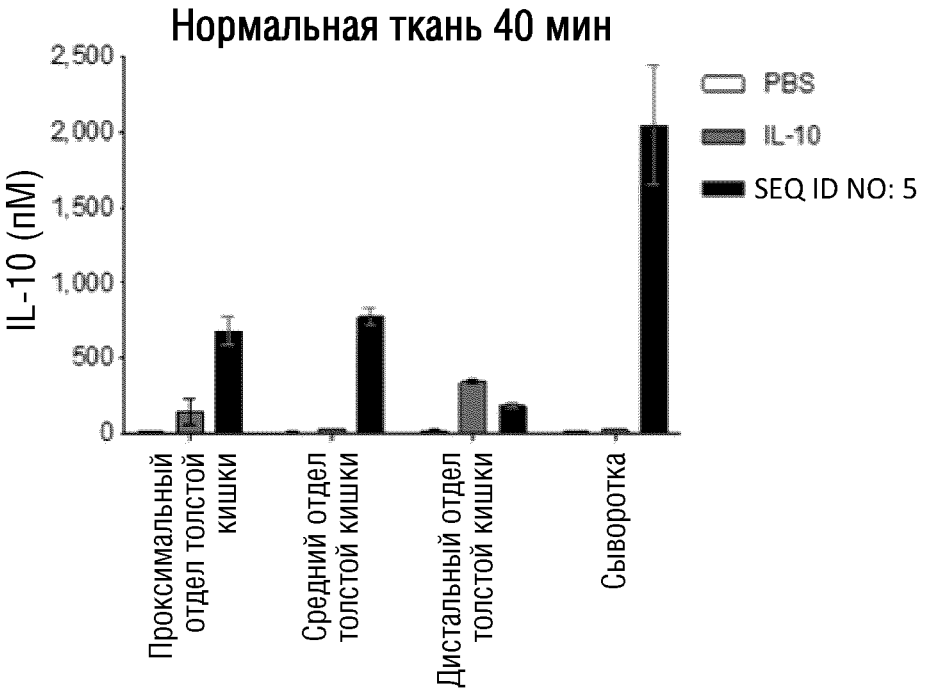
ФИГ.106А



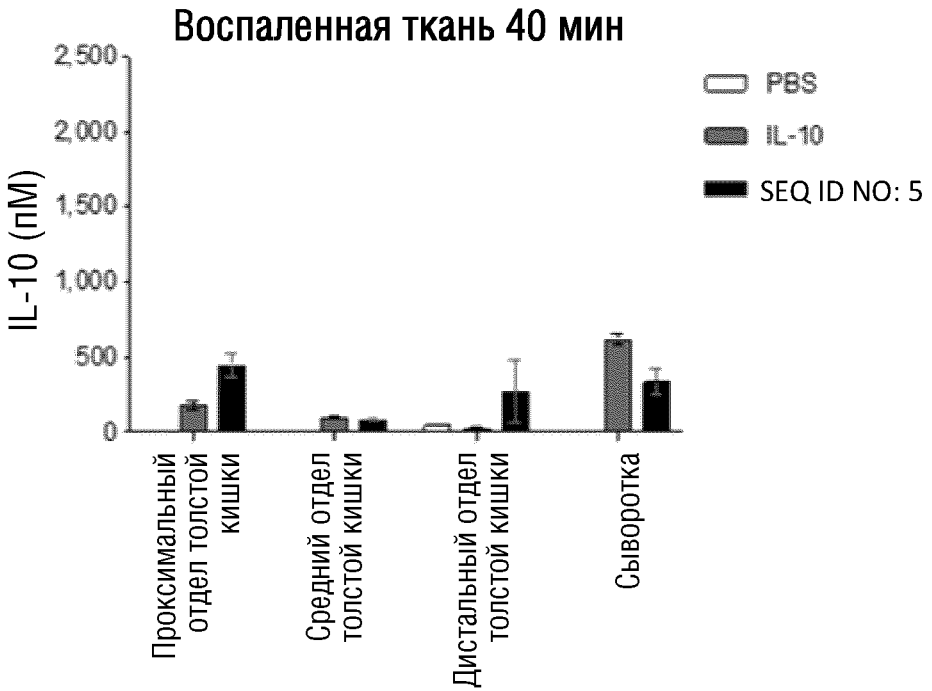
ФИГ.106В



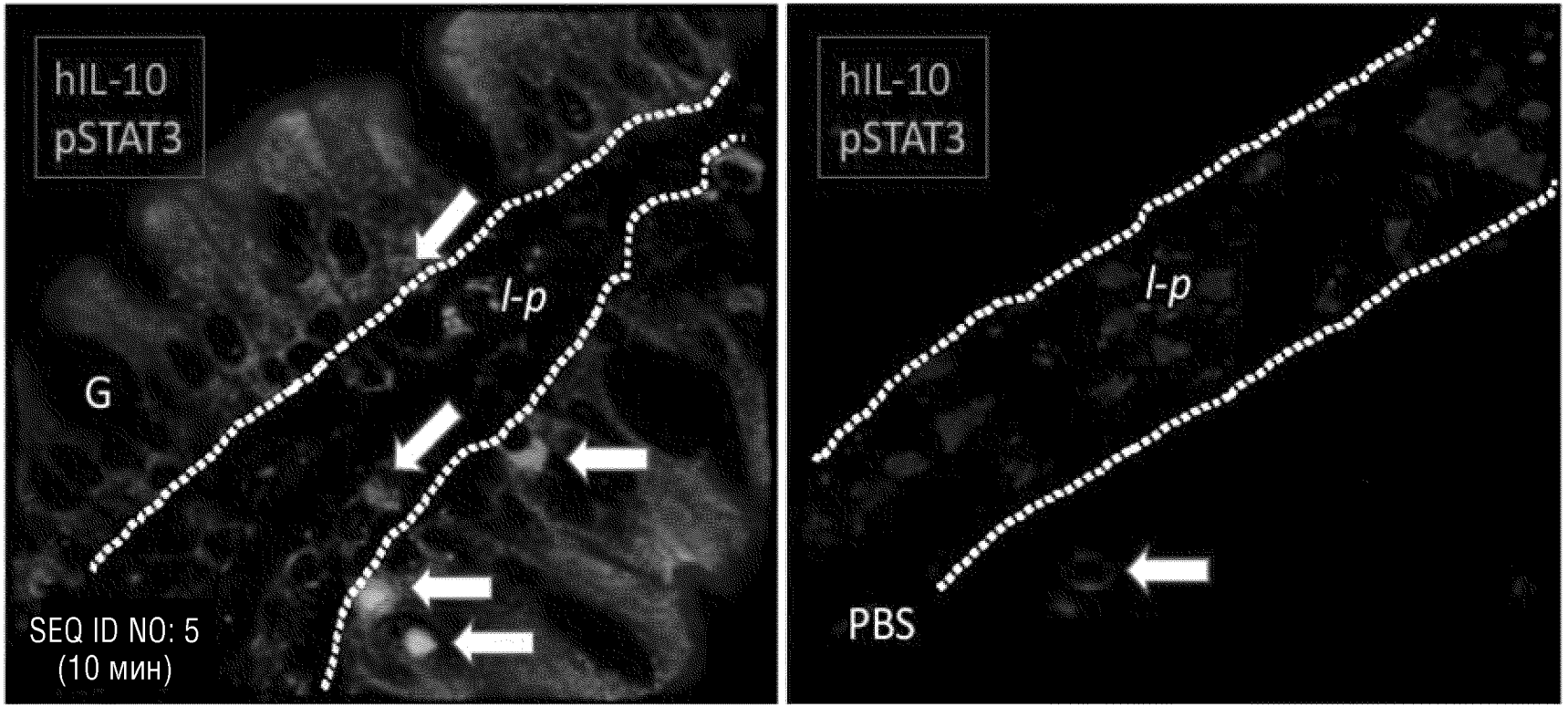
ФИГ.106C



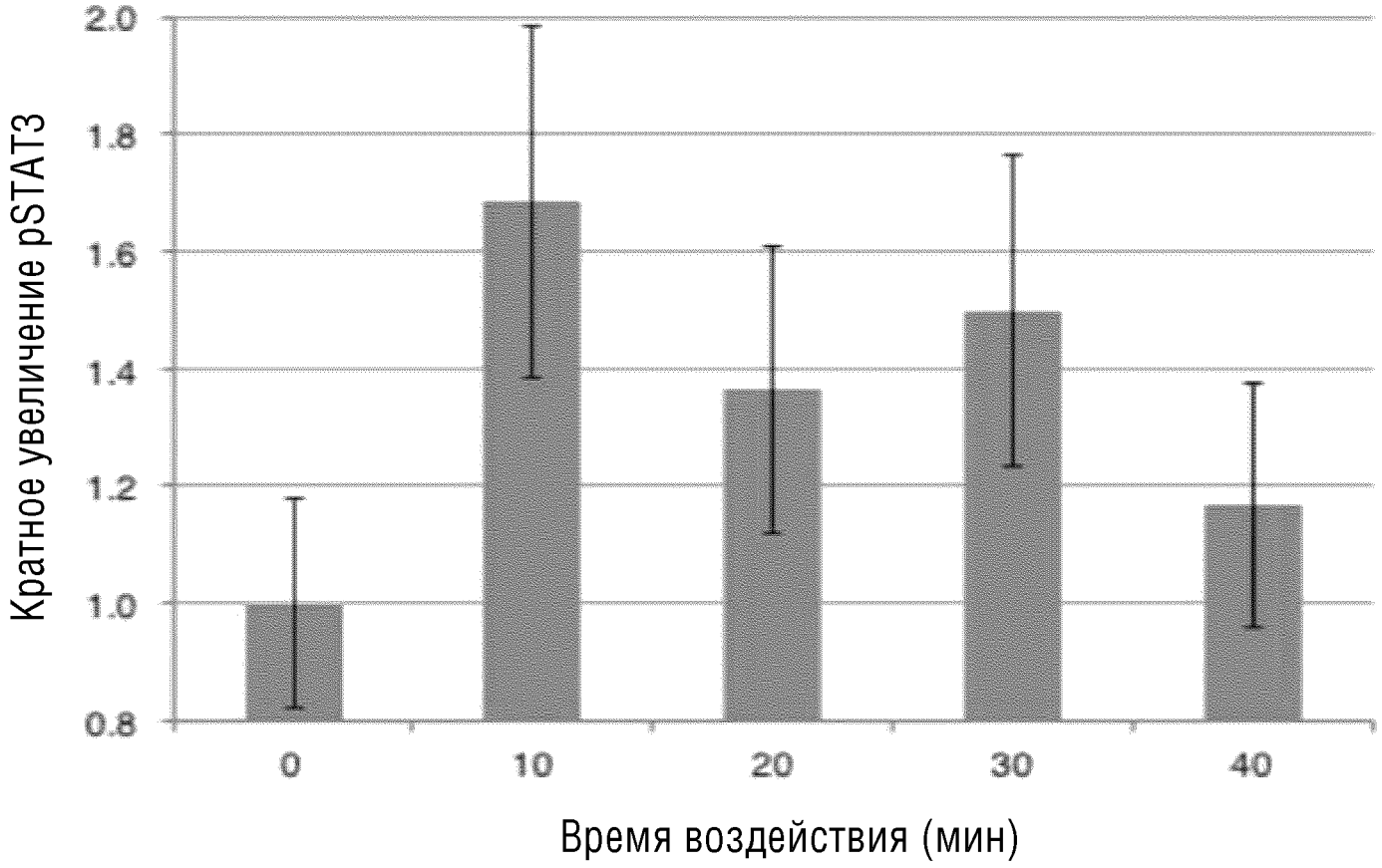
ФИГ.106D



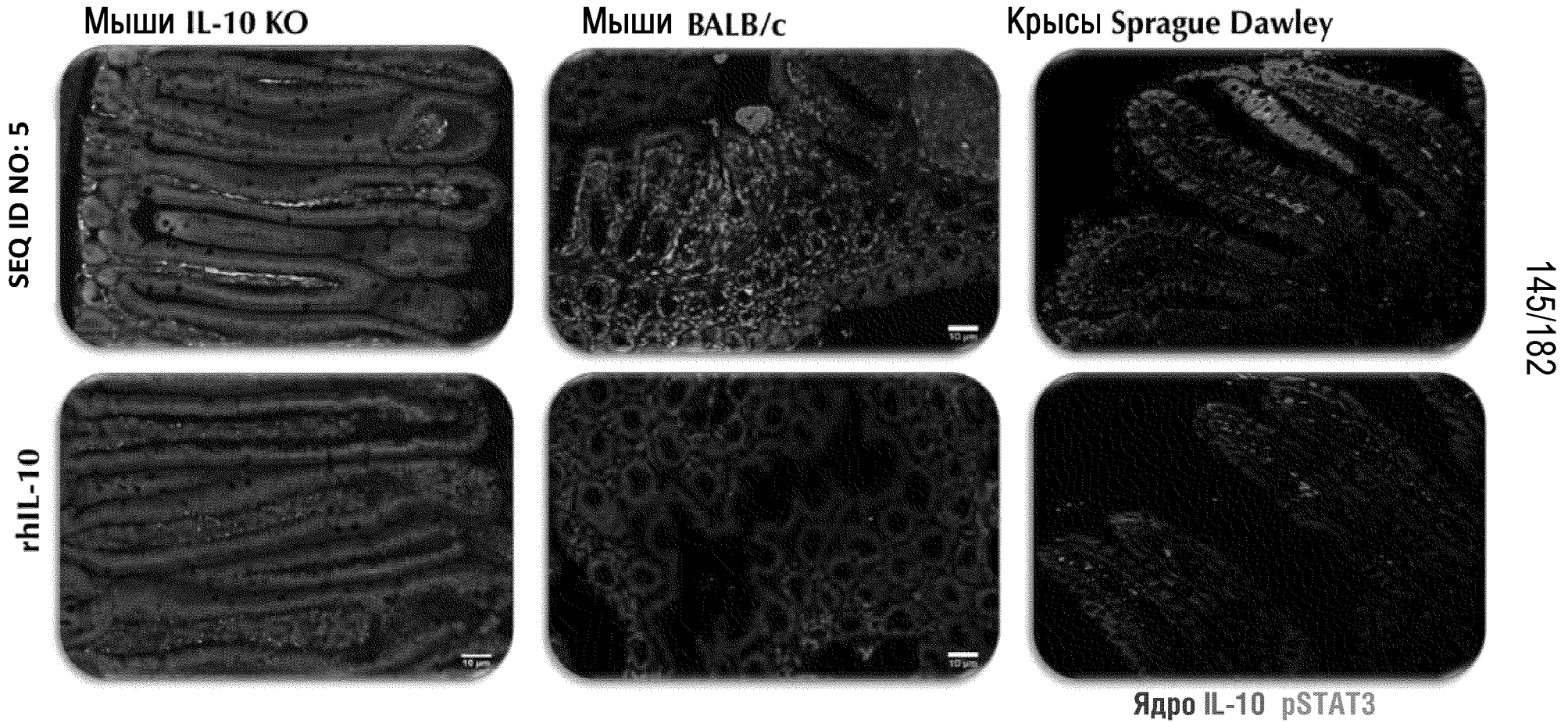
ФИГ.107



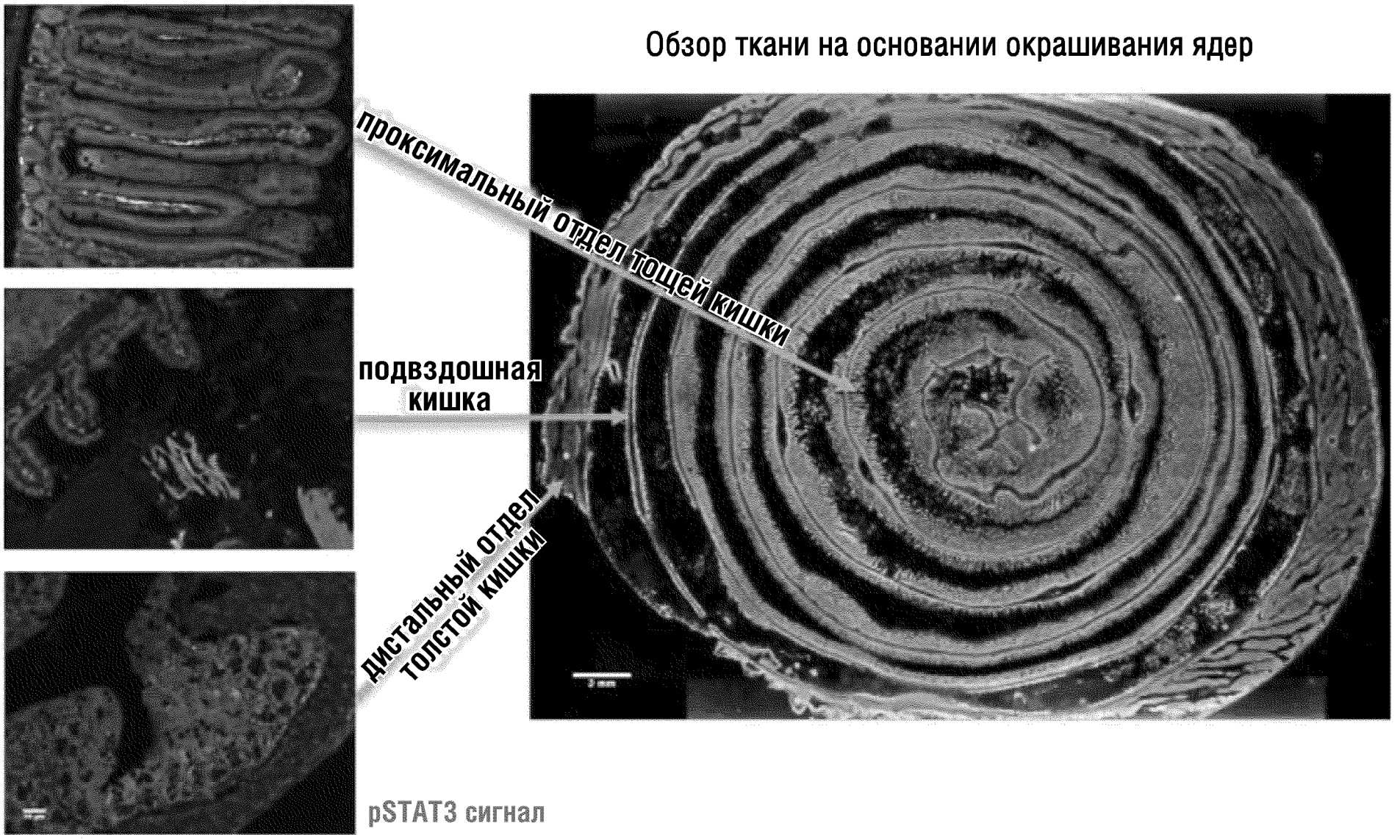
ФИГ.108


2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
Кратное увеличение pSTAT3
0
10
20
30
40
Время воздействия (мин)

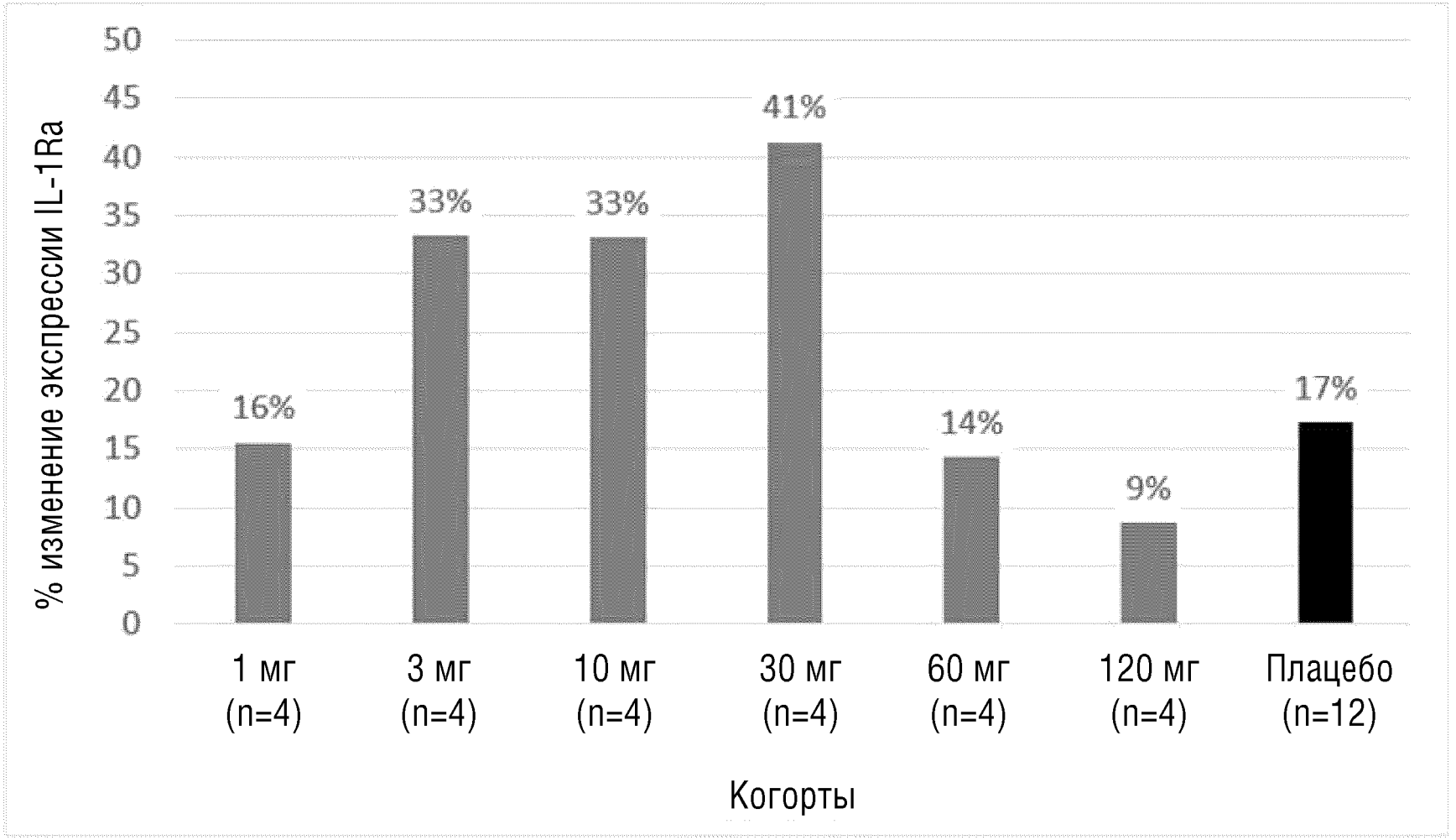
ФИГ.109


Мыши IL-10 KO
Мыши BALB/c
Крысы Sprague Dawley
SEQ ID NO: 5
rhIL-10
Ядро IL-10 pSTAT3

