

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291735** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.09.15

(51) Int. Cl. *C07K 14/705* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.23

(54) **ВАРИАНТЫ ПРОГРАНУЛИНА**

(31) 62/953,099; 63/091,819

(32) 2019.12.23; 2020.10.14

(33) US

(86) PCT/US2020/066831

(87) WO 2021/133907 2021.07.01

(71) Заявитель:
ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Черф Джеральд Максвелл, Каннан
Гунасекаран, Лекса Катрина У., Лоу
Рэй Л.И., Пророк Рейчел, Шривастава
Анкита (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В данном документе представлены варианты програнулина и слитые белки, которые содержат вариант програнулина и Fc-полипептид. Также в данном документе предложены способы применения таких белков для лечения связанных с програнулином расстройств (например, нейродегенеративного заболевания, такого как лобно-височная деменция (ЛВД)).

A1

202291735

202291735

A1

ВАРИАНТЫ ПРОГРАНУЛИНА

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/953099, поданной 23 декабря 2019 г., и предварительной заявке США № 63/091819, поданной 14 октября 2020 г., содержание которых в полном объеме и во всех целях включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 14 декабря 2020 г., называется 102342-003920PC-1219188_SL.txt и имеет размер 543756 байт.

Уровень техники

Лобно-височная деменция (ЛВД) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, на которое приходится 5–10% всех пациентов с деменцией и 10–20% пациентов с началом деменции до 65 лет (Rademakers et al., *Nat Rev Neurol.* 8(8):423-34, 2012). Хотя с ЛВД было связано несколько генов, одним из наиболее часто мутирующих генов при ЛВД является *GRN*, который картирован на хромосоме 17q21 человека и кодирует богатый цистеином белок програнулин (PGRN) (также известный как проэпителин и акрогранин). Впервые о высокопенетрантных мутациях в *GRN* сообщалось в 2006 году как о причине аутосомно-доминантных форм семейной ЛВД (Baker et al., *Nature.* 442(7105):916-9, 2006; Cruts et al., *Nature.* 2006 Aug 24;442(7105):920-4; Gass et al., *Hum Mol Genet.* 15(20):2988-3001, 2006). Недавние оценки позволяют предположить, что мутации *GRN* присутствуют у 5–20% пациентов с ЛВД с положительным семейным анамнезом и в 1–5% спорадических случаев (Rademakers et al., выше).

После идентификации мутаций *GRN* как причины ЛВД, снижение уровней програнулина и потеря функции програнулина были связаны с несколькими нейродегенеративными заболеваниями и расстройствами, включая болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), боковой амиотрофический склероз (БАС) и нейродегенеративные заболевания, вызванные лизосомными болезнями накопления (Petkau and Leavitt. 2014. *Trends Neurosci* 37(7):388-398). Соответственно, существует потребность в разработке вариантов терапии, которые могут лечить расстройства, вызванные потерей функции програнулина или снижением уровней програнулина, или расстройства, при которых благоприятными являются повышенные уровни програнулина.

Сущность изобретения

В данном документе предложены варианты програнулина и слитые белки, содержащие програнулин или его вариант, а также способы применения таких вариантов или слитых белков для лечения любого заболевания, при котором благоприятными являются повышенные уровни програнулина, включая нейродегенеративное заболевание (например, ЛВД), атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, возрастную макулярную дегенерацию (ВМД) или связанное с програнулином расстройство. Предложенные в данном документе варианты програнулина имеют модификации или добавления на С-конце програнулина дикого типа. Как описано в данном документе, слитые белки, содержащие вариант програнулина, менее подвержены С-концевому расщеплению в програнулиновой части белка по сравнению со слитыми белками, содержащими програнулин дикого типа, при рекомбинантной экспрессии белка и его очистке из клеток яичника китайского хомяка (СНО).

В одном аспекте изобретение относится к варианту програнулина, содержащему последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной $X_1X_2X_3$ в позициях, соответствующих остаткам 574–576 SEQ ID NO:2, где каждый из X_1 , X_2 и X_3 независимо представляет собой аминокислоту, а вместе они не представляют собой QLL. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет по меньшей мере 98% идентичности (например, по меньшей мере 99%) с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности (например, по меньшей мере 99%) с SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта вариант програнулина содержит последовательность:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
QDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC

CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDRV
PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX₁X₂X₃
(SEQ ID NO:3),

в которой X₁X₂X₃ вместе не представляют собой QLL.

В некоторых вариантах осуществления X₁ представляет собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P или V. В некоторых вариантах осуществления X₂ представляет собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R. В некоторых вариантах осуществления X₃ представляет собой L, Y или P.

В некоторых вариантах осуществления X₁X₂X₃ представляет собой X₁IL, X₁FL, X₁QL, PX₂L, QX₂L или VX₂L. В некоторых вариантах осуществления X₁X₂X₃ представляет собой X₁X₂L, а в некоторых вариантах осуществления X₂ в X₁X₂L представляет собой A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

В конкретных вариантах осуществления X₁X₂X₃ представляет собой PIL, PFL, QQL, VVL или VTL. В конкретных вариантах осуществления X₁X₂X₃ представляет собой PPL, PYL, QQL, QHL или QRL.

В другом аспекте изобретение относится к варианту програнулина, содержащему последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной Y₁Y₂QLL (SEQ ID NO:137), которая является смежной и С-концевой относительно позиции, соответствующей остатку 576 SEQ ID NO:2, где Y₁ представляет собой L или отсутствует, а Y₂ представляет собой R или отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина содержит последовательность:

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
QDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGC
CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDRV
PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC

CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY₁
Y₂QLL (SEQ ID NO:55).

В некоторых вариантах осуществления Y₁ представляет собой L. В некоторых вариантах осуществления Y₂ представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления оба Y₁ и Y₂ отсутствуют.

В другом аспекте изобретение относится к полипептиду, содержащему вариант програнулина, который содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной X₁X₂X₃ в позициях, соответствующих остаткам 574–576 SEQ ID NO:2, где каждый из X₁, X₂ и X₃ независимо представляет собой аминокислоту, а вместе они не представляют собой QLL. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина в полипептиде имеет по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности с SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина в полипептиде содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности с SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта вариант програнулина в полипептиде содержит последовательность:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
QDTVCDLIQSKCLSKENATDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDV
PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX₁X₂X₃
(SEQ ID NO:3).

где X₁X₂X₃ не представляет собой QLL.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта X₁ представляет собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P или V. В некоторых вариантах осуществления X₂ представляет собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R. В некоторых вариантах осуществления X₃ представляет собой L, Y или P.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1IL . В определенных вариантах осуществления X_1 в X_1IL может представлять собой R, H, K, E, P, N, F или Y (например, R, H, K, E или P).

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1FL . В определенных вариантах осуществления X_1 в X_1FL может представлять собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y или P.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1QL . В определенных вариантах осуществления X_1 в X_1QL может представлять собой R, H, K, D, E, N, L, F, Y или Q.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой PX_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в PX_2L может представлять собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R (например, H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I или F).

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой QX_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в QX_2L может представлять собой R, H, K, D, E, N, P, Y или Q.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой VX_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в VX_2L может представлять собой V или T.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1X_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в X_1X_2L представляет собой A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой PII . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой PFL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой QQL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой VVL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой VTL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой PPL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой PYL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой QRL . В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой QHL .

В другом аспекте изобретение относится к полипептиду, содержащему вариант програнулина, причем вариант програнулина имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной Y_1Y_2QLL (SEQ ID NO:137), которая является смежной и С-концевой относительно позиции, соответствующей остатку 576 SEQ ID NO:2, где Y_1 представляет собой L или отсутствует,

а Y₂ представляет собой R или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит вариант програнулина, имеющий последовательность:

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTVCDLIQSKCLSKENATDLDLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHHCPCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALKRQDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY₁
 Y₂QLL (SEQ ID NO:55).

В некоторых вариантах осуществления Y₁ представляет собой L. В некоторых вариантах осуществления Y₂ представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления оба Y₁ и Y₂ отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе полипептид дополнительно содержит Fc-полипептид, который связан с вариантом програнулина. С вариантом програнулина может быть связан N-конец или C-конец Fc-полипептида. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид связан с вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления длина полипептидного линкера составляет 1–50 (например, 1–45, 1–40, 1–35, 1–30, 1–25, 1–20, 1–15, 1–10, 1–5, 5–50, 10–50, 15–50, 20–50, 25–50, 30–50, 35–50, 40–50, 45–50, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер, например, богатый глицином линкер. В определенных вариантах осуществления богатый глицином линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:90) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:91).

В определенных вариантах осуществления Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:64–67. В определенных вариантах осуществления Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с рецептором трансферрина (TfR; т.е. TfR-связывающий Fc-полипептид). В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид (например, TfR-связывающий Fc-полипептид) содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:68–87 и 129–132 (например, SEQ ID NOS:70, 75, 80, 85 и 129–132).

В конкретных вариантах осуществления Fc-полипептид (например, TfR-связывающий Fc-полипептид) содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 и 129–132.

В другом аспекте изобретение относится к слитому белку, содержащему: (a) описанный в данном документе вариант програнулина; (b) первый Fc-полипептид, который связан с вариантом програнулина по (a); и (c) второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта второй Fc-полипептид также связан с програнулином дикого типа или описанным в данном документе вариантом програнулина (т.е. вторым полипептидом програнулина). Вариант програнулина, связанный с первым Fc-полипептидом, и вариант програнулина, связанный со вторым Fc-полипептидом, могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид связан с вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером и/или второй Fc-полипептид связан с вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления длина полипептидного линкера составляет 1–50 (например, 1–45, 1–40, 1–35, 1–30, 1–25, 1–20, 1–15, 1–10, 1–5, 5–50, 10–50, 15–50, 20–50, 25–50, 30–50, 35–50, 40–50, 45–50, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер, например, богатый глицином линкер. В определенных вариантах осуществления богатый глицином линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:90) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:91).

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта С-конец первого Fc-полипептида связан с N-концом програнулина и/или С-конец второго Fc-полипептида связан с N-концом варианта програнулина.

В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или второй Fc-полипептид специфически связывается с рецептором трансферрина. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид или второй Fc-полипептид независимо содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:68–87 и 129–132. В определенных вариантах осуществления первый Fc-полипептид или второй Fc-полипептид независимо содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 и 129–132.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации. Например первый Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и

Y407V, а второй Fc-полипептид содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид независимо содержит модификации, которые снижают эффекторную функцию. В определенных вариантах осуществления модификации, которые снижают эффекторную функцию, представляют собой замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:64–67. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:68–87 и 129–132 (например, SEQ ID NOS:70, 75, 80, 85 и 129–132).