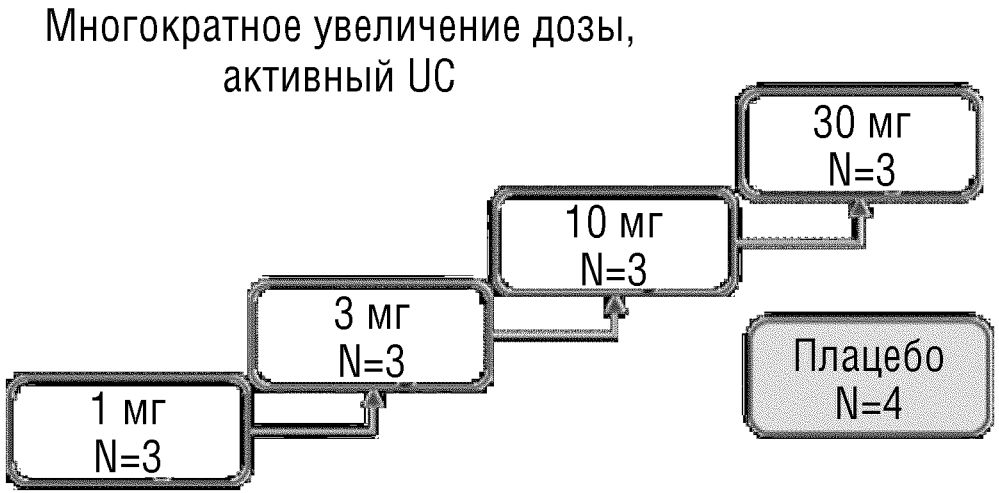
ФИГ.110


Обзор ткани на основании окрашивания ядер
проксимальный отдел тощей кишки
подвздошная кишка
дистальный отдел толстой кишки
pSTAT3 сигнал

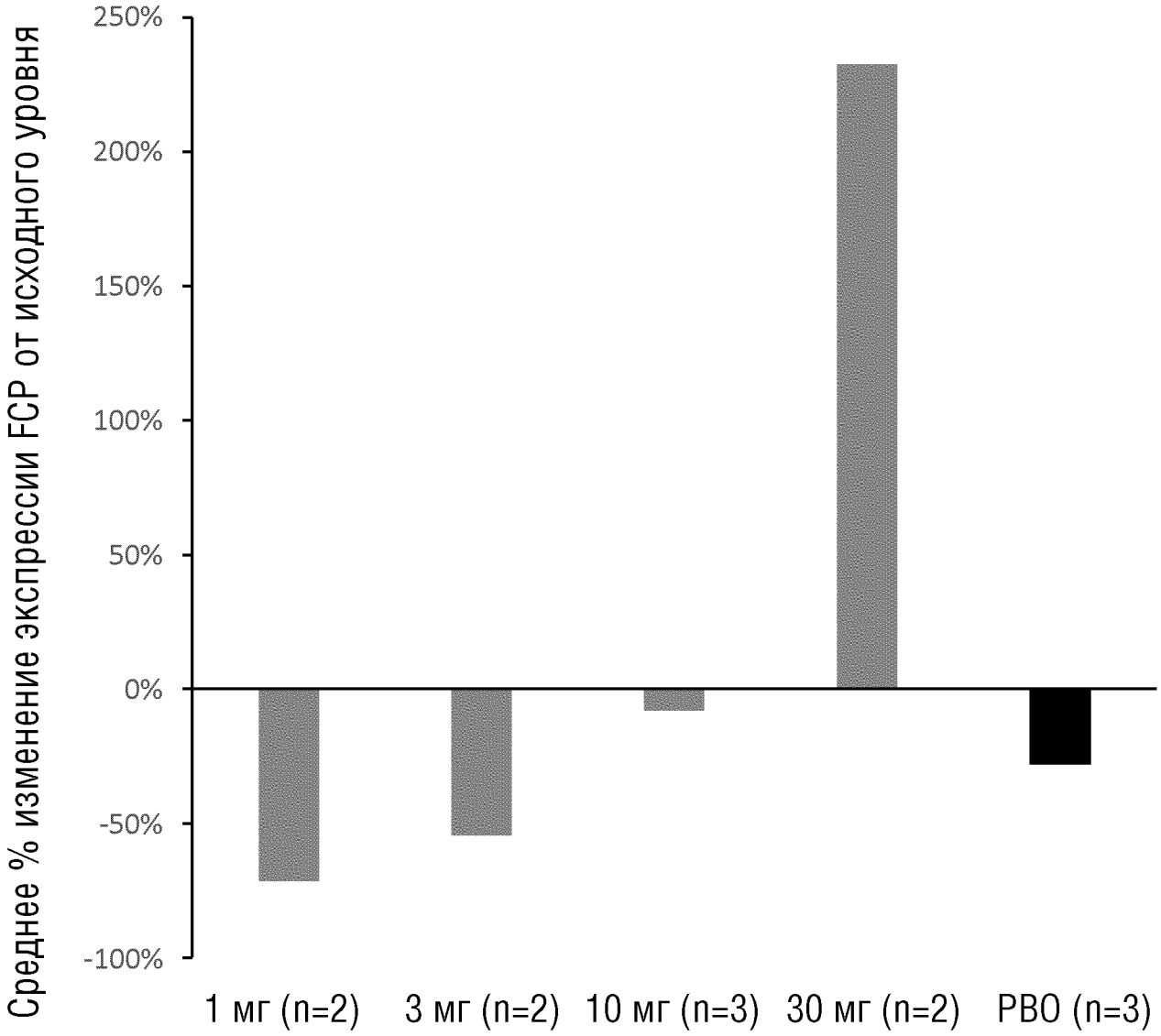
ФИГ.111


% изменение экспрессии IL-1Ra
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
16%
33%
33%
41%
14%
9%
17%
1 мг (n=4)
3 мг (n=4)
10 мг (n=4)
30 мг (n=4)
60 мг (n=4)
120 мг (n=4)
Плацебо (n=12)
Когорты

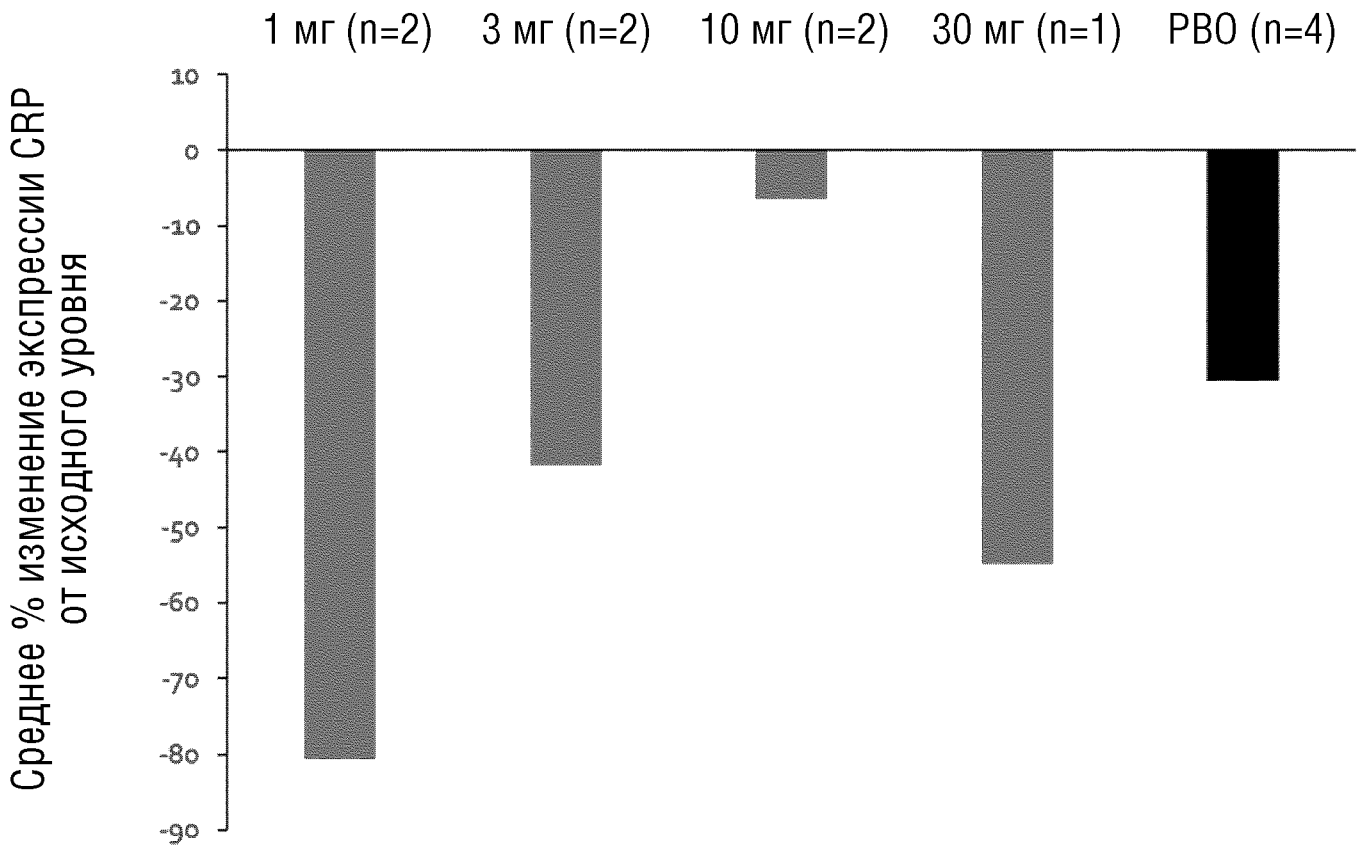
ФИГ.112


Многократное увеличение дозы,
активный UC
30 мг
N=3
10 мг
N=3
3 мг
N=3
1 мг
N=3
Плацебо
N=4