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта первый Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V и замены L234A и L235A, а второй Fc-полипептид содержит замену T366W и замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит замену T366W и замены L234A и L235A, а второй Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V и замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта шарнирная область или ее часть связана с первым Fc-полипептидом и/или вторым Fc-полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления K_D в отношении связывания сортилина слитого белка составляет менее чем около 100 нМ (например, менее чем около 95 нМ, 90 нМ, 85 нМ, 80 нМ, 75 нМ, 70 нМ, 65 нМ, 60 нМ, 55 нМ, 50 нМ, 45 нМ или 40 нМ). В некоторых вариантах осуществления K_D в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем 10-кратное снижение связывания сортилина по сравнению со слитым белком, содержащим SEQ ID NO:2 в первом полипептиде. В некоторых вариантах осуществления K_D в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем 5-кратное снижение связывания сортилина по сравнению со слитым белком, содержащим SEQ ID NO:2 в первом полипептиде.

В некоторых вариантах осуществления EC50 в отношении связывания сортилина слитого белка составляет менее чем около 25 нМ (например, менее чем около 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ, 1,5 нМ или 1 нМ). В конкретных вариантах осуществления EC50 в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует

менее чем 10-кратное снижение связывания сортилина по сравнению со слитым белком, содержащим SEQ ID NO:2 в первом полипептиде. В определенных вариантах осуществления EC50 измеряют методом ELISA, как описано в данном документе (например, как описано в примере 4).

В некоторых вариантах осуществления EC50 в отношении связывания сортилина описанного в данном документе слитого белка демонстрирует менее чем 10-кратное снижение связывания сортилина по сравнению с эталонным слитым белком, причем эталонный слитый белок содержит (i) первый полипептид, содержащий SEQ ID NO:2, и (ii) второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления EC50 в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем 10-кратное снижение связывания сортилина по сравнению с эталонным слитым белком, причем эталонный слитый белок содержит (i) первый полипептид, содержащий SEQ ID NO:108, и (ii) второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления эталонный слитый белок вырабатывается в клетке НЕК. В некоторых вариантах осуществления эталонный слитый белок очищают по существу так, как описано в данном документе (например, как описано в примере 1).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок вырабатывается в клетке яичника китайского хомяка (СНО). В конкретных вариантах осуществления не происходит расщепление более 50% (например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) слитого белка на С-конце части варианта програнулина слитого белка. В некоторых вариантах осуществления слитые белки очищают из клеточной культуральной среды, содержащей экспрессирующие слитый белок клетки, одним или более методами, выбранными из группы, состоящей из хроматографии с протеином А, ионообменной хроматографии, колоночной хроматографии с гидрофобным взаимодействием и диализа. В некоторых вариантах осуществления слитый белок очищают по существу так, как описано в данном документе (например, как описано в примере 1).

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вариант програнулина или слитый белок, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей множество слитых белков, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления более

50% (например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%) из множества слитых белков содержат интактный С-конец в варианте програнулина слитого белка.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, БАС или связанное с програнулином расстройство, включающему введение субъекту описанного в данном документе варианта програнулина, описанного в данном документе слитого белка или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание.

В другом аспекте изобретение относится к способу повышения количества програнулина или его варианта у субъекта, включающему введение субъекту описанного в данном документе варианта програнулина, описанного в данном документе слитого белка или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание, атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, БАС или связанное с програнулином расстройство. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание.

В другом аспекте изобретение относится к способу снижения активности катепсина D у субъекта, включающему введение субъекту описанного в данном документе варианта програнулина, описанного в данном документе слитого белка или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание, атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, БАС или связанное с програнулином расстройство. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание.

В другом аспекте изобретение относится к способу повышения лизосомной деградации или улучшения лизосомной функции у субъекта, включающему введение субъекту описанного в данном документе варианта програнулина, описанного в данном документе слитого белка или описанной в данном документе фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание, атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, БАС или связанное с програнулином расстройство. В конкретных вариантах осуществления субъект имеет нейродегенеративное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов нейродегенеративное заболевание представляет собой лобно-височную деменцию (ЛВД), нейрональный цероидный липофусциноз (НЦЛ), болезнь Ниманна-Пика типа А (НПА), болезнь Ниманна-Пика типа В (НПВ), болезнь Ниманна-Пика типа С (НПС), C9ORF72-

ассоциированный боковой амиотрофический склероз (БАС)/ЛВД, спорадический БАС, болезнь Альцгеймера (БА) или болезнь Паркинсона. В определенных вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой ЛВД.

Варианты осуществления также относятся к способам лечения ЛВД у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение субъекту описанного в данном документе варианта програнулина или слитого белка. В некоторых вариантах осуществления ЛВД представляет собой C9ORF72-ассоциированную ЛВД.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеперечисленных способов субъект имеет мутацию в гене, кодирующем програнулин.

В другом аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в данном документе вариант или полипептид програнулина. В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему описанный в данном документе полинуклеотид. В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей описанный в данном документе полинуклеотид или вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин дополнительно содержит полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй Fc-полипептид. В определенных вариантах осуществления второй Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 61 и 64–87. В другом аспекте изобретение относится к способу получения полипептида, включающему культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется полипептид, кодируемый описанным в данном документе полинуклеотидом.

В другом аспекте предложен способ оценки соединения или мониторинга ответа субъекта на вариант програнулина или слитый белок, описанный в данном документе, или его фармацевтическую композицию или схему введения доз, для лечения заболевания или расстройства, описанного в данном документе, включающий: (a) измерение содержания одного или более видов бис(моноацилглицеро)фосфата (BMP) и/или глюкозилсфингозина (GlcSph) в тестируемом образце от субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство, причем тестируемый образец обрабатывали или субъекта лечили соединением или его фармацевтической композицией (например, лечили слитым белком, описанным в данном документе); (b) сравнение разницы в содержании между одним или более видами BMP и/или GlcSph, измеренными в (a), и одним или более эталонными значениями; и (c) определение из сравнения, улучшает ли соединение, фармацевтическая композиция или схема введения их дозы (например, слитый белок, описанный в данном документе) уровни одного или более видов BMP и/или уровень GlcSph, для лечения заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе способы дополнительно включают обработку другого тестируемого образца или лечение другого субъекта другим соединением и выбор соединения-кандидата, которое улучшает уровень одного или более видов BMP и/или уровень GlcSph.

В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе способы дополнительно включают (d) поддержание или корректировку количества или частоты введения соединения (например, слитого белка, описанного в данном документе) в тестируемый образец или субъекту; и (e) введение соединения в тестируемый образец или субъекту.

В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе способы дополнительно включают введение субъекту описанного в данном документе варианта програнулина для повышения уровней одного или более видов BMP и/или уровня GlcSph для лечения связанного с програнулином расстройства. В некоторых вариантах осуществления после лечения происходит смягчение по меньшей мере одного из одного или более признаков или симптомов связанного с програнулином расстройства.

В некоторых вариантах осуществления лечение включает введение субъекту описанного в данном документе слитого белка. В некоторых вариантах осуществления лечение включает введение библиотеки соединений множеству субъектов или в множество тестируемых образцов.

В некоторых вариантах осуществления как содержание одного или более видов BMP, так и содержание GlcSph можно измерять из одного тестируемого образца от субъекта. В других вариантах осуществления от субъекта может быть получено два тестируемых образца (например, получено в одно время или в разное время), из которых один тестируемый образец можно использовать для измерения содержания одного или более видов BMP, тогда как другой тестируемый образец можно использовать для измерения содержания GlcSph. Два тестируемых образца могут быть получены из одной и той же жидкости, клетки или ткани субъекта (например, цельной крови, плазмы, клетки, ткани, сыворотки, цереброспинальной жидкости, интерстициальной жидкости, мокроты, мочи или лимфы). В других вариантах осуществления два тестируемых образца могут быть получены из разных жидкостей, клеток или тканей субъекта, например, один образец может представлять собой плазму, тогда как другой образец может представлять собой ткань головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления эталонное значение измеряют в эталонном образце, полученном от эталонного субъекта или популяции эталонных субъектов (например, среднее значение). В некоторых вариантах осуществления эталонное значение

представляет собой содержание одного или более видов ВМР, измеренное в эталонном образце. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение представляет собой содержание GlcSph, измеренное в эталонном образце. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец представляет собой такой же тип клетки, ткани или жидкости, что и тестируемый образец. В некоторых вариантах осуществления измеряют по меньшей мере два эталонных значения для разных типов клеток, тканей или жидкости.

В некоторых вариантах осуществления эталонный образец представляет собой здоровый контроль. В некоторых вариантах осуществления эталонный субъект или популяция эталонных субъектов не имеют связанное с програнулином расстройство или сниженный уровень програнулина. В конкретных вариантах осуществления эталонный субъект или популяция эталонных субъектов не имеют каких-либо признаков или симптомов такого расстройства.

В некоторых вариантах осуществления уровни видов ВМР повышены в макрофагах из костного мозга (МКМ), которые получены *in vitro* из клеток костного мозга субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройством.

В некоторых вариантах осуществления уровни видов ВМР снижены в печени, головном мозге, спинномозговой жидкости, плазме или моче у субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройством.

В некоторых вариантах осуществления уровень GlcSph повышен, например, в цельной крови, плазме, клетке, ткани, сыворотке, цереброспинальной жидкости, интерстициальной жидкости, мокроте, моче, лимфе или их комбинации субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройством. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в плазме субъекта.

В некоторых вариантах осуществления уровень GlcSph повышен в головном мозге, например, в лобной доле и/или височной доле головного мозга субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройством. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в одной или более областях лобной доли,

например, верхней лобной извилине, средней лобной извилине, нижней лобной извилине и/или прецентральной извилине.

В некоторых вариантах осуществления уровень GlcSph повышен в клетке, такой как клетка крови, клетка головного мозга, мононуклеарная клетка периферической крови (МКПК), макрофаг костного мозга (МКМ), клетка пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), эритроцит, лейкоцит, нервная клетка, клетка микроглии, клетка коры головного мозга, клетка спинного мозга, клетка костного мозга, клетка печени, клетка почки, клетка селезенки, клетка легкого, клетка глаза, клетка ворсинок хориона, мышечная клетка, клетка кожи, фибробласт, клетка сердца, клетка лимфатического узла или их комбинация, субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройству. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в клетке крови. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в клетке головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления уровень GlcSph повышен в ткани, такой как ткань головного мозга, ткань коры головного мозга, ткань спинного мозга, ткань печени, ткань почки, мышечная ткань, ткань сердца, ткань глаза, ткань сетчатки, лимфатический узел, костный мозг, ткань кожи, ткань кровеносного сосуда, ткань легкого, ткань селезенки, ткань клапана или их комбинация, субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройству. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в ткани головного мозга, такой как ткань головного мозга из лобной доли или височной доли головного мозга субъекта. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в верхней лобной извилине, средней лобной извилине, нижней лобной извилине и/или прецентральной извилине лобной доли.