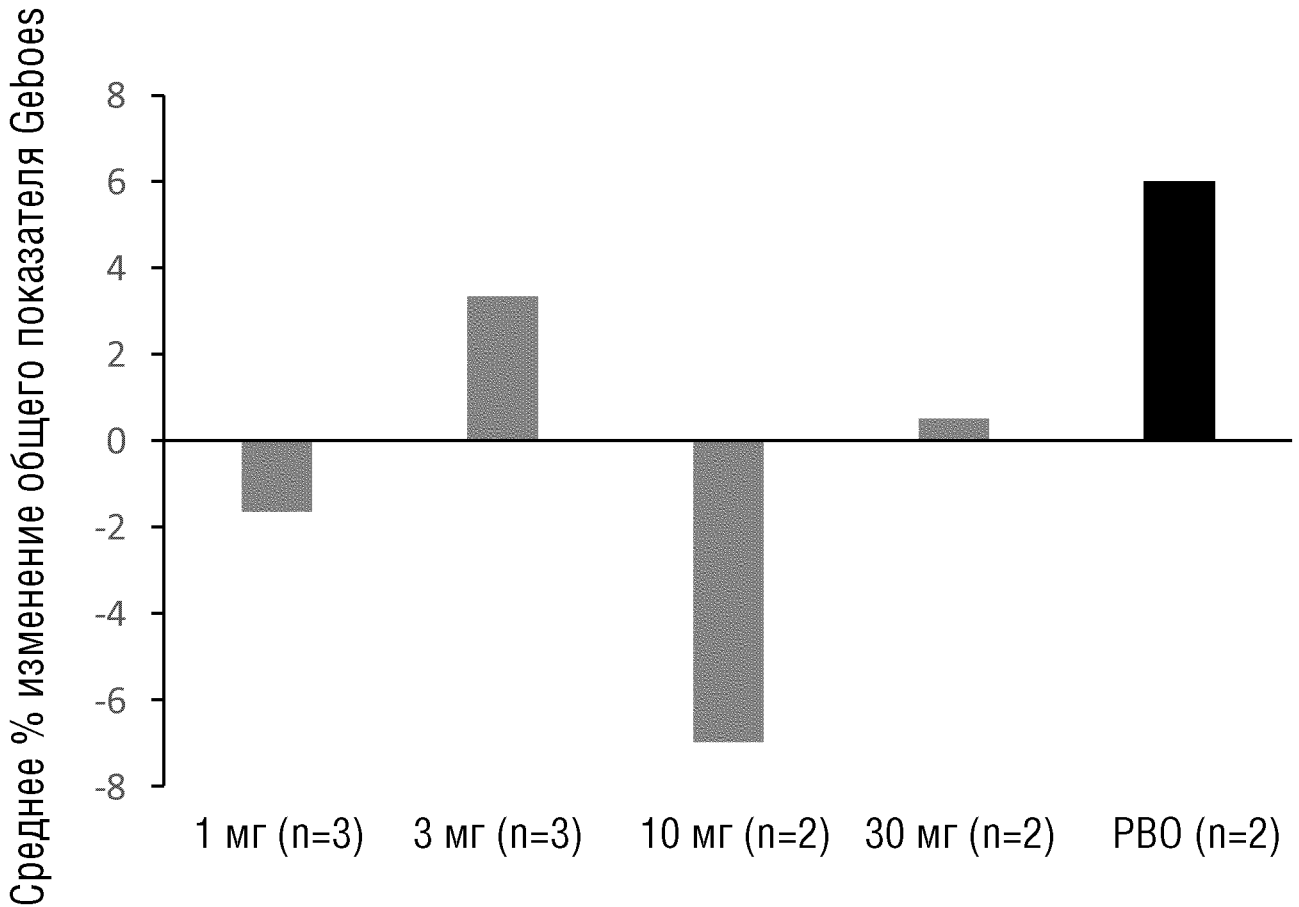
ФИГ.113


Среднее % изменение экспрессии FCP от исходного уровня
250%
200%
150%
100%
50%
0%
-50%
-100%
1 мг (n=2)
3 мг (n=2)
10 мг (n=3)
30 мг (n=2)
PBO (n=3)

ФИГ.114


1 мг (n=2)
3 мг (n=2)
10 мг (n=2)
30 мг (n=1)
PBO (n=4)
Среднее % изменение экспрессии CRP от исходного уровня
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90

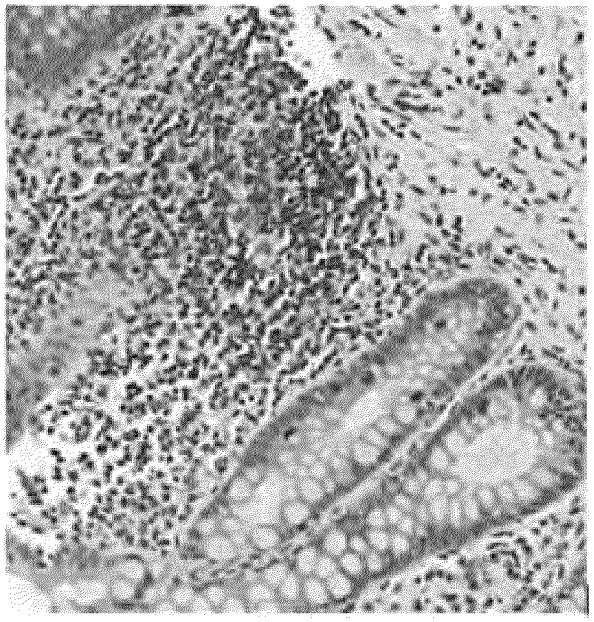
ФИГ.115


Среднее % изменение общего показателя Geboes
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
1 мг (n=3)
3 мг (n=3)
10 мг (n=2)
30 мг (n=2)
PBO (n=2)