В дополнительных вариантах осуществления уровень GlcSph повышен в эндосоме, лизосоме, внеклеточной везикуле, экзосоме, микровезикуле или их комбинации субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, по сравнению со здоровым контролем или контролем, не имеющим отношения к связанному с програнулином расстройству.

В некоторых вариантах осуществления содержание видов BMP и/или GlcSph в тестируемом образце субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или

подверженного риску его развития, характеризуется по меньшей мере приблизительно 1,2-кратной, 1,5-кратной или 2-кратной разницей по сравнению с эталонным значением контроля, такого как здоровый контроль или контроль, не имеющий отношения к связанному с програнулином расстройству. В других вариантах осуществления содержание видов BMP и/или GlcSph в тестируемом образце субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, характеризуется от приблизительно 1,2-кратной до приблизительно 5-кратной (например, приблизительно 1,5-кратной, 2-кратной, 2,5-кратной, 3-кратной, 3,5-кратной, 4-кратной, 4,5-кратной или 5-кратной) разницей по сравнению с эталонным значением контроля, такого как здоровый контроль или контроль, не имеющий отношения к связанному с програнулином расстройству. В некоторых вариантах осуществления разница по сравнению с эталонным значением является от приблизительно 2-кратной до приблизительно 3-кратной (например, приблизительно 2-кратной, 2,1-кратной, 2,2-кратной, 2,3-кратной, 2,4-кратной, 2,5-кратной, 2,6-кратной, 2,7-кратной, 2,8-кратной, 2,9-кратной или 3-кратной). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет расстройство, связанное со сниженным уровнем програнулина, и/или один или более признаков или симптомов расстройства, связанного со сниженным уровнем програнулина.

В некоторых вариантах осуществления эталонное значение представляет собой значение для видов BMP и/или GlcSph до лечения. В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат в связи со сниженным уровнем програнулина или связанным с програнулином расстройством, а тестируемый образец включает один или более тестируемых образцов до лечения, которые получены от субъекта до начала лечения, и один или более тестируемых образцов после лечения, которые получены от субъекта после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение того, что субъект отвечает на лечение, когда содержание по меньшей мере одного из одного или более видов BMP и/или GlcSph после лечения демонстрирует улучшение по сравнению с одним или более видами BMP и/или GlcSph до лечения по сравнению со здоровым контролем.

В некоторых вариантах осуществления способ включает (a) измерение содержания одного или более видов BMP и/или GlcSph в тестируемом образце, полученном от субъекта; (b) обработку тестируемого образца или лечение субъекта соединением, фармацевтической композицией или схемой введения его доз (например, обработку тестируемого образца или лечение субъекта слитым белком Fc-димер:PGRN, описанным в данном документе); (c) измерение содержания одного или более видов BMP и/или GlcSph в тестируемом образце, полученном от прошедшего лечение субъекта, и (d) сравнение

содержания одного или более видов ВМР и/или GlcSph, измеренного на этапах (а) и (с); и (е) определение того, улучшает ли соединение или схема введения доз уровни ВМР и/или уровень GlcSph, для лечения связанного с програнулином расстройства.

В некоторых вариантах осуществления два или более тестируемых образца после лечения получают в разные моменты времени после начала лечения, а способ дополнительно включает определение того, что субъект отвечает на лечение, когда содержание по меньшей мере одного из одного или более видов ВМР, измеренное в образце после лечения, а) ниже в МКМ или б) выше в печени, головном мозге, цереброспинальной жидкости, плазме или моче, чем содержание соответствующих одного или более видов ВМР, измеренное в образце до лечения. В некоторых вариантах осуществления определяют, что субъект отвечает на лечение, когда содержание по меньшей мере одного из одного или более видов ВМР, измеренное в образце после лечения, является а) по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза меньшим в МКМ или б) по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза большим в печени, головном мозге, цереброспинальной жидкости, плазме или моче, чем содержание соответствующих одного или более видов ВМР, измеренное в образце до лечения.

В некоторых вариантах осуществления два или более тестируемых образца после лечения получают в разные моменты времени после начала лечения, а способ дополнительно включает определение того, что субъект отвечает на лечение, когда содержание GlcSph, измеренное в образце после лечения, ниже, например, в цельной крови, плазме, клетке, ткани, сыворотке, цереброспинальной жидкости, интерстициальной жидкости, мокроте, моче или лимфе, чем содержание GlcSph, измеренное в образце до лечения. В некоторых вариантах осуществления определяют, что субъект отвечает на лечение, когда содержание GlcSph, измеренное в образце после лечения, по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза (например, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 5,5 раза, 6 раз, 6,5 раза, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 8,5 раза, 9 раз, 9,5 раза или 10 раз) ниже например, в цельной крови, плазме, клетке, ткани, сыворотке, цереброспинальной жидкости, интерстициальной жидкости, мокроте, моче или лимфе, чем содержание GlcSph, измеренное в образце до лечения.

В некоторых вариантах осуществления улучшение уровня видов ВМР и/или уровня GlcSph представляет собой улучшение относительно уровня видов ВМР и/или уровня GlcSph до лечения по сравнению с эталонным значением контроля, такого как здоровый контроль или контроль, не имеющий отношения к связанному с програнулином расстройству. В некоторых вариантах осуществления улучшение уровня видов ВМР и/или уровня GlcSph ближе по значению к контрольному, чем уровень видов ВМР и/или

уровень GlcSph до лечения. В некоторых вариантах осуществления улучшение уровня видов ВМР и/или уровня GlcSph характеризуется разницей по сравнению с контролем менее 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых вариантах осуществления улучшение уровня видов ВМР и/или уровня GlcSph характеризуется разницей по сравнению со здоровым контролем менее 10% или 5%. В некоторых вариантах осуществления улучшение уровня видов ВМР и/или уровня GlcSph характеризуется разницей по сравнению со здоровым контролем менее 5%.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение того, что субъект отвечает на лечение, когда содержание по меньшей мере одного из одного или более видов ВМР и/или GlcSph, измеренное в по меньшей мере одном из одного или более тестируемых образцов после лечения, является приблизительно таким же, что и соответствующее значение для здорового контроля.

В некоторых вариантах осуществления тестируемый или эталонный образец или одно или более эталонных значений включают клетку, ткань, цельную кровь, плазму, сыворотку, цереброспинальную жидкость, интерстициальную жидкость, мокроту, мочу, кал, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, лимфу, сперму, грудное молоко, околоплодную жидкость или их комбинацию или относятся к ним. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК), МКМ, клетку пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), клетку крови, эритроцит, лейкоцит, нервную клетку, клетку микроглии, клетку головного мозга, клетку коры головного мозга, клетку спинного мозга, клетку костного мозга, клетку печени, клетку почки, клетку селезенки, клетку легкого, клетку глаза, клетку ворсинок хориона, мышечную клетку, клетку кожи, фибробласт, клетку сердца, клетку лимфатического узла или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой культивируемую клетку. В некоторых вариантах осуществления культивируемая клетка представляет собой МКМ или клетку ПЭС.

В некоторых вариантах осуществления ткань включает ткань головного мозга, ткань коры головного мозга, ткань спинного мозга, ткань печени, ткань почки, мышечную ткань, ткань сердца, ткань глаза, ткань сетчатки, лимфатический узел, костный мозг, ткань кожи, ткань кровеносного сосуда, ткань легкого, ткань селезенки, ткань клапана или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления тестируемый и/или эталонный образец очищен из клетки и/или ткани и содержит эндосому, лизосому, внеклеточную везикулу, экзосому, микровезикулу или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления один или более видов ВМР включают два или более видов ВМР. В некоторых вариантах осуществления один или более видов ВМР

включают BMP(16:0_18:1), BMP(16:0_18:2), BMP(18:0_18:0), BMP(18:0_18:1), BMP(18:1_18:1), BMP(16:0_20:3), BMP(18:1_20:2), BMP(18:0_20:4), BMP(16:0_22:5), BMP(20:4_20:4), BMP(22:6_22:6), BMP(20:4_20:5), BMP(18:2_18:2), BMP(16:0_20:4), BMP(18:0_18:2), BMP(18:0e_22:6), BMP(18:1e_20:4), BMP(18:3_22:5), BMP(20:4_22:6), BMP(18:0e_20:4), BMP(18:2_20:4), BMP(18:1_22:6), BMP(18:1_20:4), BMP(18:0_22:6) или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления один или более видов BMP включают BMP(18:1_18:1), BMP(18:0_20:4), BMP(20:4_20:4), BMP(22:6_22:6), BMP(20:4_22:6), BMP(18:1_22:6), BMP(18:1_20:4), BMP(18:0_22:6), BMP(18:3_22:5) или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец включает культивируемую клетку, а один или более видов BMP включают BMP(18:1_18:1). В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец включает плазму, ткань, мочу, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) и/или ткань головного мозга или печени, а один или более видов BMP включают BMP(22:6_22:6). В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец включает ткань печени, а один или более видов BMP включают BMP(22:6_22:6), BMP(18:3_22:5) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец включает ЦСЖ или мочу, а один или более видов BMP включают BMP(22:6_22:6). В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец включает микроглию, а один или более видов BMP включают BMP(18:3_22:5).

В некоторых вариантах осуществления содержание одного или более видов BMP и/или GlcSph измеряют, используя жидкостную хроматографию в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). В некоторых вариантах осуществления для измерения содержания одного или более видов BMP и/или GlcSph на этапе (а) и/или для определения соответствующего эталонного значения используют внутренний стандарт BMP и/или GlcSph. В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт BMP и/или GlcSph включает виды BMP и/или GlcSph, которые естественным образом не присутствуют у субъекта и/или эталонного субъекта или популяции эталонных субъектов. В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт BMP включает BMP(14:0_14:0). В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт GlcSph включает меченный дейтерием GlcSph.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет расстройство, связанное с экспрессией, процессингом, гликозилированием, клеточным поглощением, миграцией и/или функцией програнулина, или подвержен риску его развития. В некоторых вариантах осуществления субъект и/или эталонный субъект или популяция эталонных субъектов имеют сниженный уровень програнулина и/или расстройство, связанное со сниженным

уровнем програнулина, а тестируемый образец приводят в контакт с соединением-кандидатом (например, слитым белком Fc-димер:PGRN, описанным в данном документе). В некоторых вариантах осуществления субъект и/или эталонный субъект или популяция эталонных субъектов имеют один или более признаков или симптомов расстройства, связанного со сниженным уровнем програнулина. В некоторых вариантах осуществления субъект и/или эталонный субъект или популяция эталонных субъектов имеют мутацию в гене гранулина (*GRN*). В некоторых вариантах осуществления мутация в гене *GRN* снижает экспрессию и/или активность програнулина. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет атеросклероз, болезнь Гоше (например, болезнь Гоше типов 1, 2 или 3) или ВМД или подвержен риску их развития. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет расстройство, связанное с TDP-43 (например, БА или БАС), или подвержен риску их развития.

В некоторых вариантах осуществления субъект и/или эталонный субъект представляет собой человека, отличного от человека примата, грызуна, собаку или свинью.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен набор для мониторинга уровня варианта програнулина у субъекта. В некоторых вариантах осуществления набор содержит стандарт BMP и/или GlcSph для измерения содержания одного или более видов BMP и/или GlcSph в тестируемом образце, полученном от субъекта, и/или эталонном образце, полученном от эталонного субъекта или популяции эталонных субъектов. В некоторых вариантах осуществления стандарт BMP и/или GlcSph включает виды BMP и/или GlcSph, которые естественным образом не присутствуют у субъекта и/или эталонного субъекта. В некоторых вариантах осуществления стандарт BMP включает BMP(14:0_14:0). В некоторых вариантах осуществления стандарт GlcSph представляет собой меченный дейтерием GlcSph.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит реагенты для получения образца от субъекта и/или эталонного субъекта, обработки образца, измерения содержания одного или более видов BMP, измерения содержания GlcSph или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции по применению.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А и фиг. 1В приведены хроматограммы, демонстрирующие, что типовые слитые белки, описанные в данном документе, были очищены до более чем 98% чистоты.

На фиг. 2 приведена таблица, демонстрирующая термические свойства типовых слитых белков, описанных в данном документе, в разных буферах.

Фиг. 3 содержит хроматограммы, иллюстрирующие стабильность типовых слитых белков, описанных в данном документе, при замораживании/размораживании.

На фиг. 4 приведен график, иллюстрирующий связывание сортилина типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 5 приведен график, иллюстрирующий, что типовые слитые белки, описанные в данном документе, могут снижать уровни BMP *in vitro* в культивируемых клетках, полученных из костного мозга мышей *GRN KO/hTfR.KI*.

На фиг. 6А–6С приведены репрезентативные графики концентрации белка для типового слитого белка, описанного в данном документе, в плазме (7-дневный период) и в головном мозге и печени (7 дней после введения дозы) мышей *GRN KO/hTfR.KI*.

Фиг. 7А и 7В содержат репрезентативные графики уровней TREM2 в головном мозге и печени мышей *GRN KO/hTfR.KI* через 7 дней после введения дозы после введения типовых слитых белков, описанных в данном документе.

Фиг. 8А и 8В содержат репрезентативные графики уровней BMP в головном мозге и печени мышей *GRN KO/hTfR.KI* через 7 дней после введения дозы после введения типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 9 приведен график, иллюстрирующий, что слияние 1, описанное в данном документе, может снижать уровень GlcSph в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI*.

На фиг. 10 приведен график, иллюстрирующий, что слияние 1, описанное в данном документе, может снижать уровень GlcSph в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI*.

На фиг. 11 приведен график, иллюстрирующий, что слияние 1, описанное в данном документе, может корректировать уровни BMP di-18:1 у мышей *GRN KO/hTfR.KI*.

На фиг. 12 приведен график, иллюстрирующий, что слияние 1, описанное в данном документе, может корректировать уровни BMP di-22:6 у мышей *GRN KO/hTfR.KI*.

На фиг. 13 приведен график, иллюстрирующий, что слияние 1, описанное в данном документе, может корректировать активность глюкоцереброзидазы (GCase) в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* до уровней дикого типа через две недели после введения дозы.

На фиг. 14 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни белка в головном мозге для типовых слитых белков, описанных в данном документе, у мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; **** $p < 0,0001$.

На фиг. 15 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни белка в печени для типовых слитых белков, описанных в данном документе, у мышей *GRN KO/hTfR.KI*

после восьми еженедельных доз. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; ** $p < 0,01$ и **** $p < 0,0001$.

На фиг. 16 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни репрезентативных видов ВМР в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; ** $p < 0,01$ и **** $p < 0,0001$.

На фиг. 17 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни репрезентативных видов ВМР в ЦСЖ мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; * $p < 0,05$ и **** $p < 0,0001$.

На фиг. 18 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни репрезентативных видов ВМР в печени мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 19 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни репрезентативных видов ВМР в плазме мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 20 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни глюкозилфингозина (GlcSph) в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; **** $p < 0,0001$.

На фиг. 21 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни глюкозилфингозина (GlcSph) в печени мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 22 приведен график рассеяния, иллюстрирующий уровни нейрофиламента (Nf-L) в ЦСЖ мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 23 приведен график рассеяния, иллюстрирующий относительные уровни Trem2 в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; * $p < 0,05$ и **** $p < 0,0001$.

На фиг. 24 приведен график рассеяния, иллюстрирующий относительные уровни CD68 в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе. На фигуре представлены среднее \pm СПС и р-значения: однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта; ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

На фиг. 25 приведен график рассеяния, иллюстрирующий относительные уровни Iba1 в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 26 приведен график рассеяния, иллюстрирующий относительные уровни GFAP в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 27 приведена тепловая карта, иллюстрирующая относительные изменения содержания видов ВМР и липидов у мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типовых слитых белков, описанных в данном документе.

На фиг. 28–30 приведены графики рассеяния, иллюстрирующие репрезентативные виды ВМР в нейронах, астроцитах и клетках микроглии мышей *GRN KO/hTfR.KI* после восьми еженедельных доз типового слитого белка, описанного в данном документе.

Подробное описание сущности изобретения

Введение

Повышение уровней програнулина может быть полезным для лечения ряда заболеваний у субъектов, в частности, когда субъект имеет сниженные уровни програнулина. Мы обнаружили, что С-конец програнулина дикого типа отщепляется при экспрессии в клетках СНО, что приводит к нарушению связывания сортилина. Сортилин связывается непосредственно с програнулином и вовлечен в поглощение и миграцию програнулина в клеточные лизосомы. Чтобы уменьшить это отщепление, мы разработали варианты програнулина, которые имеют аминокислотные модификации на С-конце, а также слитые белки, которые содержат один или более вариантов програнулина, связанных с Fc-полипептидом. В частности, определенные варианты, описанные в данном документе, имеют одну или более аминокислотных замен в последовательности QLL на С-конце програнулина дикого типа или имеют дополнительные аминокислоты, добавленные к С-концу, по сравнению с програнулином дикого типа, и что важно, эти варианты програнулина могут поддерживать связывание сортилина. Описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки, следовательно, подходят для лечения таких заболеваний, включая нейродегенеративное заболевание (например, ЛВД), атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, ВМД или связанное с програнулином

расстройство.

Помимо разработки этих вариантов програнулина мы также разработали слитые белки, которые содержат вариант програнулина, слитый с Fc-молекулой. В некоторых случаях слитый белок содержит димерный Fc-полипептид, причем по меньшей мере один из мономеров Fc-полипептида связан с вариантом програнулина. Fc-полипептиды могут повышать уровни програнулина и, в некоторых случаях, могут быть модифицированы для придания белку дополнительных функциональных свойств.

Также мы разработали слитые белки, которые облегчают доставку програнулина или его варианта через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Эти белки содержат Fc-полипептид и модифицированный Fc-полипептид, которые образуют димер, и програнулин или его вариант, связанный с Fc-областью и/или модифицированной Fc-областью. Модифицированная Fc-область может специфически связываться с рецептором ГЭБ, таким как TfR. При введении субъекту слитый белок связывается с рецептором TfR, который находится на эндотелии образующем ГЭБ. Слитый белок может быть трансцитозирован через ГЭБ с повышением, таким образом, его концентрации в головном мозге по сравнению, например, с

Програнулин (PGRN) (также известный как проэпителин и акрогранин) представляет собой богатый цистеином белок, кодируемый геном *GRN*, который картирован на хромосоме 17q21 человека. Програнулин представляет собой лизосомный белок, а также секретлируемый белок, состоящий из семи с половиной tandemных повторов консервативных пептидов гранулина, каждый из которых имеет длину около 60 аминокислот и может высвобождаться посредством расщепления различными внеклеточными протеазами (например, эластазой) и лизосомными протеазами (например, катепсином L) (Као et al., *Nat Rev Neurosci.* 18(6):325-333, 2017). В целом считается, что програнулин играет как клеточно-автономные, так и не автономные роли в контроле врожденного иммунитета, а также функции лизосом, где он регулирует активность и уровни различных катепсинов и других гидролаз (Као et al., выше). Програнулин также имеет нейротрофическую функцию и способствует разрастанию нейритов и выживаемости нейронов (Као et al., *supra*).

Определения

В контексте данного документа формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «полипептид» может включать две или более таких молекул и т.п.

В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно» при использовании для модификации количества, указанного в числовом значении или

диапазоне, указывают на то, что числовое значение, а также разумные отклонения от этого значения, известные специалисту в данной области техники, например $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$, находятся в рамках указанного значения.

«Програнулин» или «PRGN» относится к богатому цистеином лизосомному белку, кодируемому геном *GRN*. Програнулин может содержать последовательность програнулина человека, например, последовательность SEQ ID NO:1 или 2. Програнулин может содержать последовательность SEQ ID NO:1, в которой первые 17 аминокислот относятся к сигнальному пептиду. Програнулин может представлять собой зрелый програнулин, в котором сигнальный пептид из 17 аминокислот отщеплен. Зрелый програнулин может содержать последовательность SEQ ID NO:2. Програнулин может содержать последовательность от отличного от человека вида, например мыши (номер доступа № NP_032201.2), крысы (NP_058809.2 или NP_001139314.1) и шимпанзе (XP_016787144.1 или XP_016787145.1), в любой форме, которая содержит сигнальный пептид, или в зрелой форме.

«Вариант програнулина» или «вариант PRGN» относится к варианту последовательности програнулина дикого типа. Вариант програнулина может иметь функции, сходные или практически одинаковые с функциями програнулина дикого типа, например, когда вариант програнулина также связывает сортилин или просапозин, регулирует активность и уровни различных лизосомных белков (например, катепсинов), способствует разрастанию нейритов и выживаемости нейронов, и/или любую другую функцию, описанную в данном документе.