ФИГ.116

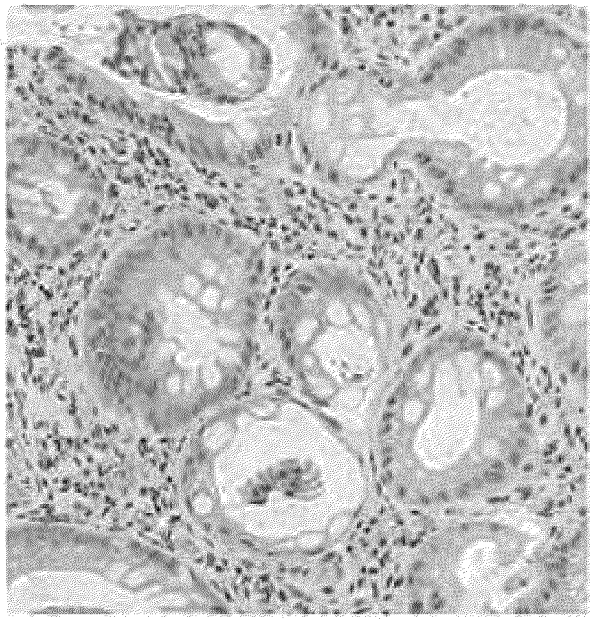
A. Исходный уровень

Показатель Geboes = 15

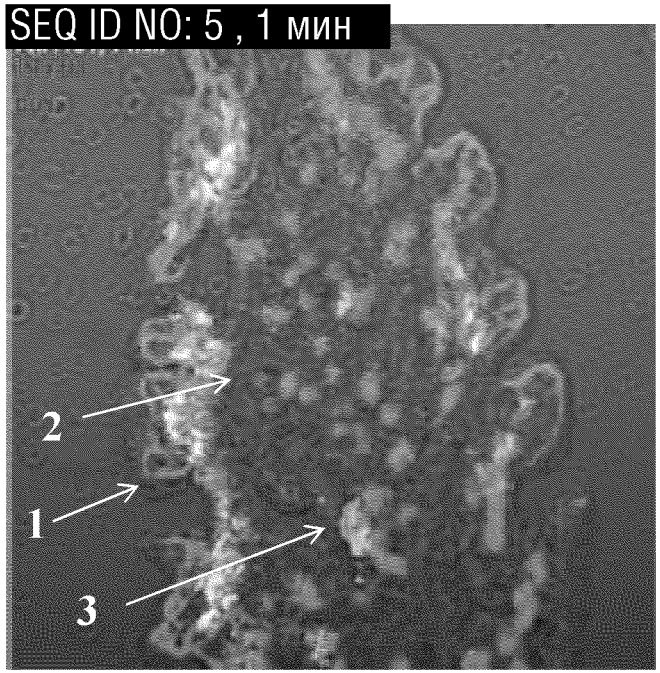


B. После конструкции доставки IL-10 в течение 14 дней

Показатель Geboes = 3



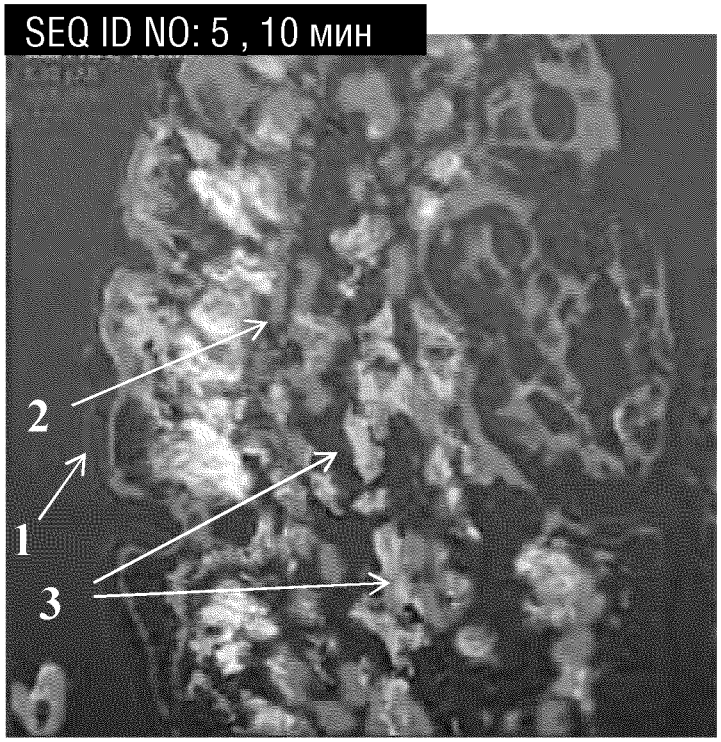
ФИГ.117A



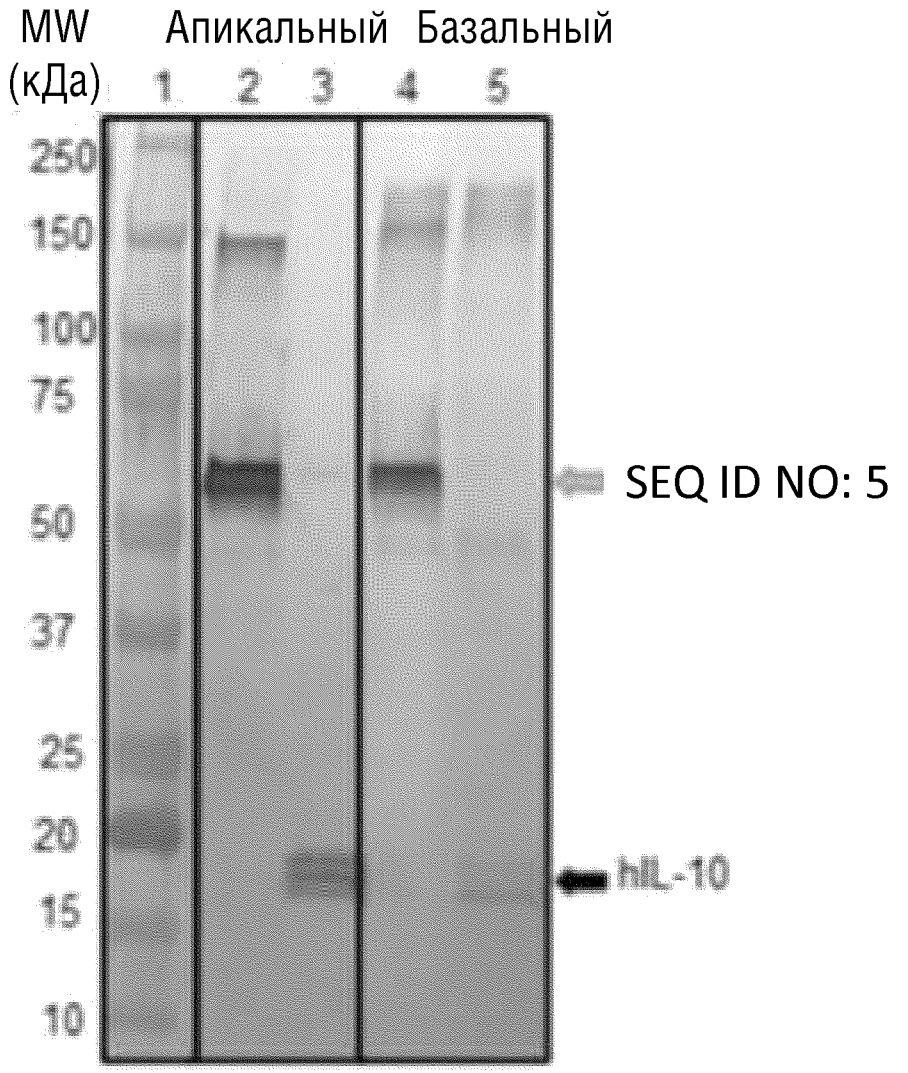
ФИГ.117B



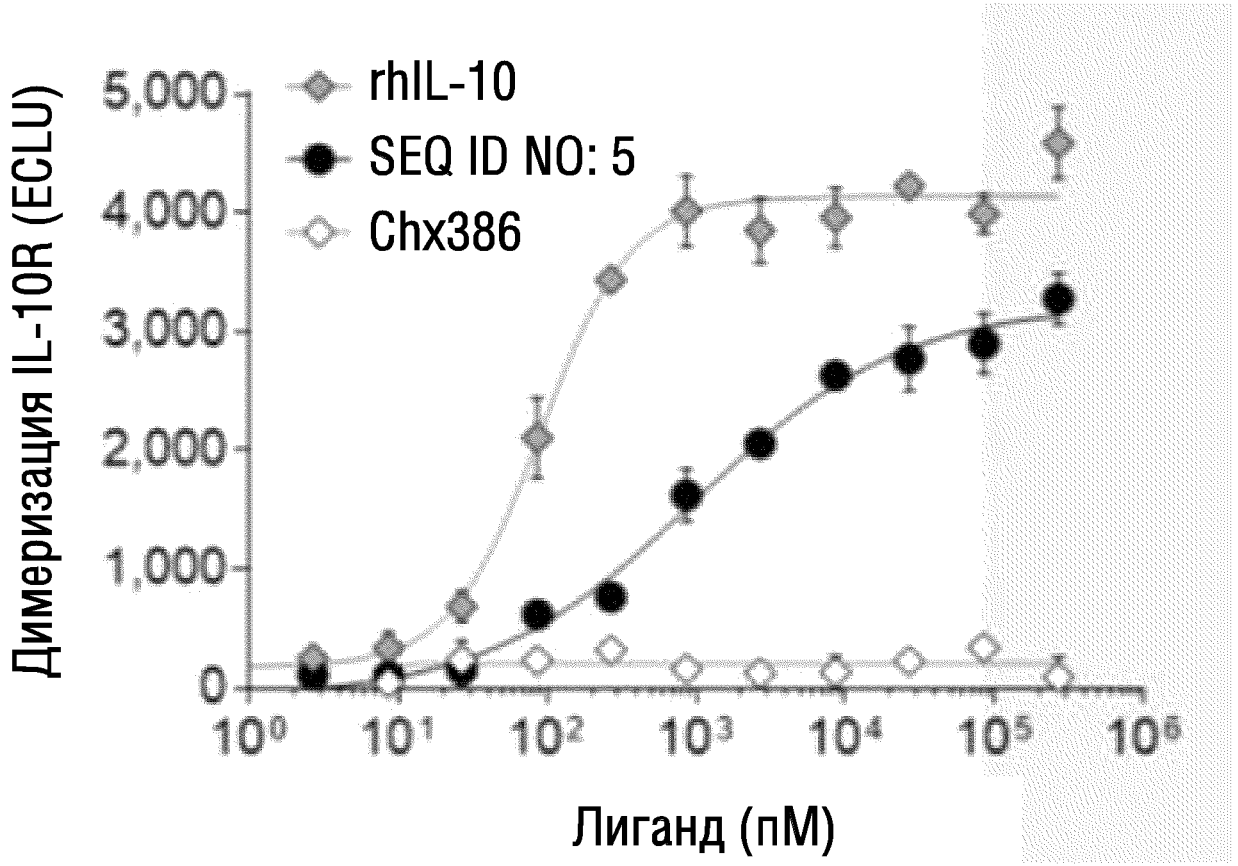
ФИГ.117C



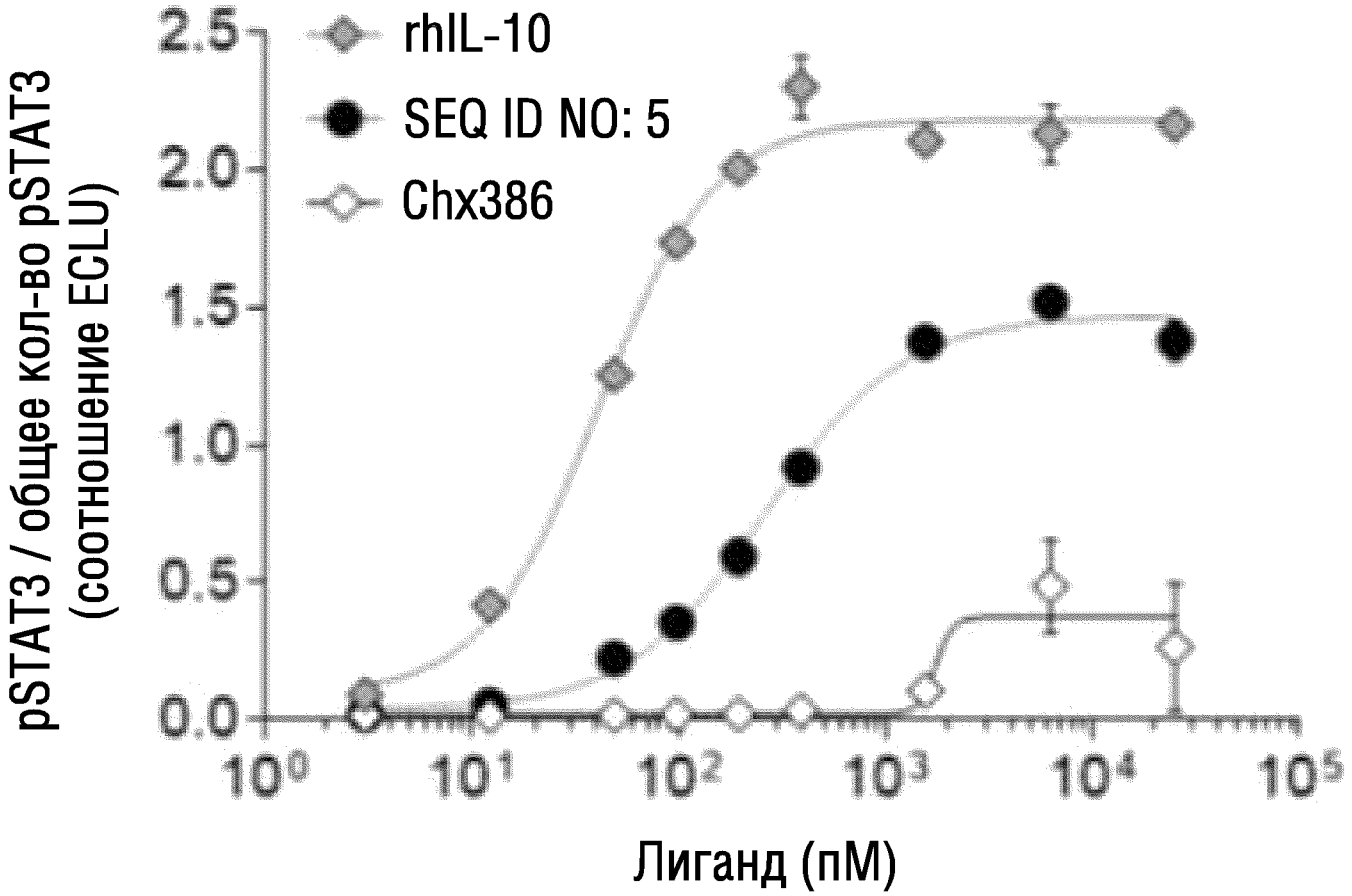
ФИГ.118


MW
(кДа)
Апикальный
Базальный
1
2
3
4
5
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SEQ ID NO: 5
hIL-10

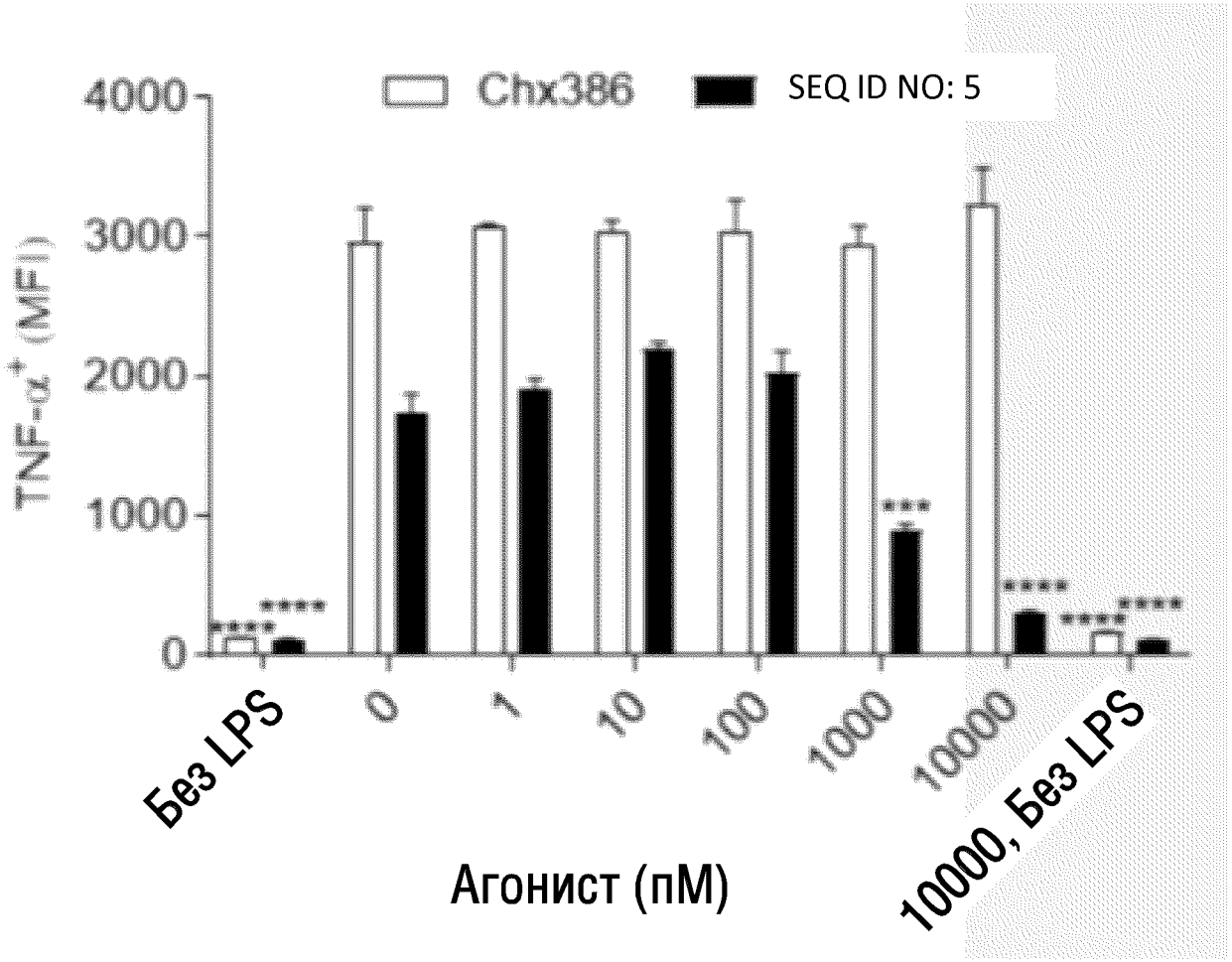
ФИГ.119


rhIL-10
SEQ ID NO: 5
Chx386
Димеризация IL-10R (ECLU)
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Лиганд (пМ)

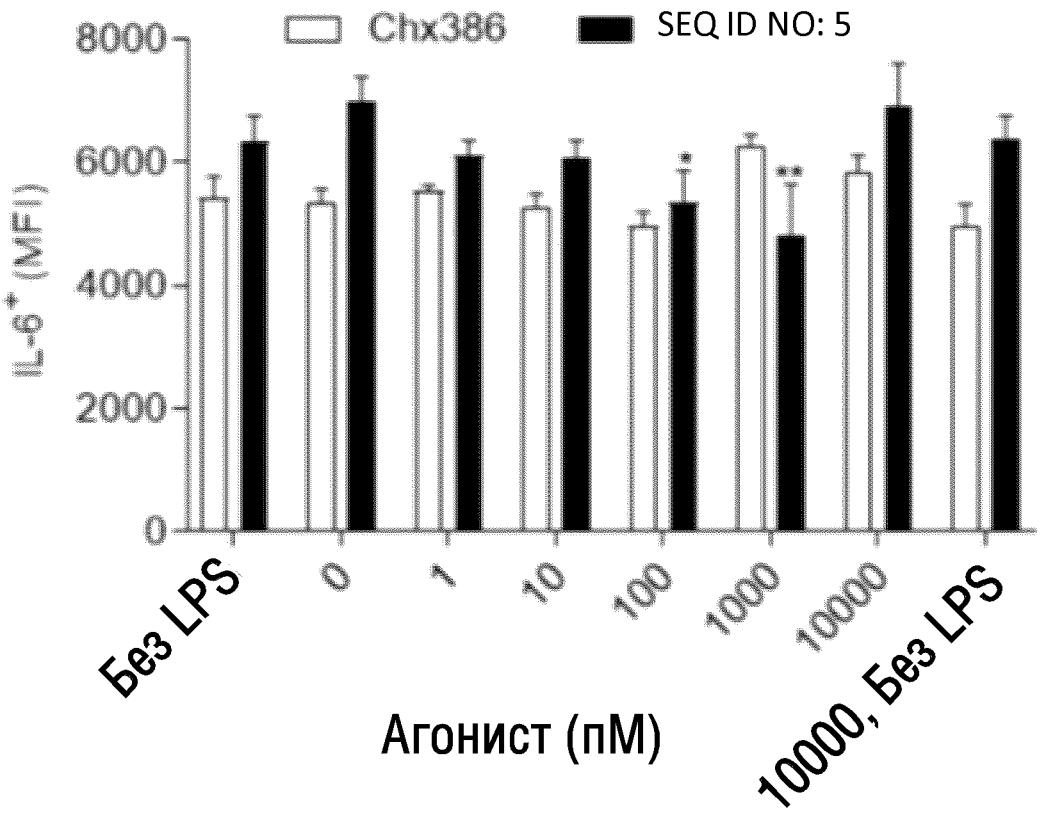
ФИГ.120


rhIL-10
SEQ ID NO: 5
Chx386
pSTAT3 / общее кол-во pSTAT3
(соотношение ECLU)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Лиганд (пМ)

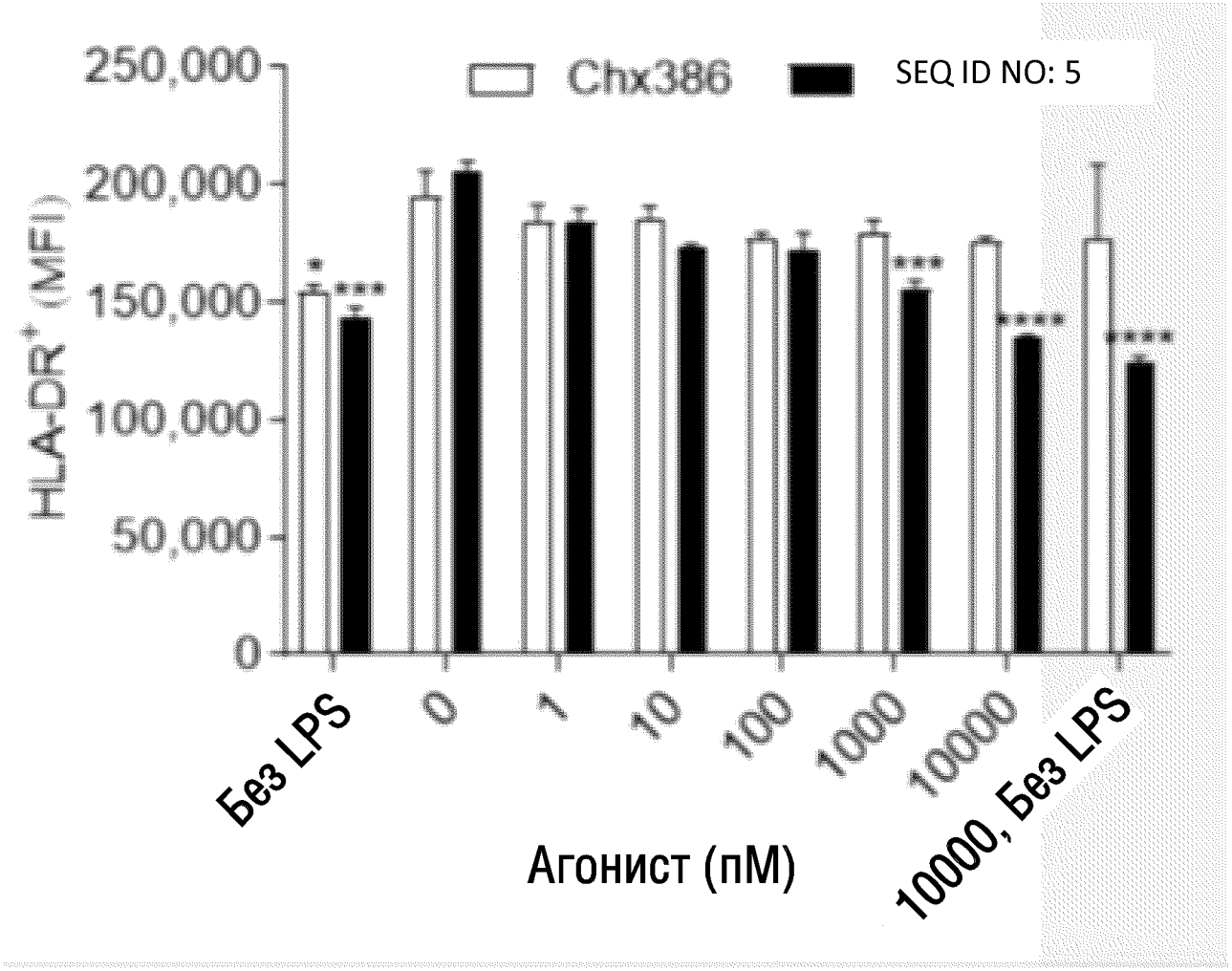
ФИГ.121


Chx386
SEQ ID NO: 5
TNF-α+ (MFI)
4000
3000
2000
1000
0
****
***
Без LPS
0
1
10
100
1000
10000
10000, Без LPS
Агонист (пМ)