Термин «связанное с програнулином расстройство» относится к любому патологическому состоянию, связанному с програнулином, включая экспрессию, процессинг, гликозилирование, клеточное поглощение, миграцию и/или функцию. Термин «расстройство, связанное со сниженным уровнем програнулина» относится к любому патологическому состоянию, которое является прямым или косвенным следствием уровня програнулина, недостаточного для обеспечения (т.е. слишком низкого для обеспечения) нормальной физиологической функции в клетке, ткани и/или организме субъекта, а также к предшественникам такого состояния. Например, связанное с програнулином расстройство может быть вызвано или связано с мутацией в гене програнулина (*GRN*). В некоторых вариантах осуществления связанное с програнулином расстройство представляет собой нейродегенеративное заболевание (например, ЛВД) или лизосомальную болезнь накопления.

Термин «уровень програнулина» относится к количеству, концентрации и/или уровню активности програнулина, который присутствует у субъекта или в образце

(например, образце, полученном от субъекта). Уровень програнулина может относиться к абсолютному количеству, концентрации и/или уровню активности програнулина, который присутствует, или может относиться к относительному количеству, концентрации и/или уровню активности. Этот термин также относится к присутствующим количеству или концентрации програнулина и/или мРНК програнулина (например, экспрессируемой из гена *GRN*).

Термин «макрофаг костного мозга» или «МКМ» относится к клетке макрофага, которая получена или происходит *in vitro* из костного мозга млекопитающего (например, костного мозга, полученного от субъекта). В качестве неограничивающего примера МКМ можно получать путем культивирования недифференцированных клеток костного мозга в присутствии цитокина, такого как макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF).

В контексте этого изобретения «рецептор трансферрина» или «TfR» относится к белку рецептора трансферрина 1. Полипептидная последовательность человеческого рецептора трансферрина 1 приведена в SEQ ID NO:109. Также известны последовательности белка рецептора трансферрина 1 других видов (например, шимпанзе, номер доступа XP_003310238.1; макака-резуса, NP_001244232.1; собаки, NP_001003111.1; крупного рогатого скота, NP_001193506.1; мыши, NP_035768.1; крысы, NP_073203.1; и курицы, NP_990587.1). Термин «рецептор трансферрина» также включает аллельные варианты типовых эталонных последовательностей, например, человеческих последовательностей, которые кодируются геном в хромосомном локусе белка рецептора трансферрина 1. Полноразмерный белок рецептора трансферрина содержит короткую N-концевую внутриклеточную область, трансмембранную область и большой внеклеточный домен. Внеклеточный домен характеризуется тремя доменами: протеазоподобным доменом, спиральным доменом и апикальным доменом.

В контексте данного документа термин «Fc-полипептид» относится к C-концевой области встречающегося в природе полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, который характеризуется укладкой Ig как структурный домен. Fc-полипептид содержит последовательности константной области, включая по меньшей мере домен CH2 и/или домен CH3, и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области. Как правило, Fc-полипептид не содержит вариабельную область.

«Модифицированный Fc-полипептид» относится к Fc-полипептиду, который имеет по меньшей мере одну мутацию, например замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью Fc-полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа, но сохраняет общую укладку Ig или структуру нативного Fc-полипептида.

В контексте данного документа термин «Fc-полипептидный димер» относится к димеру из двух Fc-полипептидов. В некоторых вариантах осуществления два Fc-полипептида димеризуются за счет взаимодействия между двумя доменами CH3. Если шарнирные области или части шарнирных областей присутствуют в двух Fc-полипептидах, между шарнирными областями двух димеризующихся Fc-полипептидов также могут образовываться одна или более дисульфидных связей.

«Модифицированный Fc-полипептидный димер» относится к димеру из двух Fc-полипептидов, в котором по меньшей мере один Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид, который имеет по меньшей мере одну мутацию, например замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью Fc-полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа. Например, модифицированный Fc-полипептидный димер специфически связывает TfR и содержит по меньшей мере один модифицированный Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере одну мутацию, например замену, делецию или вставку, по сравнению с последовательностью Fc-полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина дикого типа.

В контексте данного документа термины «домен CH3» и «домен CH2» относятся к полипептидам домена константной области иммуноглобулина. В целях этой заявки полипептид домена CH3 относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 341 приблизительно до позиции 447, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, а полипептид домена CH2 относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 231 приблизительно до позиции 340, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, и не содержит последовательности шарнирной области. Полипептиды доменов CH2 и CH3 также могут быть пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в которой нумерация доменов CH2 соответствует 1–110, а нумерация доменов CH3 соответствует 1–107, согласно Научной системе нумерации IMGT (веб-сайт IMGT). Домены CH2 и CH3 являются частью Fc-области иммуноглобулина. Fc-область относится к сегменту аминокислот приблизительно до позиции 231 приблизительно до позиции 447, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, но в контексте данного документа может включать по меньшей мере часть шарнирной области антитела. Иллюстративной последовательностью шарнирной области является шарнирная последовательность IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:88).

Термины «дикого типа», «нативный» и «встречающийся в природе» по отношению к домену CH3 или CH2 используются в данном документе для обозначения домена, который имеет последовательность, встречающуюся в природе.

В контексте этого изобретения термин «мутант» в отношении мутантного полипептида или мутантного полинуклеотида используется взаимозаменяемо с термином «вариант». Вариант по отношению к заданной эталонной последовательности домена СНЗ или СН2 дикого типа может включать встречающиеся в природе аллельные варианты. «Не встречающийся в природе» домен СНЗ или СН2 относится к варианту или мутантному домену, который не присутствует в клетке в природе и который получают путем генетической модификации, например с помощью технологии генной инженерии или методик мутагенеза, нативного полинуклеотида или полипептида домена СНЗ или домена СН2. «Вариант» включает любой домен, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную мутацию по отношению к дикому типу. Мутации могут включать замены, вставки и делеции.

Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам.

Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии подвергаются модификации, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аминокислотные аналоги представляют собой соединения, которые обладают такой же базовой химической структурой, что и встречающимся в природе аминокислоты, т.е. α -углерод, который связан с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа, например, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют сходную базовую химическую структуру со встречающимися в природе аминокислотами. «Аминокислотные миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте.

Встречающиеся в природе α -аминокислоты включают, без ограничения, аланин (Ala), цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и их комбинации. Стереоизомеры встречающихся в природе α -аминокислот включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-

аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser), D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации.

В данном документе аминокислоты могут быть обозначены их общеизвестными трехбуквенными символами или однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Термины «полипептид» и «пептид» взаимозаменяемо используются в данном документе для обозначения полимера из аминокислотных остатков в одной цепи. Эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам. Аминокислотные полимеры могут включать только L-аминокислоты, только D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот.

В контексте данного документа термин «белок» относится к полипептиду, или димеру (т.е. двум), или мультимеру (т.е. трем или более) из одноцепочечных полипептидов. Одноцепочечные полипептиды белка могут быть соединены ковалентной связью, например, дисульфидной связью или посредством нековалентных взаимодействий.

Термин «консервативная замена», «консервативная мутация» или «консервативно модифицированный вариант» относится к изменению, которое приводит к замене аминокислоты другой аминокислотой, которая может быть отнесена к категории, характеризующейся аналогичным признаком. Примеры категорий консервативных аминокислотных групп, определяемых таким образом, могут включать: «заряженную/полярную группу», включая Glu (глутаминовую кислоту или E), Asp (аспарагиновую кислоту или D), Asn (аспарагин или N), Gln (глутамин или Q), Lys (лизин или K), Arg (аргинин или R) и His (гистидин или H); «ароматическую группу», включая Phe (фенилаланин или F), Tyr (тирозин или Y), Trp (триптофан или W) и (гистидин или H); и «алифатическую группу», включая Gly (глицин или G), Ala (аланин или A), Val (валин или V), Leu (лейцин или L), Ile (изолейцин или I), Met (метионин или M), Ser (серин или S), Thr (треонин или T) и Cys (цистеин или C). Внутри каждой группы также можно выделить подгруппы. Например, группу заряженных или полярных аминокислот можно подразделить на подгруппы, включающие: «положительно заряженную подгруппу», включающую Lys, Arg и His; «отрицательно заряженную подгруппу», включающую Glu и Asp; и «полярную подгруппу», включающую Asn и Gln. В другом примере ароматическую

или циклическую группу можно подразделить на подгруппы, включающие: «подгруппу азотного кольца», включающую Pro, His и Trp; и «фенильную подгруппу», включающая Phe и Tyr. В другом дополнительном примере алифатическую группу можно подразделить на подгруппы, например, «алифатическую неполярную подгруппу», включающую Val, Leu, Gly и Ala; и «алифатическую слабополярную подгруппу», включающую Met, Ser, Thr и Cys. Примеры категорий консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот в подгруппах, указанных выше, такие как, без ограничения: Lys вместо Arg или наоборот, так, чтобы можно было сохранить положительный заряд; Glu вместо Asp или наоборот, так, чтобы можно было сохранить отрицательный заряд; Ser вместо Thr или наоборот, так, чтобы можно было сохранить свободный -ОН; и Gln вместо Asn или наоборот, так, чтобы можно было сохранить свободный -NH₂. В некоторых вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты заменяют на встречающуюся в природе гидрофобную аминокислоту, например, в активном сайте, чтобы сохранить гидрофобность.

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков, например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или более, которые являются идентичными в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, согласно определению с помощью алгоритма сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуальной оценки.

Для сравнения последовательностей полипептидов, как правило, одна аминокислотная последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание можно проводить, используя различные методы, доступные специалисту в данной области техники, например визуальное выравнивание, или используя общедоступное программное обеспечение с использованием известных алгоритмов для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) или Megalign (DNASTAR). Специалист в данной области техники может определить параметры, используемые для выравнивания для достижения максимального выравнивания. Для сравнения полипептидных последовательностей в целях данной заявки используют алгоритм BLASTP стандартного BLAST для белков для выравнивания двух белковых последовательностей с параметрами

по умолчанию.

Термины «соответствующий», «определенный со ссылкой на» или «пронумерованный со ссылкой на», используемые в контексте идентификации заданного аминокислотного остатка в полипептидной последовательности, относятся к позиции остатка указанной эталонной последовательности, когда заданную аминокислотную последовательность максимально выравнивают и сравнивают с эталонной последовательностью. Таким образом, например, аминокислотный остаток в модифицированном Fc-полипептиде «соответствует» аминокислоте в области SEQ ID NO:61, когда этот остаток выровнен с аминокислотой в SEQ ID NO:61 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO:61. Полипептид, который выровнен с эталонной последовательностью, не обязательно должен иметь ту же длину, что и эталонная последовательность.