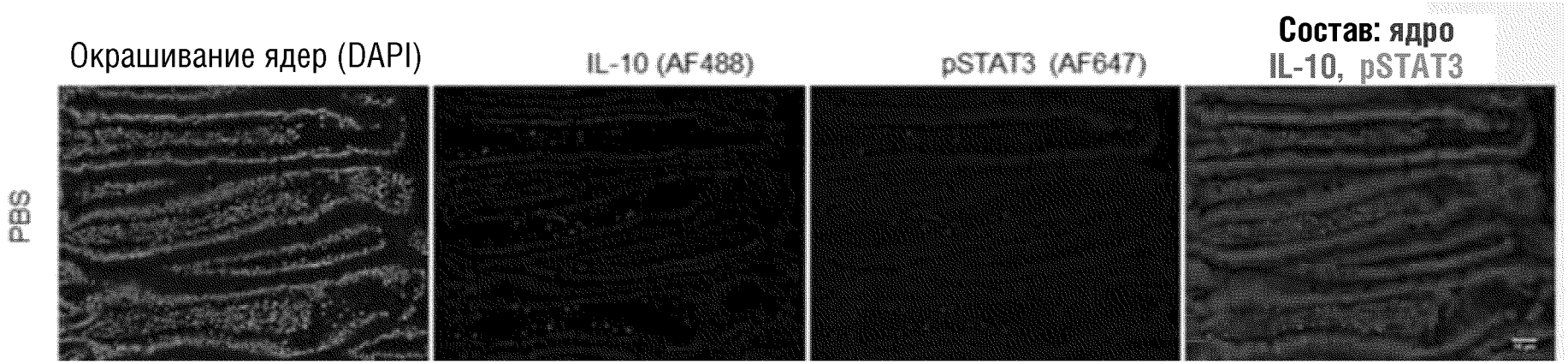
ФИГ.122


Chx386
SEQ ID NO: 5
8000
6000
4000
2000
0
IL-6+ (MFI)
Без LPS
0
1
10
100
1000
10000
10000, Без LPS
Агонист (пМ)

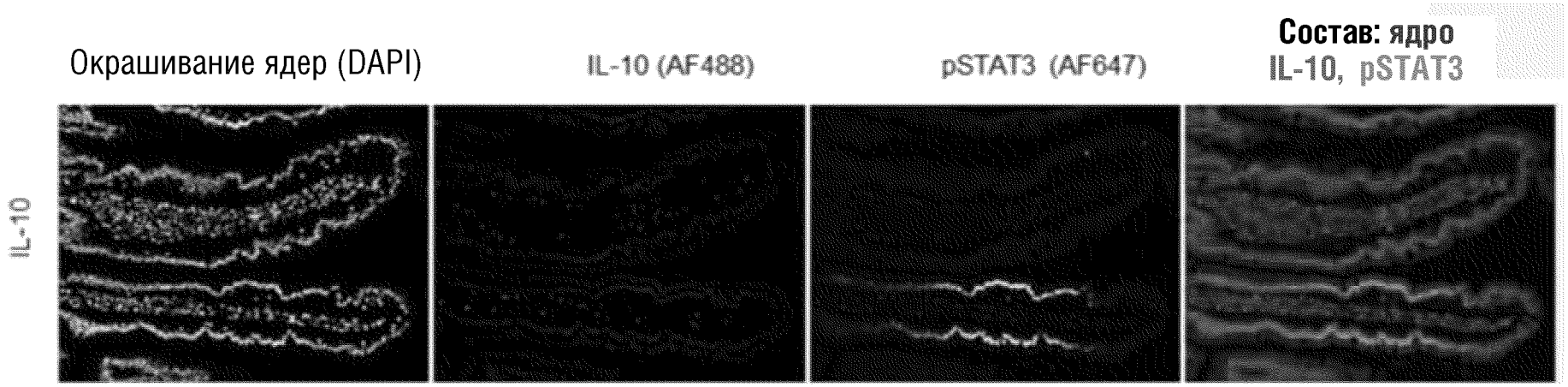
ФИГ.123


250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
HLA-DR+ (MFI)
Chx386
SEQ ID NO: 5
*
***
***
****
****
Без LPS
0
1
10
100
1000
10000
10000, Без LPS
Агонист (пМ)

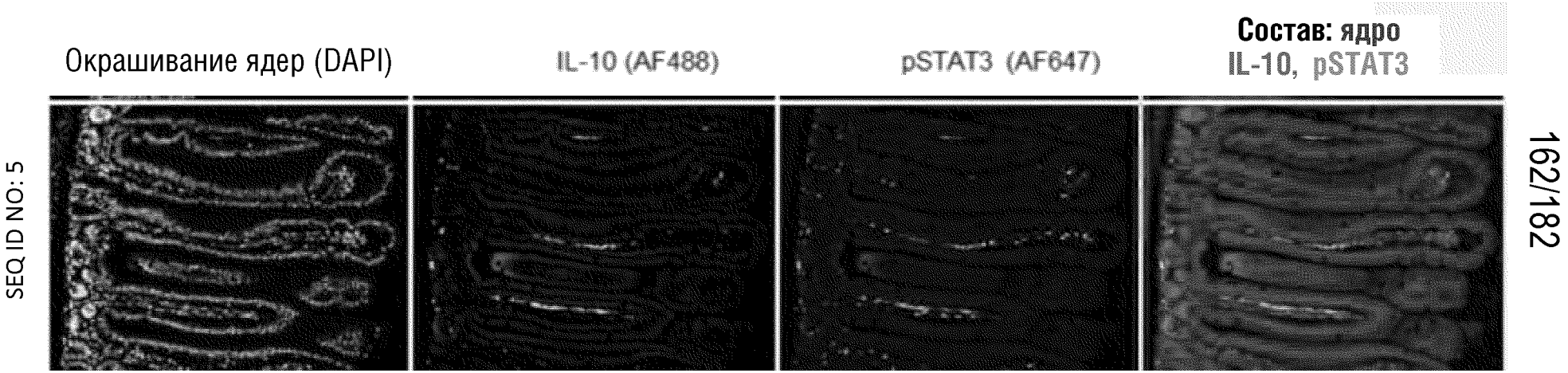
ФИГ.124



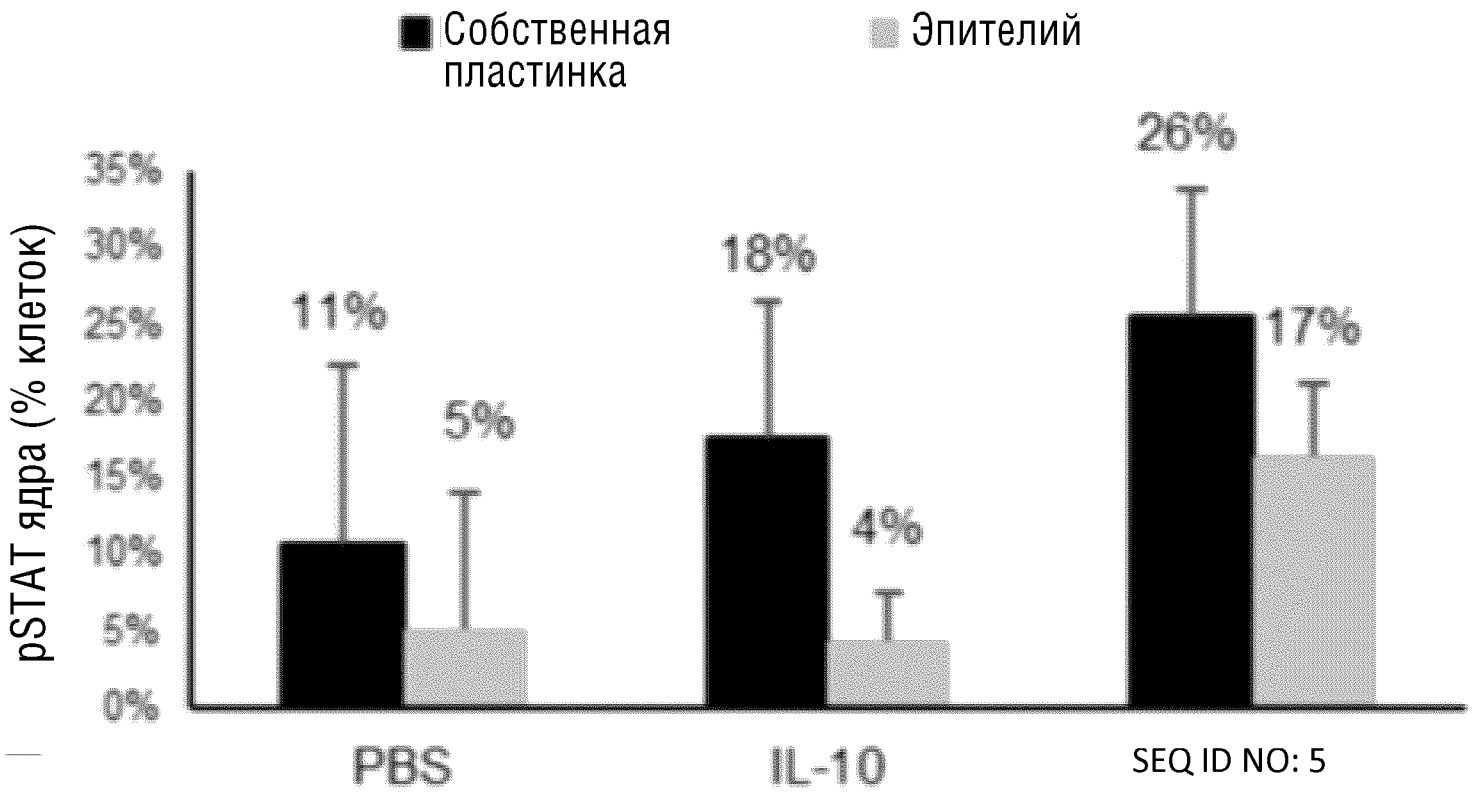
ФИГ.125



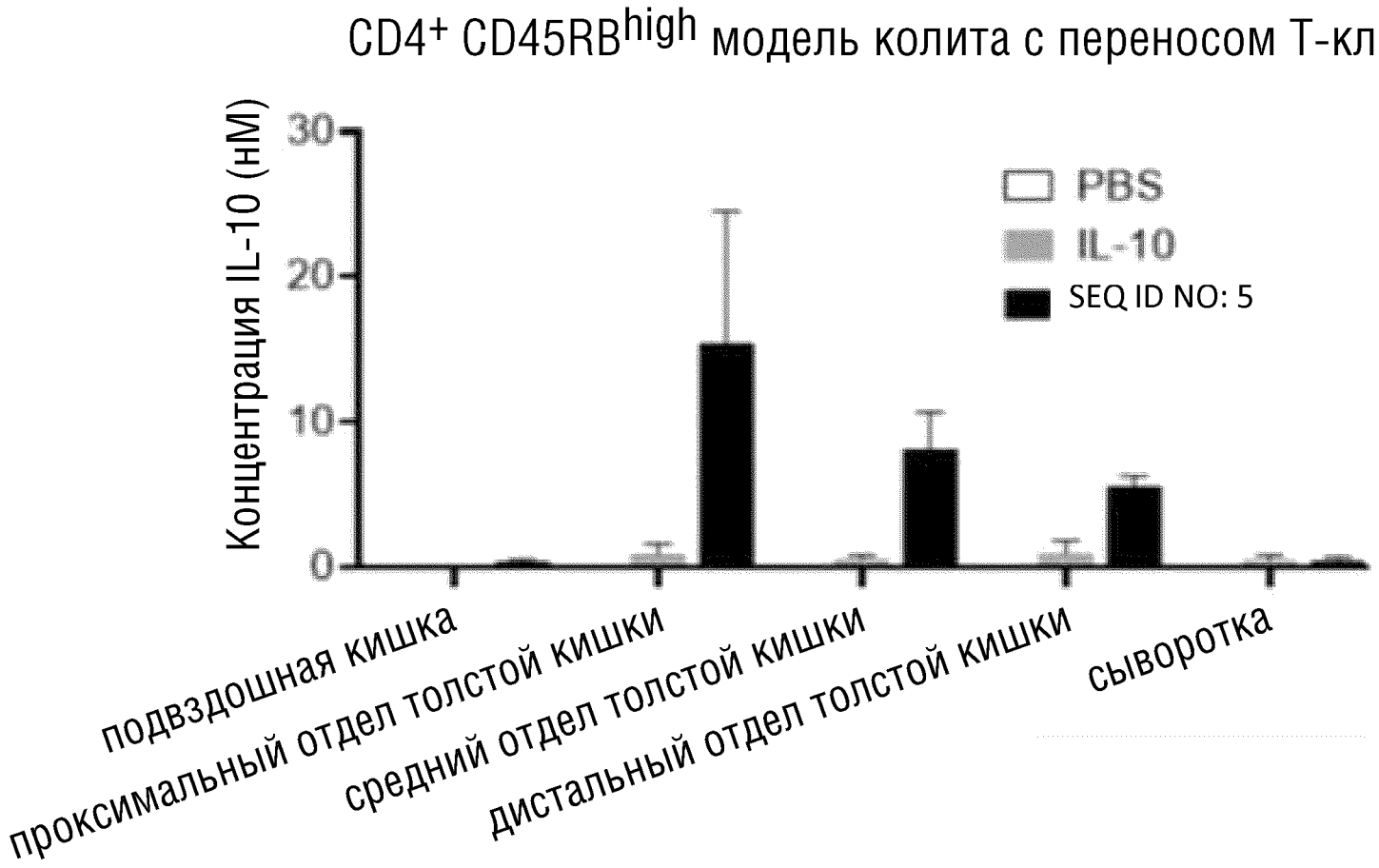
ФИГ.126


Окрашивание ядер (DAPI)
IL-10 (AF488)
pSTAT3 (AF647)
Состав: ядро
IL-10, pSTAT3
SEQ ID NO: 5

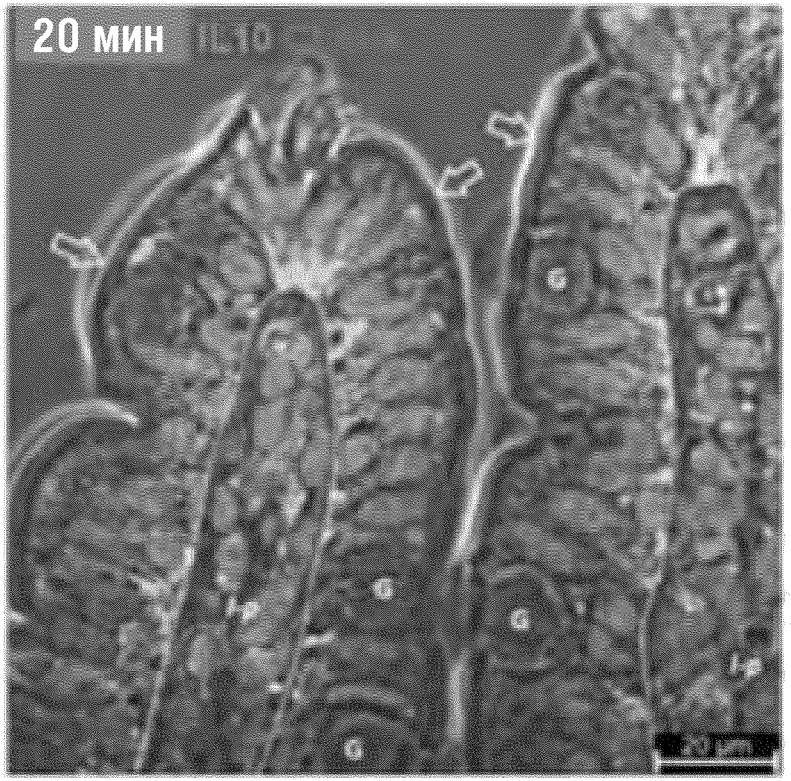
ФИГ.127


Собственная пластинка
Эпителий
pSTAT ядра (% клеток)
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
11%
5%
18%
4%
26%
17%
PBS
IL-10
SEQ ID NO: 5