В контексте данного документа «аффинность связывания» относится к силе нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например одним сайтом связывания на полипептиде и мишенью, например рецептором трансферрина, с которой он связывается. Таким образом, например, этот термин может относиться к 1:1 взаимодействиям между полипептидом и его мишенью, если иное не указано или явно не следует из контекста. Аффинность связывания можно определить количественно путем измерения равновесной константы диссоциации (K_D), которая относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), разделенной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ M⁻¹). K_D можно определить путем измерения кинетики образования и диссоциации комплексов, например, используя методы поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например, систему Biacore™; анализы кинетического исключения, такие как KinExA®; и биослойную интерферометрию (например, с использованием платформы ForteBio® Octet®). В контексте данного документа термин «аффинность связывания» включает не только формальную аффинность связывания, такую как та, которая отражает 1:1 взаимодействия между полипептидом и его мишенью, но также кажущуюся аффинность, для которой рассчитывают K_D , которая может отражать avidное связывание.

Выражение «специфически связывается» или «избирательно связывается» с мишенью, например рецептором трансферрина, в отношении полипептида, содержащего модифицированный Fc-полипептид, связывающий рецептор трансферрина, описанный в данном документе, относится к реакции связывания, посредством которой полипептид связывается с мишенью с большей аффинностью, большей avidностью и/или большей продолжительностью, чем он связывается с отличной по структуре мишенью, например, мишенью, не принадлежащей к семейству рецепторов трансферрина. В типичных

вариантах осуществления полипептид имеет по меньшей мере в 5 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз, 10000 раз или более большую аффинность в отношении рецептора трансферрина по сравнению с неродственной мишенью при поведении анализа в тех же условиях анализа аффинности. В контексте данного документа термин «специфическое связывание», «специфически связывается с» или «является специфическим в отношении» конкретной мишени (например, TfR) может быть проиллюстрирован, например, молекулой, имеющей равновесную константу диссоциации K_D в отношении мишени, с которой она связывается, например, 10^{-4} М или менее, например, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид специфически связывается с эпитопом на рецепторе трансферрина, который является консервативным среди видов (например, структурно консервативным среди видов), например консервативным между отличными от человека приматами и человеком (например структурно консервативным между отличными от человека приматами и человеком). В некоторых вариантах осуществления полипептид может связываться исключительно с рецептором трансферрина человека.

Термины «лечение», «лечить» и т.п. используют в данном документе в целом для обозначения получения необходимого фармакологического и/или физиологического эффекта. Термины «лечить» или «лечение» могут относиться к любым показателям успеха в лечении или облегчении заболевания, включая нейродегенеративные заболевания (например, ЛВД, НЦД, НПА, НПВ, НПС, C9ORF72-ассоциированные БАС/ЛВД, спорадический БАС, БА, болезнь Гоше (например, болезнь Гоше типов 1, 2 или 3) и болезнь Паркинсона), атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, ВМД и связанные с програнулином расстройства, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как ослабление, ремиссия, продление выживаемости пациентов, увеличение времени или частоты выживаемости, смягчение симптомов или повышение переносимости расстройства для пациента, замедление скорости дегенерации или ухудшения, или улучшение физического или психического состояния пациента. Лечение или облегчении симптомов может основываться на объективных или субъективных параметрах. Эффект лечения можно сравнивать с индивидом или группой индивидов, не проходящих лечение, или с тем же пациентом до лечения или в другое время во время лечения.

Термин «субъект», «индивид» и «пациент», взаимозаменяемо используемые в данном документе, относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, людей, отличных от человека приматов, грызунов (например, крыс, мышей и морских свинок), кроликов, коров, свиней, лошадей и другие виды млекопитающих. В одном

варианте осуществления пациент представляет собой человека.

Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к неактивному фармацевтическому ингредиенту, который является биологически или фармакологически совместимым для применения людьми или животными, такому как, но не ограничиваясь этим, буфер, носитель или консервант.

В контексте данного документа термин «терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» агента представляет собой количество агента, которое лечит симптомы заболевания у субъекта.

Термин «вводить» относится к способу доставки агентов, соединений или композиций к необходимому участку биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутрикожную доставку, внутримышечную доставку, интратекальную доставку, доставку в толстую кишку, ректальную доставку или внутрибрюшинную доставку. В одном варианте осуществления описанные в данном документе полипептиды вводят внутривенно.

Програнулин-заместительная терапия

В некоторых аспектах в данном документе описаны варианты програнулина и содержащие их слитые белки. Описанные в данном документе слитые белки содержат Fc-полипептидный димер и вариант програнулина. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок дополнительно содержит второй програнулин или его вариант (например, програнулин дикого типа или вариант програнулина). Fc-полипептид в Fc-полипептидном димере может содержать модификации (например, одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации) или может представлять собой Fc-полипептид дикого типа. В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида в Fc-полипептидном димере могут содержать модификации, которые приводят к связыванию с рецептором ГЭБ, например, TfR. Один или оба Fc-полипептида в Fc-полипептидном димере могут представлять собой TfR-связывающий Fc-полипептид. Програнулин или вариант програнулина может быть соединен с N-концом или C-концом Fc-полипептида (например, Fc-полипептида дикого типа TfR-связывающего Fc-полипептида). В некоторых вариантах осуществления програнулин или вариант програнулина может быть соединен с Fc-полипептидом (например, Fc-полипептидом дикого типа или TfR-связывающим Fc-полипептидом) напрямую (например, посредством пептидной связи) или с помощью линкера. В дополнительных вариантах осуществления в N-конце Fc-полипептида (например, Fc-полипептида дикого типа TfR-связывающего Fc-полипептида) может

присутствовать шарнирная область или ее часть. В случае наличия шарнирной области или ее части програнулин или вариант програнулина может быть соединен с N-концом шарнирной области или ее части напрямую или с помощью линкера.

Дефицит програнулина может возникать при нейродегенеративных заболеваниях. Дефицит програнулина может возникать при ЛВД, а также при других заболеваниях, таких как болезнь Гоше и БА. Програнулин или вариант програнулина, включенный в слитый белок, может связываться с сортилином или просапозинном (например, связываться с сортилином).

В некоторых вариантах осуществления програнулин или вариант програнулина, который присутствует в слитом белке, описанном в данном документе, сохраняет по меньшей мере 25% своей активности по сравнению с его активностью, когда он не присоединен к Fc-полипептиду или TfR-связывающему Fc-полипептиду. В некоторых вариантах осуществления програнулин или вариант програнулина, который присутствует в слитом белке, описанном в данном документе, сохраняет по меньшей мере 10% или по меньшей мере 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% (например, по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95%) своей активности по сравнению с его активностью, когда он не присоединен к Fc-полипептиду или TfR-связывающему Fc-полипептиду.

В некоторых вариантах осуществления слияние с Fc-полипептидом или с TfR-связывающим Fc-полипептидом не снижает экспрессию и/или активность програнулина или варианта програнулина.

Варианты програнулина

В данном документе предложены варианты програнулина, которые имеют аминокислотные модификации или добавления на C-конце програнулина дикого типа. Вариант програнулина представляет собой функциональный вариант програнулина дикого типа, который имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) со зрелым програнулином дикого типа (например, SEQ ID NO:2) и аминокислотные модификации или добавления на C-конце програнулина дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина содержит модификации на C-конце програнулина дикого типа так, чтобы последние три аминокислоты на C-конце варианта програнулина не представляли собой QLL. Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая является по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

или 99%) идентичной SEQ ID NO:2, причем позиции, соответствующие остаткам 574–576 в SEQ ID NO:2, имеют аминокислотную последовательность, определяемую $X_1X_2X_3$, при условии, что $X_1X_2X_3$ вместе не представляют собой QLL. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность:

TRCPDGGFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX₁X₂X₃
 (SEQ ID NO:3),

где каждый из X_1 , X_2 и X_3 независимо представляет собой аминокислоту, а $X_1X_2X_3$ вместе не представляют собой QLL. В определенных вариантах осуществления X_1 представляет собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P или V. В определенных вариантах осуществления X_2 представляет собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R. В определенных вариантах осуществления X_3 представляет собой L, Y или P.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой PX_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в PX_2L может представлять собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R (например, H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I или F). Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:4–18, причем вариант програнулина содержит PHL, PKL, PDL, PEL, PSL, PTL, PNL, PQL, PGL, PPL, PAL, PYL, PVL, PIL или PFL на С-конце. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:13, причем вариант програнулина содержит PPL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:13. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%)

идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:15, причем вариант програнулина содержит PYL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:15. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:17, причем вариант програнулина содержит PИL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:17. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:18, причем вариант програнулина содержит PFL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой QX_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в QX_2L может представлять собой R, H, K, D, E, N, P, Y или Q. Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:19–27, причем вариант програнулина содержит QRL, QHL, QKL, QDL, QEL, QNL, QPL, QYL или QQL на С-конце. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:19, причем вариант програнулина содержит QRL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:19. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:20, причем вариант програнулина содержит QHL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:20. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:27, причем вариант програнулина содержит QQL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:27.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой VX_2L . В определенных вариантах осуществления X_2 в VX_2L может представлять собой V или T. Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:28 и 29, причем вариант програнулина содержит VVL или VTL на С-конце. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:28, причем вариант програнулина содержит VVL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:28. В частности, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:29, причем вариант програнулина содержит VTL на С-конце. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:29.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1IL . В определенных вариантах осуществления X_1 в X_1IL может представлять собой R, H, K, E, P, N, F или Y (например, R, H, K, E или P). Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NOS:30–33 и 17, причем вариант програнулина содержит RIL, HIL, KIL, EIL или PIL на С-конце.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1FL . В определенных вариантах осуществления X_1 в X_1FL может представлять собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y или P. Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:34–45 и 18, причем вариант програнулина содержит RFL, HFL, KFL, DFL, EFL, SFL, TFL, NFL, QFL, LFL, FFL, YFL или PFL на С-конце.

В некоторых вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1QL . В определенных вариантах осуществления X_1 в X_1QL может представлять собой R, H, K, D, E, N, L, F, Y или Q. Например, вариант програнулина может иметь последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:46–54 и 27, причем вариант програнулина содержит RQL, HQL, KQL, DQL, EQL, NQL, LQL, FQL, YQL или QQL на С-конце.