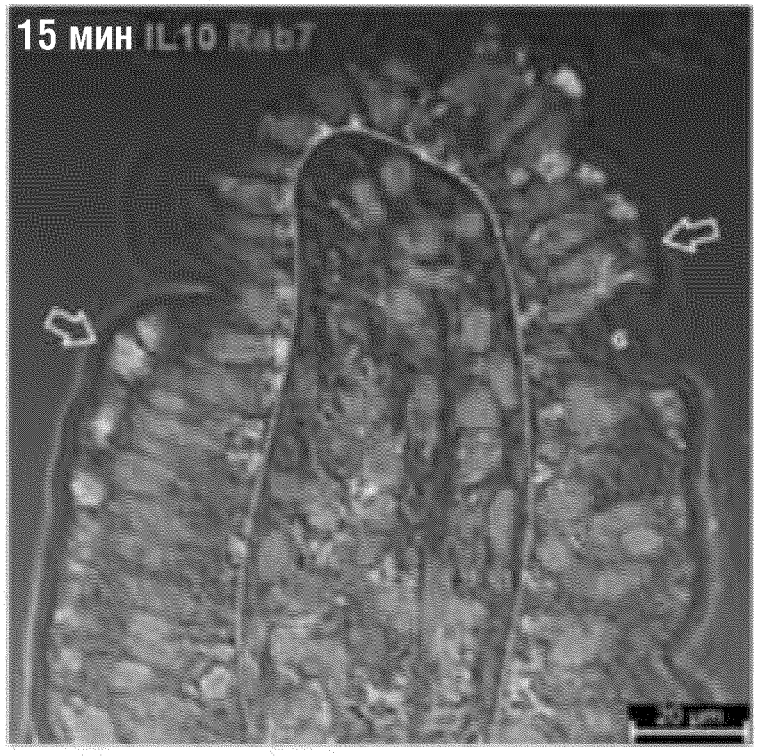
ФИГ.128


CD4+ CD45RBhigh модель колита с переносом Т-клеток
Концентрация IL-10 (нМ)
30
20
10
0
PBS
IL-10
SEQ ID NO: 5
подвздошная кишка
проксимальный отдел толстой кишки
средний отдел толстой кишки
дистальный отдел толстой кишки
сыворотка