В дополнительных вариантах осуществления $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1X_2L , причем X_2 представляет собой A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

В других вариантах осуществления вариант програнулина содержит дополнительные аминокислоты на С-конце по сравнению с програнулином дикого типа. Например, вариант програнулина может содержать аминокислоты QLL или LRQLL (SEQ ID NO:58), добавленные к С-концу програнулина дикого типа. Например, вариант програнулина может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной Y_1Y_2QLL (SEQ ID NO:137), которая является смежной и С-концевой относительно позиции, соответствующей остатку 576 SEQ ID NO:2, где Y_1 представляет собой L или отсутствует, а Y_2 представляет собой R или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина содержит последовательность:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY₁
 Y₂QLL (SEQ ID NO:55).

В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может иметь последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:56, причем вариант програнулина содержит аминокислоты QLLQLL (SEQ ID NO:59) на С-конце. В конкретных вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:56. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может иметь

последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:57, причем вариант програнулина содержит аминокислоты QLLLRQLL (SEQ ID NO:60) на С-конце. В конкретных вариантах осуществления вариант програнулина имеет последовательность SEQ ID NO:57.

Описанный в данном документе вариант програнулина (например, вариант програнулина, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:3–57, 111–121, 127 и 128, может быть соединен с N-концом или С-концом Fc-полипептида (например, Fc-полипептида дикого типа или модифицированного Fc-полипептида). В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина, связанный с Fc-полипептидом, может иметь последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:13, 15, 17, 18, 19, 20 и 27–29). В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может быть соединен с Fc-полипептидом (например, Fc-полипептидом дикого типа или модифицированным Fc-полипептидом) напрямую (например, посредством пептидной связи) или с помощью линкера. В случае наличия шарнирной области или ее части в N-конце Fc-полипептида (например, Fc-полипептида дикого типа или модифицированного Fc-полипептида) вариант програнулина может быть соединен с N-концом шарнирной области или ее части напрямую или с помощью линкера.

Кроме того, описанные в данном документе варианты програнулина могут быть получены из клеток СНО. В конкретных вариантах осуществления более 50% (например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) полученных вариантов програнулина не усечены на С-конце (например, остаются интактными). В конкретных вариантах осуществления более 50% (например, более 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) вариантов програнулина способны связывать сортилин со значением K_D , сниженным менее чем в 10 раз (например, менее чем в 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз или 5 раз) по сравнению с програнулином дикого типа (например, програнулином дикого типа, полученным из клеток НЕК). Варианты програнулина можно очищать из клеточной культуральной среды, содержащей экспрессирующие вариант програнулина клетки, например, с помощью схемы очистки, включающей хроматографию с протеином А, ионообменную хроматографию, колоночную хроматографию с гидрофобным взаимодействием и/или диализ.

Fc-полипептиды и их модификации

В некоторых аспектах описанные в данном документе слитые белки могут содержать вариант програнулина и Fc-полипептидный димер, причем один или оба Fc-полипептида в димере содержат аминокислотные модификации по сравнению с Fc-

полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации в Fc-полипептиде (например, модифицированном Fc-полипептиде) могут приводить к связыванию Fc-полипептидного димера с рецептором ГЭБ (например, TfR), способствовать гетеродимеризации двух Fc-полипептидов в димере, модулировать эффекторную функцию, продлевать сывороточное время полужизни, влиять на гликозилирование и/или снижать иммуногенность для человека. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептиды, присутствующие в слитом белке, имеют идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа (например, Fc-полипептидом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека). Примеры и описания модифицированных Fc-полипептидов (например, TfR-связывающих Fc-полипептидов) можно найти, например, в международной патентной публикации № WO 2018/152326, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Модификации Fc-полипептида для связывания рецептора ГЭБ

В данном документе предложены слитые белки, содержащие вариант програнулина, которые могут быть перенесены через ГЭБ. Такой белок содержит модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ. Рецепторы ГЭБ экспрессируются на эндотелии ГЭБ, а также на других типах клеток и тканей. В некоторых вариантах осуществления рецептор ГЭБ представляет собой TfR.

Аминокислотные остатки, обозначенные в различных Fc-модификациях, включая те, которые внесены в модифицированный Fc-полипептид, который связывается с рецептором ГЭБ, например TfR, пронумерованы в данном документе с использованием нумерации по индексу EU. Любой Fc-полипептид, например, Fc-полипептид IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, может иметь модификации, например, аминокислотные замены, в одной или более позициях, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, домен, который модифицирован для активности связывания рецептора ГЭБ (например, TfR), представляет собой домен СН3 Ig человека, такой как домен СН3 IgG1. Домен СН3 может относиться к любому подтипу IgG, т.е. IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG1 домен СН3 относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 341 приблизительно до позиции 447 по нумерации в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с TfR, связывается с апикальным доменом TfR и может связываться с TfR без блокирования или иного ингибирования связывания трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления практически не происходит

ингибирования связывания трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 50% (например, менее чем на около 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%).

В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, содержит одну или более, по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в аминокислотных позициях, включающих 266, 267, 268, 269, 270, 271, 295, 297, 298 и 299, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных позициях, включающих 274, 276, 283, 285, 286, 287, 288, 289 и 290, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в аминокислотных позициях, включающих 268, 269, 270, 271, 272, 292, 293, 294, 296 и 300, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в аминокислотных позициях, включающих 272, 274, 276, 322, 324, 326, 329, 330 и 331, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть или семь замен в аминокислотных позициях, включающих 345, 346, 347, 349, 437, 438, 439 и 440, в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, содержит по меньшей мере одну, две или три замены; и, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в

аминокислотных позициях 384, 386, 387, 388, 389, 390, 413, 416 и 421 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 388 и/или 421 представляет собой ароматическую аминокислоту, например, Trp, Phe или Tug. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 388 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 421 представляет собой Trp или Phe. В дополнительных вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид дополнительно содержит одну или более замен в позициях, включающих 391, 392, 414, 415, 424 и 426, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления позиция 414 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 424 представляет собой Ser, Thr, Glu или Lys; и/или позиция 426 представляет собой Ser, Trp или Gly. В дополнительных вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид дополнительно содержит одну, две или три замены в позициях, включающих 414, 424 и 426, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления позиция 414 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 424 представляет собой Ser, Thr, Glu или Lys; и/или позиция 426 представляет собой Ser, Trp или Gly.

В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:68 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Glu в позиции 150, Tug в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ala в позиции 159, Asn в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191, причем каждая позиция пронумерована относительно SEQ ID NO:68. В конкретных вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид имеет последовательность SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах осуществления слитых белков, описанных в данном документе, один из двух Fc-полипептидов в Fc-полипептидном димере может представлять собой связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:68, тогда как другой Fc-полипептид в Fc-полипептидном димере может иметь последовательность Fc-полипептида дикого типа (например, SEQ ID NO:61). В других вариантах осуществления слитых белков, описанных в данном документе, оба Fc-полипептида в Fc-полипептидном димере могут представлять собой связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:68.

В некоторых вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например,

TfR) Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:78 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Leu в позиции 150, Tyr в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ser в позиции 159, Ser в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191, причем каждая позиция пронумерована относительно SEQ ID NO:78. В конкретных вариантах осуществления связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид имеет последовательность SEQ ID NO:78. В некоторых вариантах осуществления слитых белков, описанных в данном документе, один из двух Fc-полипептидов в Fc-полипептидном димере может представлять собой связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:78, тогда как другой Fc-полипептид в Fc-полипептидном димере может иметь последовательность Fc-полипептида дикого типа (например, SEQ ID NO:61). В других вариантах осуществления слитых белков, описанных в данном документе, оба Fc-полипептида в Fc-полипептидном димере могут представлять собой связывающий рецептор ГЭБ (например, TfR) Fc-полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:78.

Модификации Fc-полипептида для гетеродимеризации

В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептиды, присутствующие в слитом белке, содержат мутации типа «выступа» и «впадины», что способствует образованию гетеродимера и препятствует образованию гомодимера. В общем случае модификации вносят выпуклость («выступ») на поверхности контакта первого полипептида и соответствующую полость («впадину») на поверхности контакта второго полипептида так, чтобы выпуклость могла располагаться в полости, способствуя образованию гетеродимера и, таким образом, препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены небольших боковых цепей аминокислот на поверхности контакта первого полипептида на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или подобного размера выпуклостям создают на поверхности контакта второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). В некоторых вариантах осуществления такие дополнительные мутации находятся в такой позиции Fc-полипептида, которая не оказывает отрицательного влияния на связывание полипептида с рецептором ГЭБ, например, TfR.

В одном иллюстративном варианте осуществления подхода «выступ и впадина» для димеризации позиция 366 (пронумерованная в соответствии со схемой нумерации EU)

одного из Fc-полипептидов, присутствующих в слитом белке, содержит триптофан вместо нативного треонина. Другой Fc-полипептид в димере содержит валин в позиции 407 (пронумерованной в соответствии со схемой нумерации EU) вместо нативного тирозина. Другой Fc-полипептид может дополнительно содержать замену, при которой нативный треонин в позиции 366 (пронумерованной в соответствии со схемой нумерации EU) заменен серином, а нативный лейцин в позиции 368 (пронумерованной в соответствии со схемой нумерации EU) заменен аланином. Таким образом, один из Fc-полипептидов слитого белка, описанного в данном документе, имеет мутацию типа «выступ» T366W, а другой Fc-полипептид имеет мутацию Y407V, которая обычно сопровождается мутациями типа «впадина» T366S и L368A.

В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, также могут быть сконструированы так, чтобы содержать другие модификации для гетеродимеризации, например, с помощью электростатического конструирования контактных остатков на поверхности контакта СНЗ-СНЗ, которые естественным образом заряжены, или модификаций с гидрофобными пэтчами.

Например, в некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором один Fc-полипептид имеет мутацию типа «выступ» T366W и по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:64, а другой Fc-полипептид имеет мутации типа «впадина» T366S, L368A и Y407V и по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:66. В определенных вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида в Fc-полипептидном димере могут представлять собой TfR-связывающий Fc-полипептид. В конкретных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором (i) первый Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:66, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:66, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177, и (ii) второй Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:69, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно

SEQ ID NO:69, Trp в позиции 136 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Glu в позиции 150, Tug в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ala в позиции 159, Asn в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191. В конкретных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором (i) первый Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:66, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:66, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177, и (ii) второй Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:79, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:79, Trp в позиции 136 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Leu в позиции 150, Tug в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ser в позиции 159, Ser в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191.

В конкретных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать (i) первый Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:64, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:64, Trp в позиции 136, и (ii) второй Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:71, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:71, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Glu в позиции 150, Tug в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ala в позиции 159, Asn в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191. В конкретных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать (i) первый Fc-полипептидный димер, имеющий по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:64, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:64, Trp в позиции 136, и (ii) второй Fc-полипептид, имеющий по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:81, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:81, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Leu в позиции 150, Tyr в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ser в позиции 159, Ser в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191.