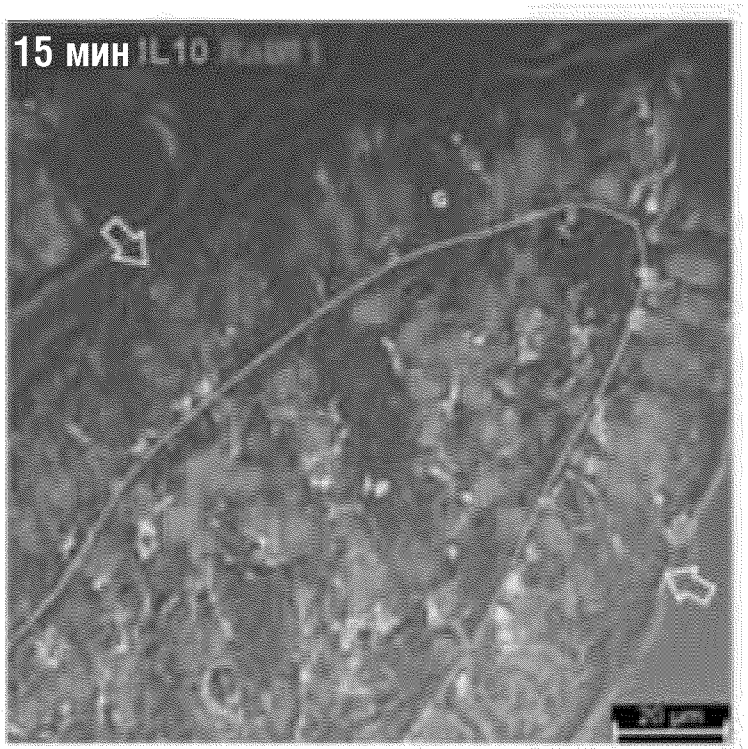
ФИГ.129



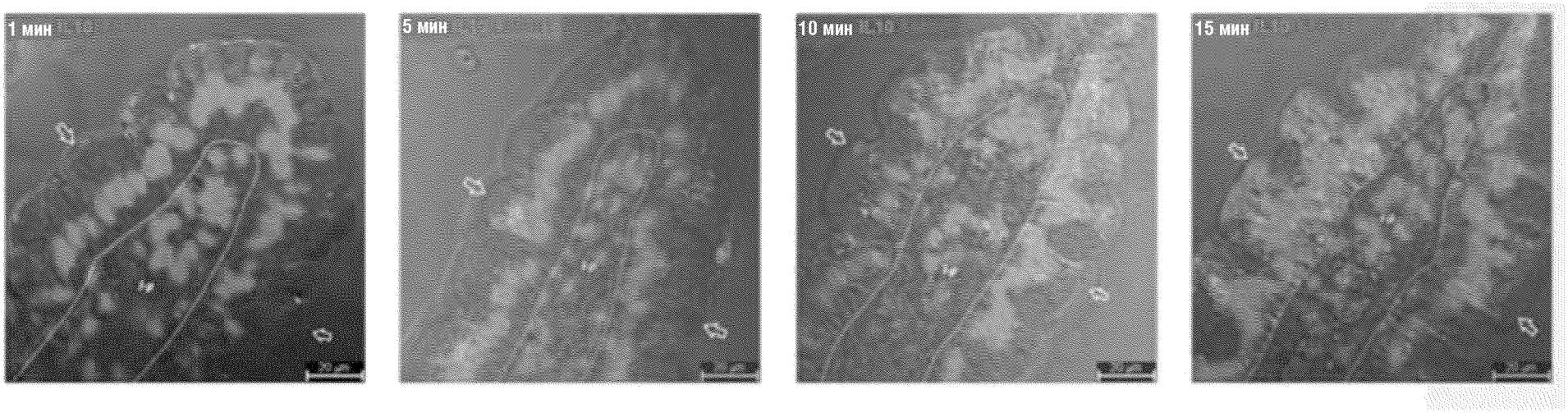
ФИГ.130



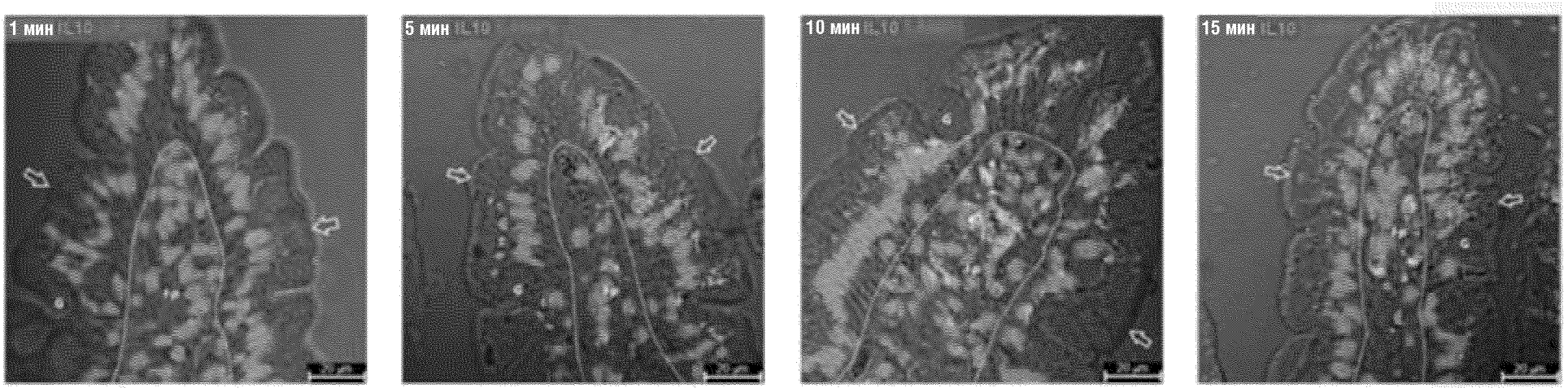
ФИГ.131



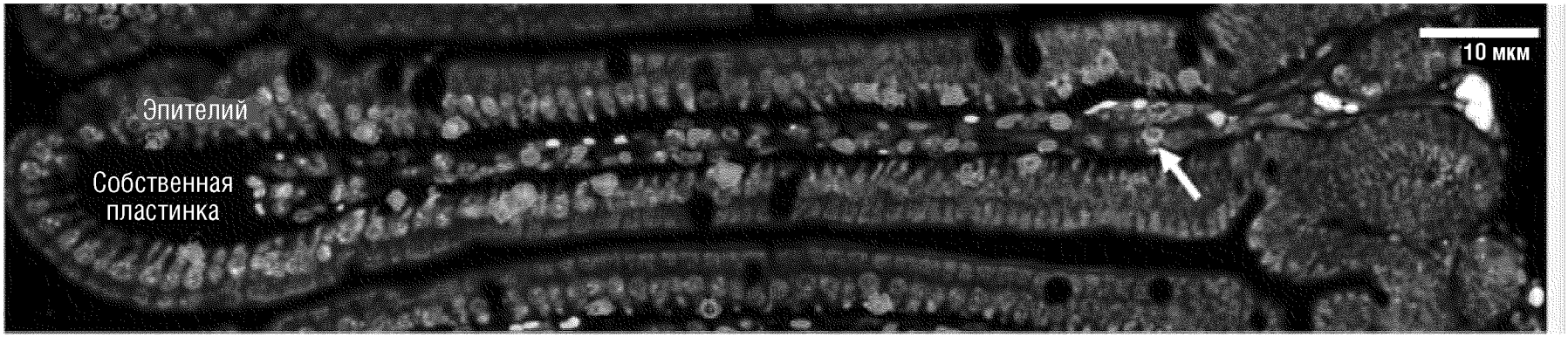
ФИГ.132



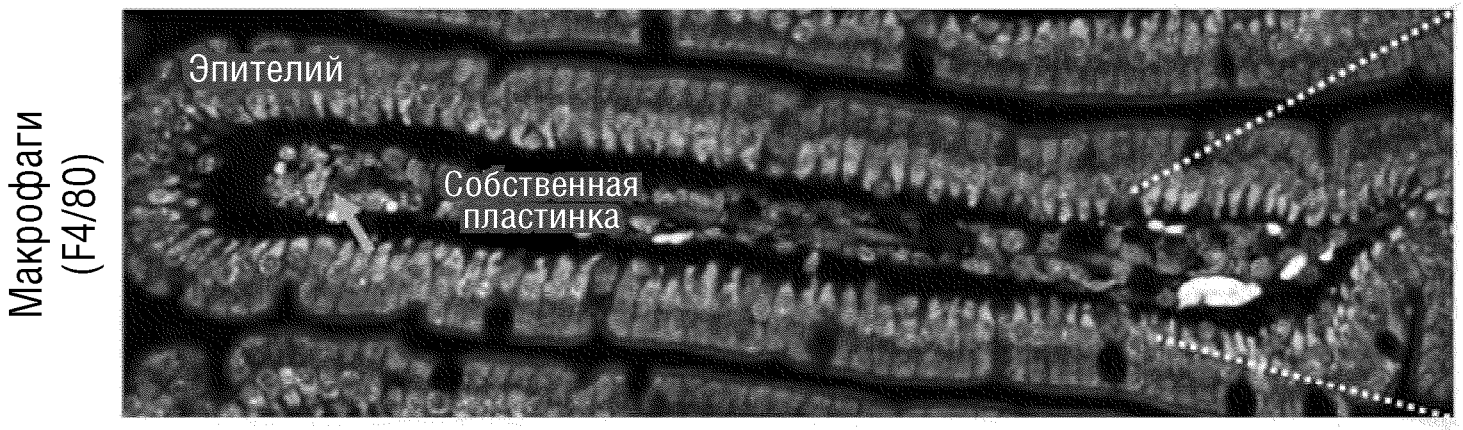
ФИГ.133



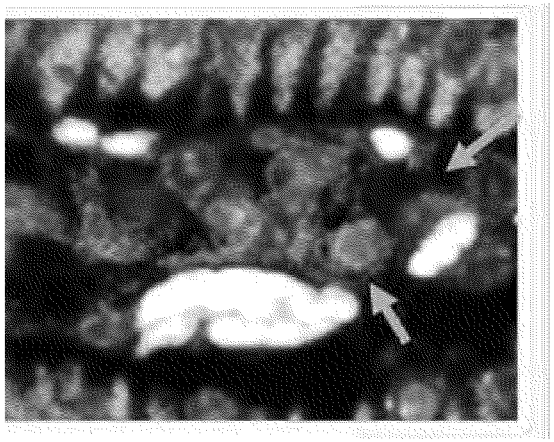
ФИГ.134



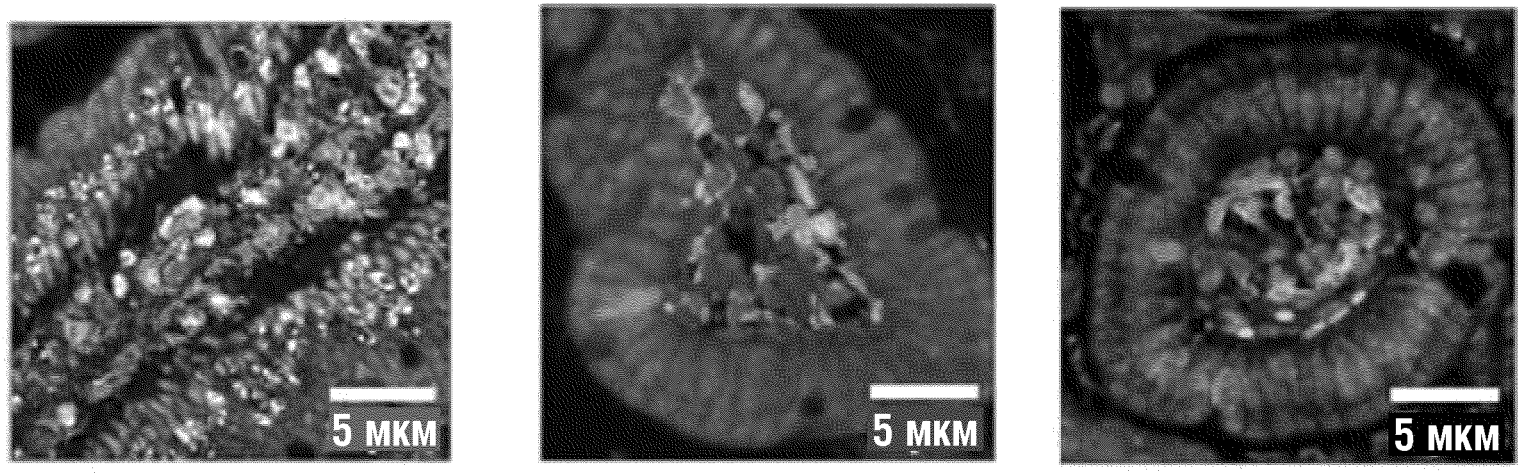
ФИГ.135



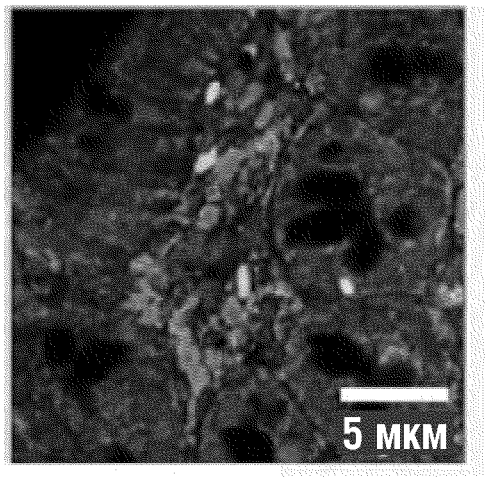
ФИГ.136



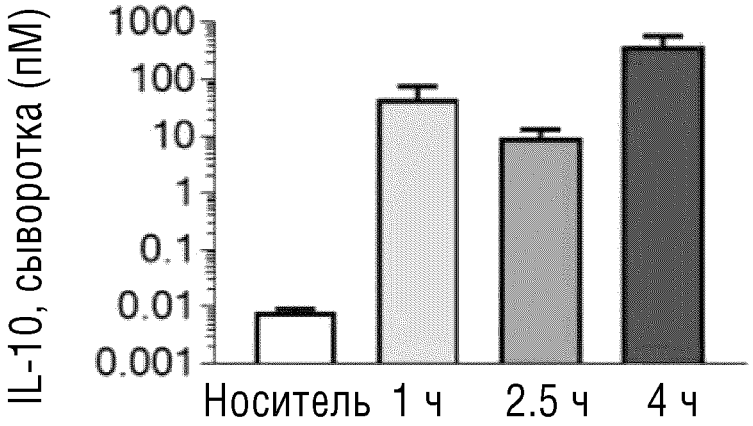
ФИГ.137



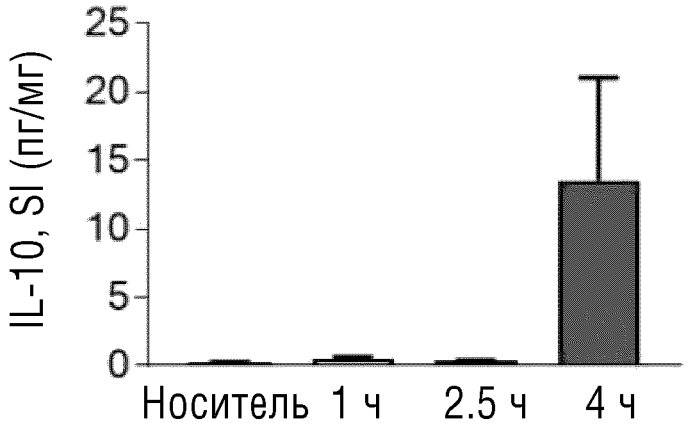
ФИГ.138



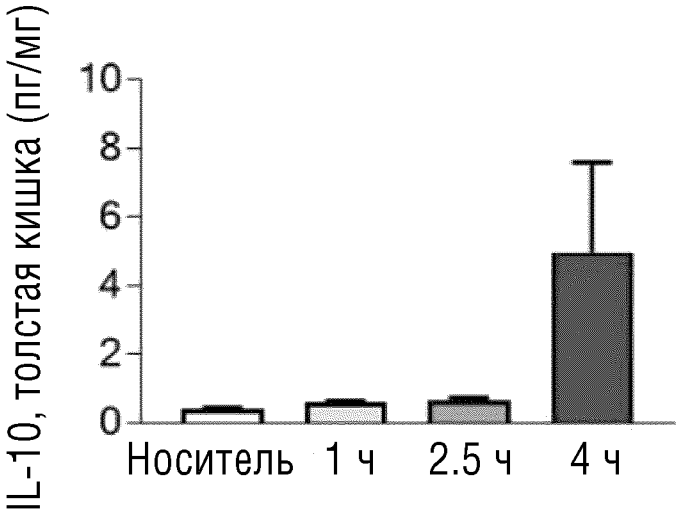
ФИГ.139



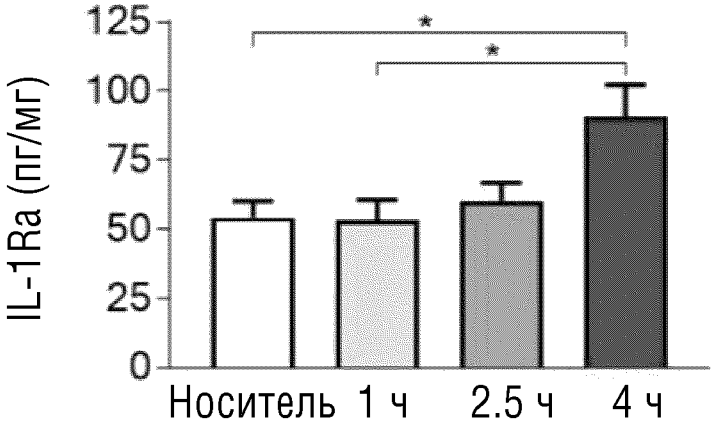
ФИГ.140



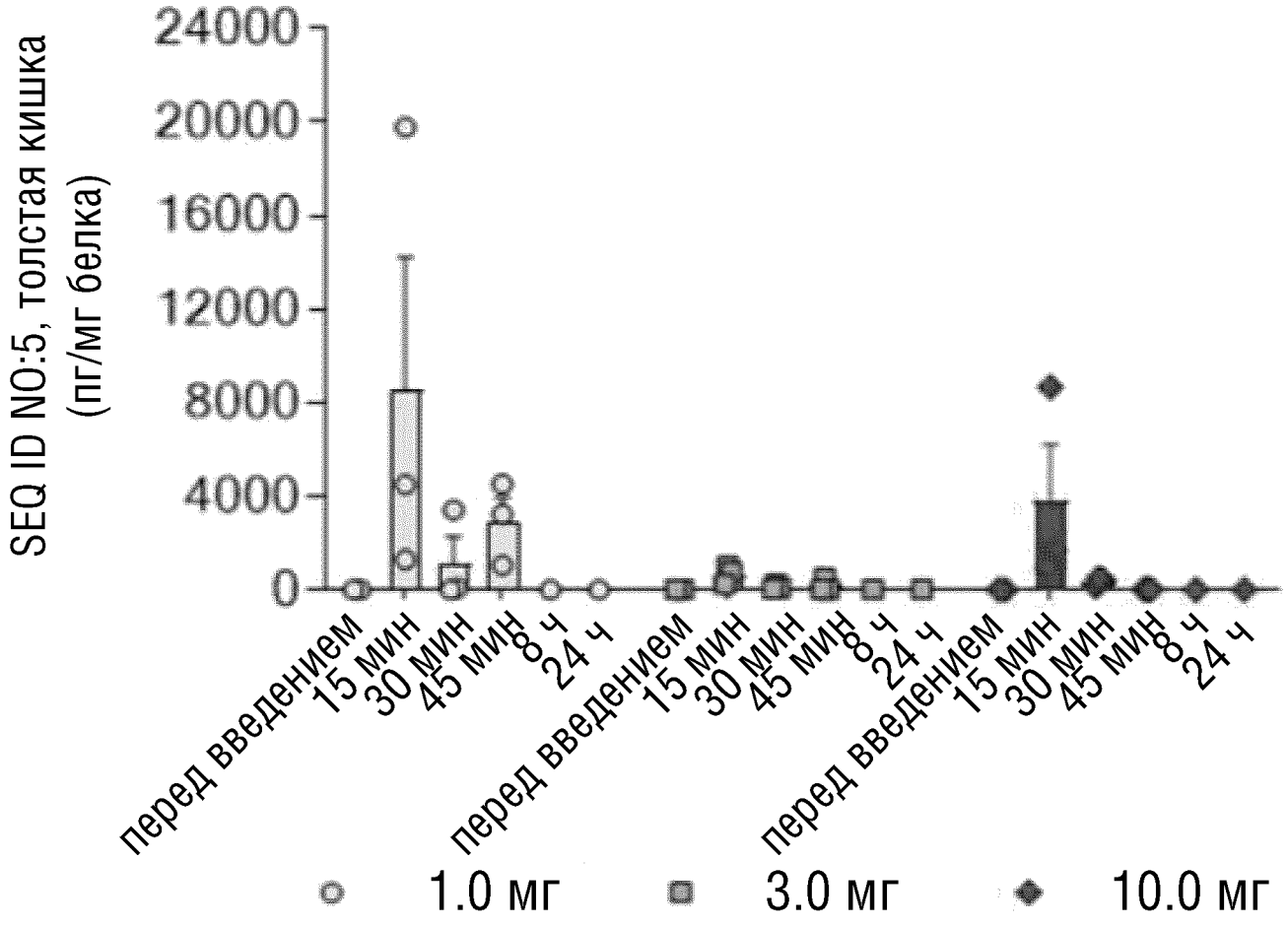
ФИГ.141



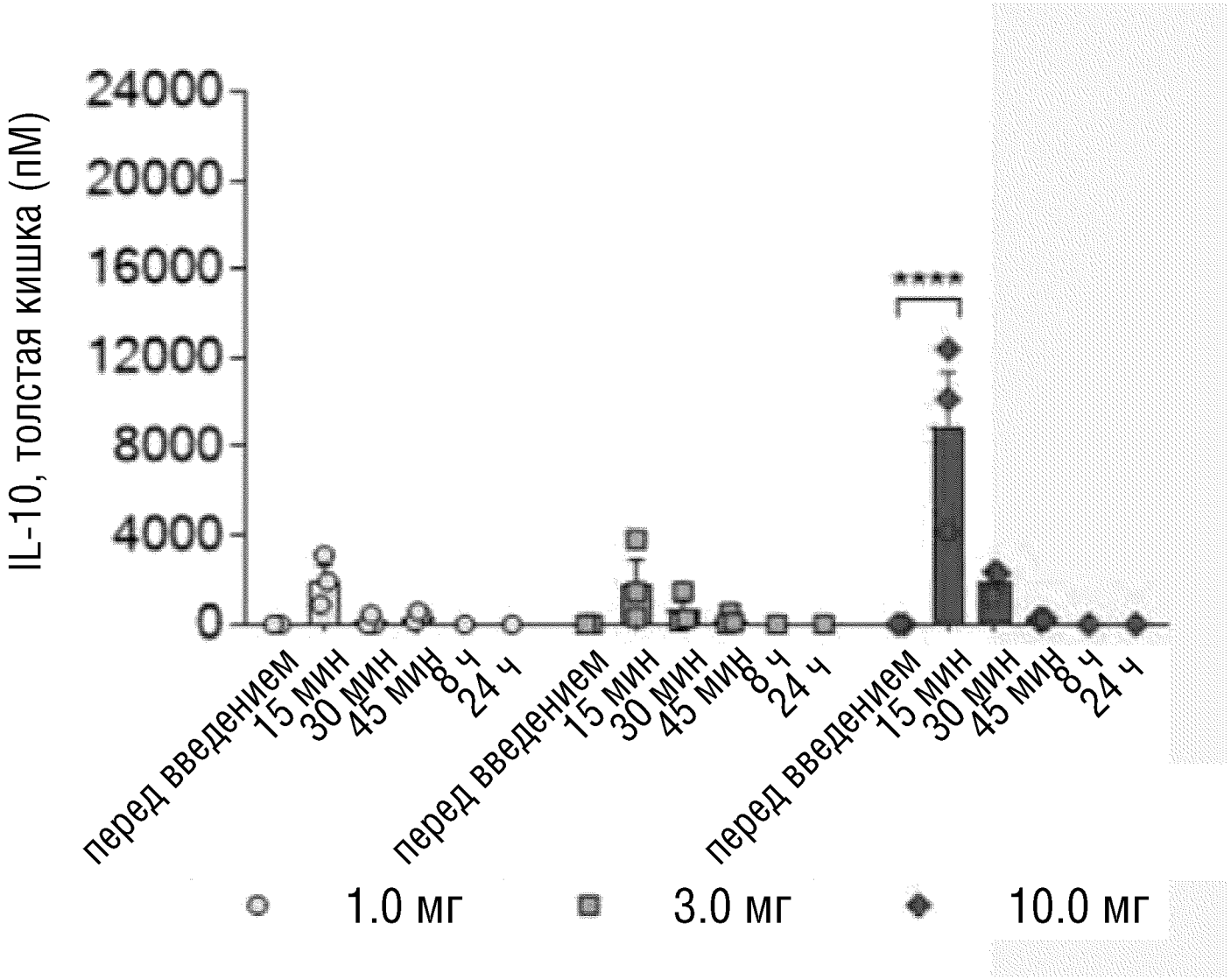
ФИГ.142



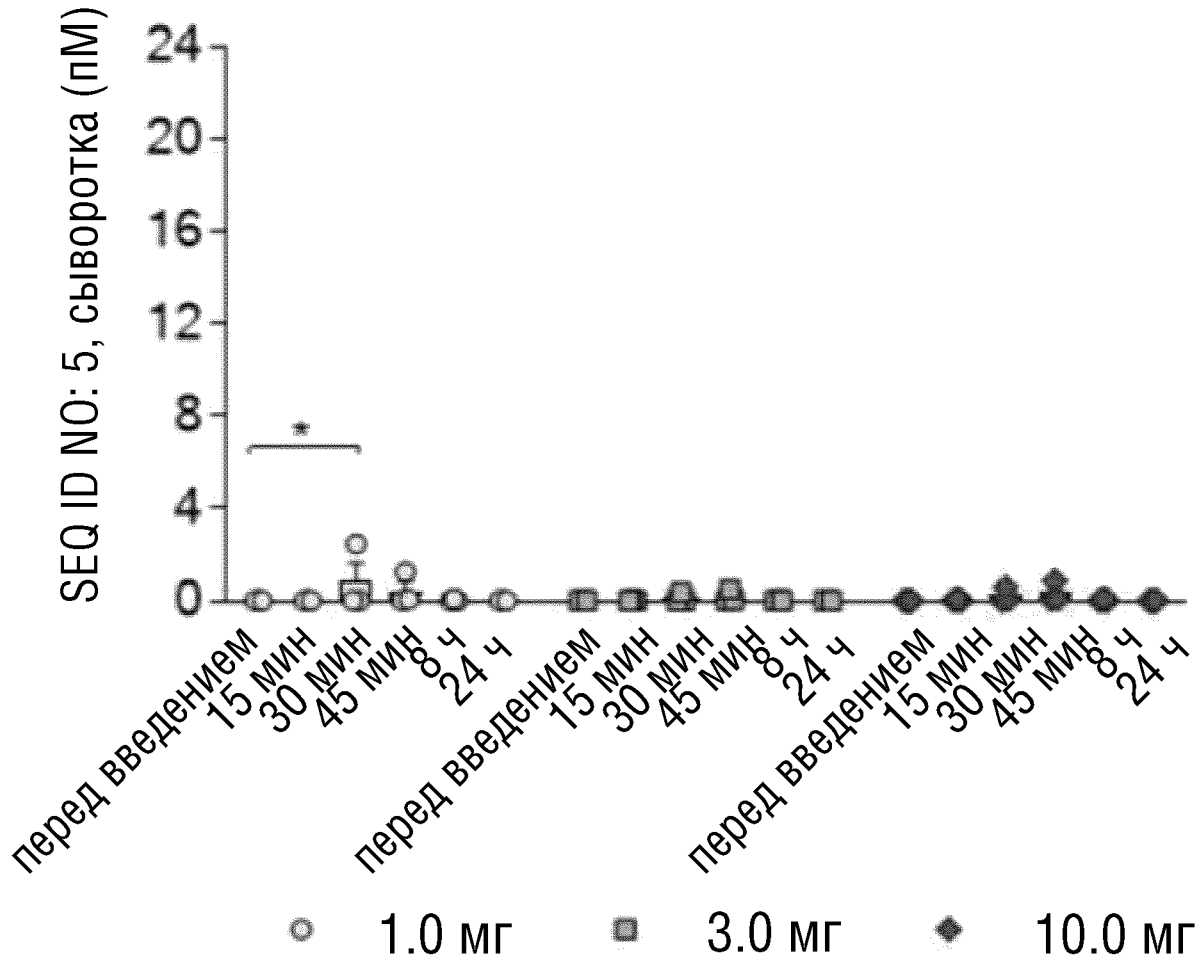
ФИГ.143


SEQ ID NO:5, толстая кишка
(пг/мг белка)
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг

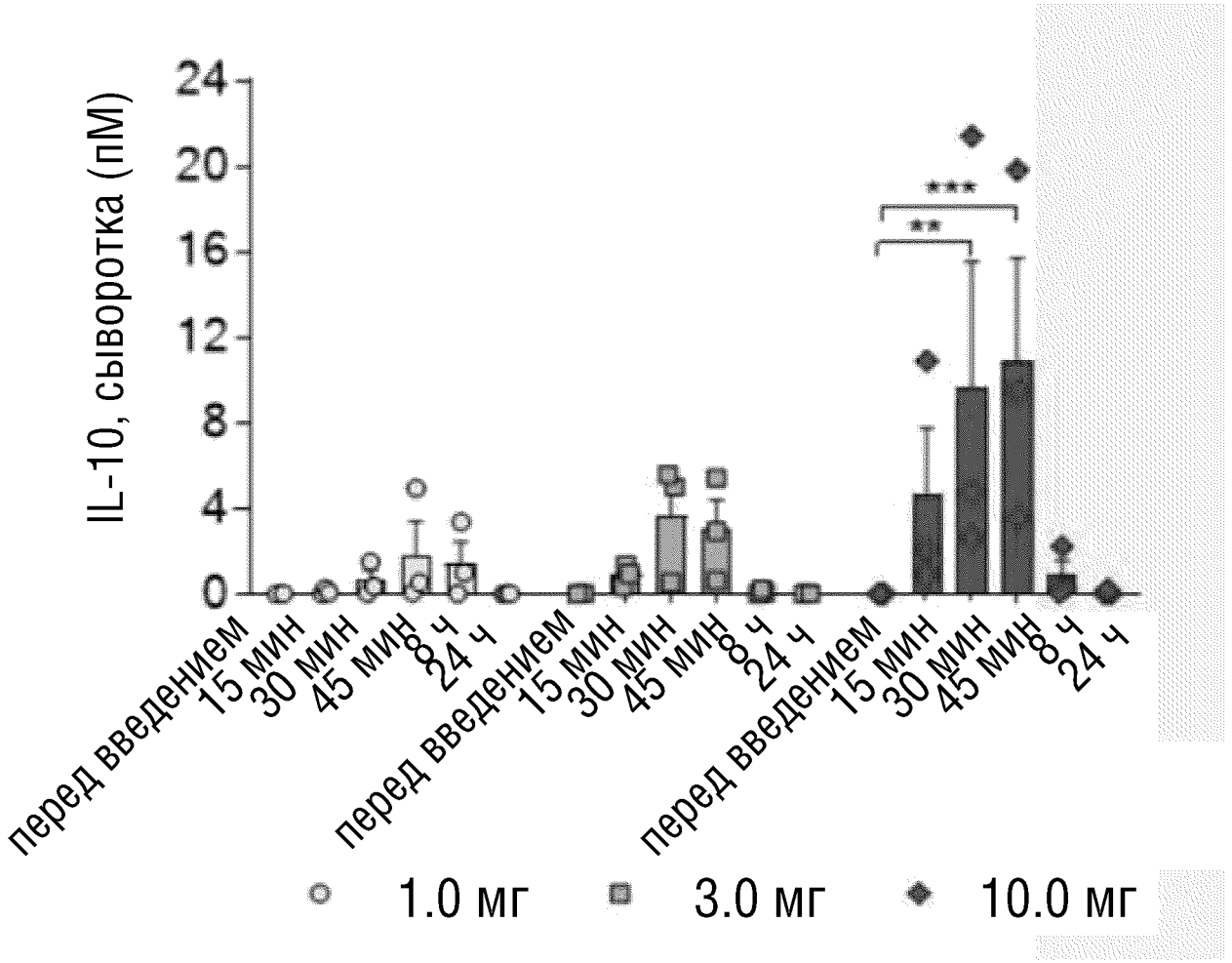
ФИГ.144


IL-10, толстая кишка (пМ)
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
****
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг

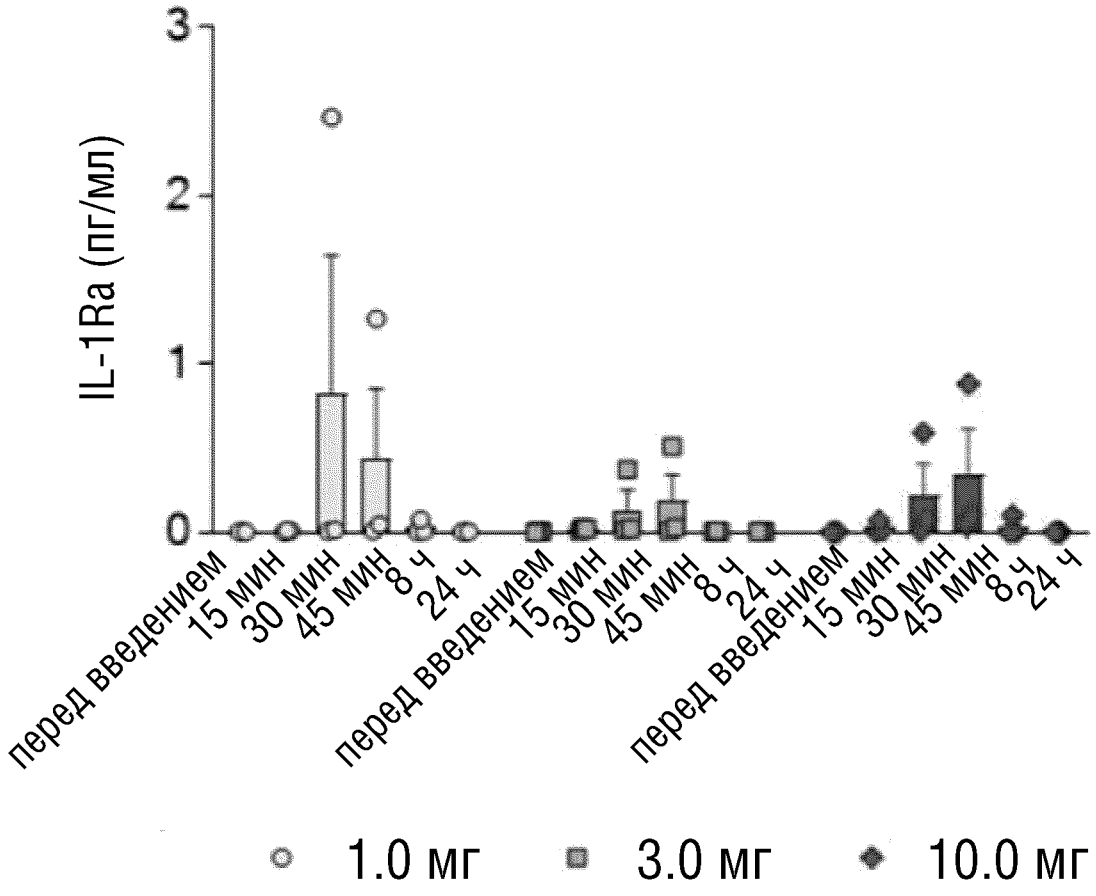
ФИГ.145


SEQ ID NO: 5, сыворотка (пМ)
24
20
16
12
8
4
0
*
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг

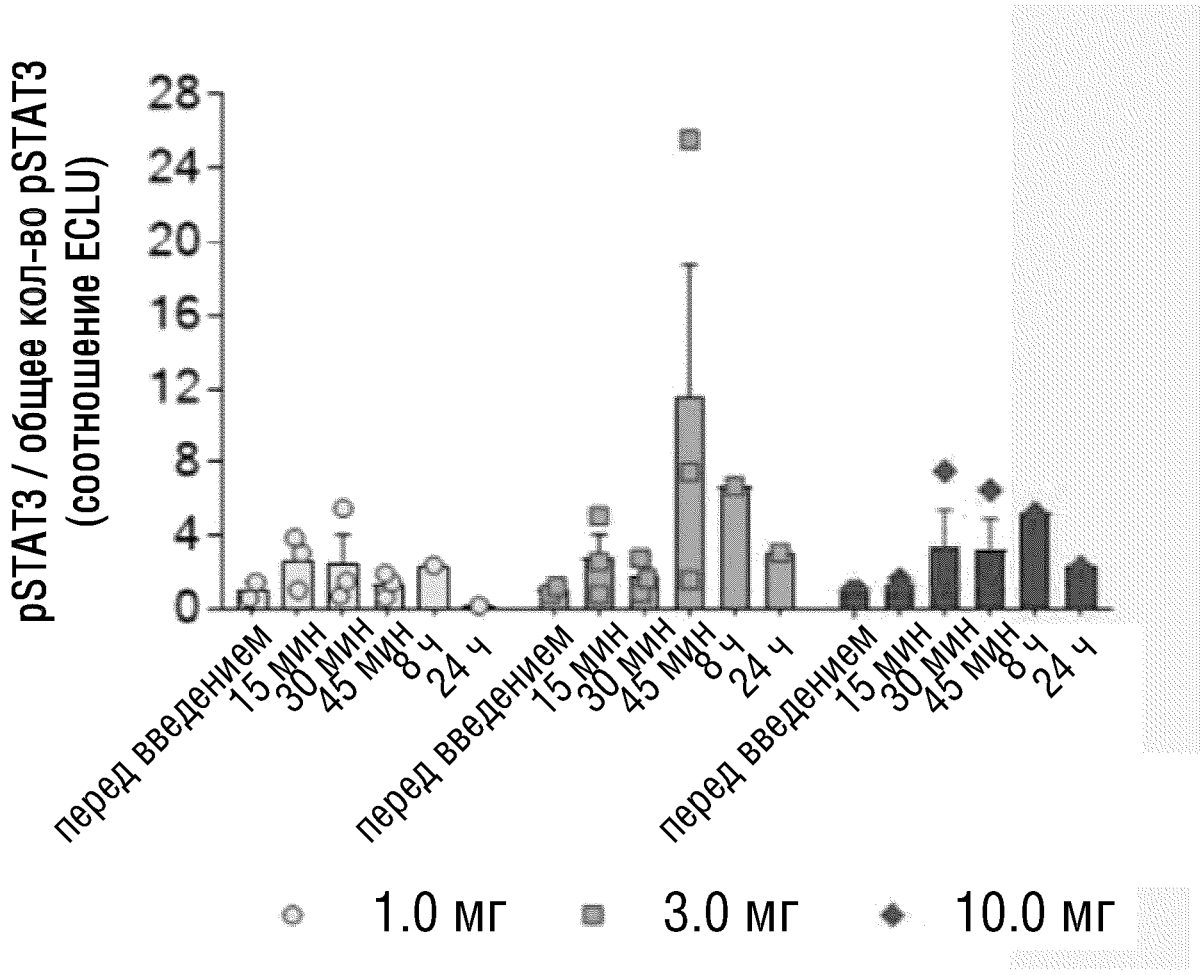
ФИГ.146


IL-10, сыворотка (пМ)
24
20
16
12
8
4
0
***
**
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг

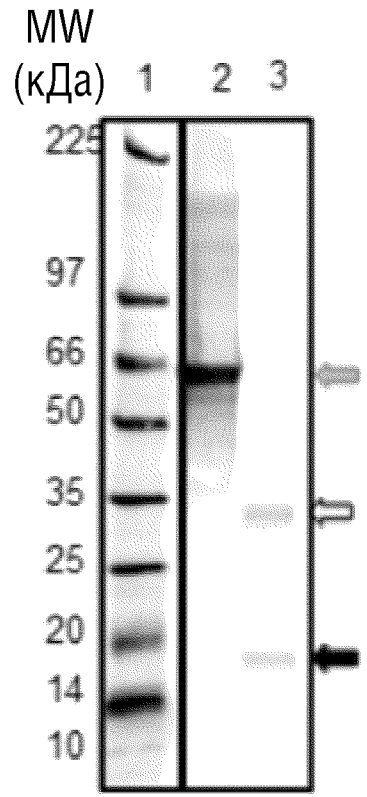
ФИГ.147


IL-1Ra (пг/мл)
3
2
1
0
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг

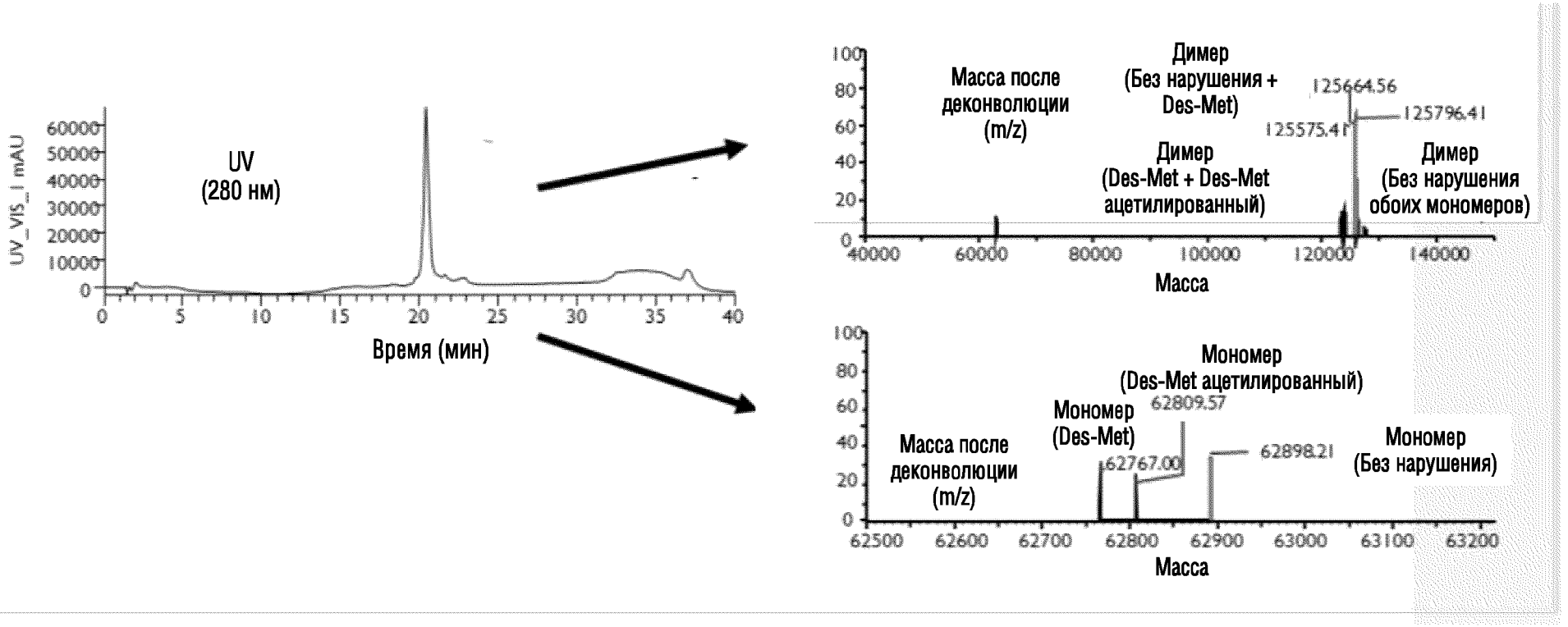
ФИГ.148


pSTAT3 / общее кол-во pSTAT3
(соотношение ECLU)
28
24
20
16
12
8
4
0
перед введением
15 мин
30 мин
45 мин
8 ч
24 ч
1.0 мг
3.0 мг
10.0 мг

ФИГ.149



ФИГ.150


UV_VIS_1 mAU
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
UV
(280 нм)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Время (мин)
Масса после деконволюции (m/z)
Димер (Без нарушения + Des-Met)
125664.56
125796.41
125575.41
Димер (Des-Met + Des-Met ацетилированный)
Димер (Без нарушения обоих мономеров)
100
80
60
40
20
0
40000
60000
80000
100000
120000
140000
Масса
Мономер (Des-Met ацетилированный)
62809.57
Мономер (Des-Met)
62767.00
62898.21
Мономер (Без нарушения)
Масса после деконволюции (m/z)
62500
62600
62700
62800
62900
63000
63100
63200
Масса