Модификации Fc-полипептида для модуляции эффекторной функции

В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, могут содержать модификации, которые снижают эффекторную функцию, т.е. обладают сниженной способностью индуцировать определенные биологические функции при связывании с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, которая опосредует эффекторную функцию. Примеры эффекторных функций антител включают, но не ограничиваются этим, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (АЗКФ), понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию B-клеток. Эффекторные функции могут варьироваться в зависимости от класса антитела. Например, нативные антитела IgG1 и IgG3 человека могут вызывать активность АЗКЦ и КЗЦ при связывании с подходящим Fc-рецептором, присутствующим в клетке иммунной системы; а нативные IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека могут вызывать функцию АЗКФ при связывании с подходящим Fc-рецептором, присутствующим на иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, могут содержать модификации, которые снижают или устраняют эффекторную функцию. Иллюстративные мутации Fc-полипептида, которые снижают эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим, замены в домене CH2, например в позициях 234 и 235, в соответствии со схемой нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида могут содержать остатки аланина в позициях 234 и 235. Таким образом, один или оба Fc-полипептида могут содержать замены L234A и L235A (LALA).

Дополнительные мутации Fc-полипептида, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим, следующее: позиция 329 может

содержать мутацию, в которой пролин заменен глицином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения поверхности контакта Fc/Fc γ -рецептора, которая образуется между пролином 329 из Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 из Fc γ RIII. Дополнительные иллюстративные замены включают S228P, E233P, L235E, N297A, N297D и P331S в соответствии со схемой нумерации EU. Также могут присутствовать множественные замены, например, L234A и L235A Fc-области IgG1 человека; L234A, L235A и P329G Fc-области IgG1 человека; S228P и L235E Fc-области IgG4 человека; L234A и G237A Fc-области IgG1 человека; L234A, L235A и G237A Fc-области IgG1 человека; V234A и G237A Fc-области IgG2 человека; L235A, G237A и E318A Fc-области IgG4 человека; и S228P и L236E Fc-области IgG4 человека, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида могут иметь одну или более аминокислотных замен, которые модулируют АКЗЦ, например замены в позициях 298, 333 и/или 334, в соответствии со схемой нумерации EU.

Например, в некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором (i) первый Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:67, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:67, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177, и (ii) второй Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:70, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:70, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5, Trp в позиции 136 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Glu в позиции 150, Tyr в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ala в позиции 159, Asn в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором (i) первый Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:67, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:67, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177, и (ii) второй Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:80, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:80, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5, Trp в позиции 136 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Leu в позиции 150, Tyr в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ser в позиции 159, Ser в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором (i) первый Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:65, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:65, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5 и Trp в позиции 136, и (ii) второй Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:72, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:72, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Glu в позиции 150, Tyr в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ala в позиции 159, Asn в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок может содержать Fc-полипептидный димер, в котором (i) первый Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:65, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:65, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5 и Trp в позиции 136, и (ii) второй Fc-полипептид имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:82, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:82, Ala в позиции 4, Ala в позиции 5, Ser в позиции 136, Ala в позиции 138 и Val в позиции 177 и, в некоторых вариантах осуществления, содержит Leu в позиции 150, Tyr в позиции 154, Thr в позиции 156, Glu в позиции 157, Trp в позиции 158, Ser в позиции 159, Ser в позиции 160, Thr в позиции 183, Glu в позиции 185, Glu в позиции 186 и Phe в позиции 191.

Модификации Fc-полипептида для продления сывороточного времени полужизни

В некоторых вариантах осуществления можно вносить модификации для увеличения сывороточного времени полужизни. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба Fc-полипептида, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, могут содержать тирозин в позиции 252, треонин в позиции 254 и глутаминовую кислоту в позиции 256, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU. Таким образом, один или оба Fc-полипептида могут содержать замены M252Y, S254T и T256E. В альтернативном варианте один или оба Fc-полипептида могут содержать замены M428L и N434S, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU. В альтернативном варианте один или оба Fc-полипептида могут содержать замену N434S или N434A.

В некоторых вариантах осуществления в одном или обоих Fc-полипептидах может быть удален открытый С-концевой лизин (например, остаток Lys в позиции 447 Fc-полипептида в соответствии с нумерацией EU). С-концевой остаток лизина является высококонсервативным в Fc-доменах и может полностью или частично удаляться клеточной машинерией во время выработки белка. В некоторых вариантах осуществления удаление С-концевых лизинов в Fc-полипептидах может улучшать стабильность слитых белков.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная область (например, SEQ ID NO:88) или ее часть (например, SEQ ID NO:89) может быть соединена с Fc-полипептидом или модифицированным Fc-полипептидом, описанным в данном документе. Шарнирная область может относиться к любому подклассу или изотипу иммуноглобулина. Иллюстративной шарнирной областью иммуноглобулина является шарнирная область IgG, такая как шарнирная область IgG1, например, шарнирная аминокислотная последовательность IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:88) или ее часть (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:89). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область находится в N-концевой области Fc-полипептида.

Связь между програнулинами и Fc-полипептидами

В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид соединен с програнулином или вариантом програнулина линкером, например, полипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид соединен с програнулином или вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером, например, представляет собой слитый полипептид. Полипептидный линкер может иметь такую конфигурацию, чтобы обеспечивать вращение програнулина или варианта програнулина относительно Fc-полипептида, с которым он соединен; и/или устойчивость к

расщеплению протеазами. Полипептидные линкеры могут содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер может представлять собой гибкий линкер, например, содержащий аминокислоты, такие как Gly, Asn, Ser, Thr, Ala и т.п. Такие линкеры разработаны с использованием известных параметров и могут иметь любую длину и содержать любое количество повторяющихся звеньев любой длины (например, повторяющихся звеньев остатков Gly и Ser). Например, линкер может иметь повторы, например два, три, четыре, пять или более повторов Gly₄-Ser (SEQ ID NO:90) или один Gly₄-Ser (SEQ ID NO:90). В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер может содержать сайт расщепления протеазой, например, расщепляемый ферментом, присутствующим в центральной нервной системе. В некоторых вариантах осуществления, если шарнирная область (например, SEQ ID NO:88) или ее часть (например, SEQ ID NO:89) соединена с N-концом Fc-полипептида, C-конец програнулина или его варианта может быть соединен с N-концом шарнирной области или ее части пептидной связью или полипептидным линкером (например, повторами Gly₄-Ser (SEQ ID NO:90) или одним Gly₄-Ser (SEQ ID NO:90)).

В некоторых вариантах осуществления програнулин или вариант програнулина соединен с N-концом Fc-полипептида, например, линкером Gly₄-Ser (SEQ ID NO:90) или линкером (Gly₄-Ser)₂ (SEQ ID NO:91). В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид может содержать шарнирную последовательность или частичную шарнирную последовательность в N-конце, которая соединена с линкером или непосредственно соединена с програнулином.

В некоторых вариантах осуществления програнулин или вариант програнулина соединен с C-концом Fc-полипептида, например, линкером Gly₄-Ser (SEQ ID NO:90) или линкером (Gly₄-Ser)₂ (SEQ ID NO:91). В некоторых вариантах осуществления C-конец Fc-полипептида непосредственно соединен с програнулином.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер между Fc-полипептидом и програнулином или вариантом програнулина может содержать 3–50, 3–25, 3–10, 3–5, 3, 5, 7, 10, 25 или 50) аминокислот. Подходящие полипептидные линкеры известны в данной области техники (например, как описано в Chen *et al. Adv. Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369, 2013), и включают, например, полипептидные линкеры, содержащие гибкие аминокислотные остатки, такие как глицин и серин. В определенных вариантах осуществления полипептидный линкер может представлять собой полиглициновый линкер, например, (Gly)_n (SEQ ID NO:138), в котором n является целым числом от 1 до 10. В определенных вариантах осуществления полипептидный линкер

может содержать мотивы, например, несколько мотивов или повторяющиеся мотивы (GS)_n (SEQ ID NO:139), (GGS)_n (SEQ ID NO:140), (GGGS)_n (SEQ ID NO:133), (GGSG)_n (SEQ ID NO:134) или (SGGG)_n (SEQ ID NO:135), где n является целым числом от 1 до 10. В других вариантах осуществления полипептидный линкер также может содержать аминокислоты, отличные от глицина и серина, например, KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:94), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO:95) и GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO:96). В других вариантах осуществления полипептидные линкеры также могут представлять собой жесткие полипептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления жесткие полипептидные линкеры могут принимать α-спиральную конформацию, которая может быть стабилизирована внутрисегментными водородными связями и/или внутрисегментными солевыми мостиками. Примеры жестких полипептидных линкеров включают, но не ограничиваются этим, A(EAAAK)_nA (SEQ ID NO:136), где n является целым числом от 1 до 5, и (XP)_n (SEQ ID NO:141), где X представляет собой Ala, Lys или Glu, а n является целым числом от 1 до 10, как описано в Chen *et al. Adv. Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369, 2013.

В некоторых вариантах осуществления програнулин или вариант програнулина соединен с Fc-полипептидом химическим перекрестно-сшивающим агентом. Такие конъюгаты можно создавать, используя хорошо известные химические перекрестно-сшивающие реагенты и протоколы. Например, существует большое число химических перекрестно-сшивающих агентов, которые известны специалистам в данной области техники и применимы для перекрестного сшивания полипептида с представляющим интерес агентом. Например, перекрестно-сшивающие агенты представляют собой гетеробифункциональные кросс-линкеры, которые можно использовать для связывания молекул пошаговым образом. Гетеробифункциональные кросс-линкеры обеспечивают возможность разработки более специфических методов сопряжения для конъюгации белков, тем самым снижая появление нежелательных побочных реакций, таких как гомобелковые полимеры. В данной области техники известен широкий ряд гетеробифункциональных кросс-линкеров, включая N-гидроксисукцинимид (NHS) или его водорастворимый аналог N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-NHS), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS); N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоат (SIAB), сукцинимидил 4-(p-малеимидофенил)бутират (SMPB), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC); 4-сукцинимидилоксикарбонил-α-метил-α-(2-пиридилдитио)-толуол (SMPT), N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сукцинимидил 6-[3-(2-

пиридилдитио)пропионат]гексаноат (LC-SPDP). Перекрестно-сшивающие агенты, имеющие N-гидроксисукцинимидные фрагменты, можно получать в виде аналогов N-гидроксисульфосукцинимиды, которые в общем случае имеют большую водорастворимость. Кроме того, перекрестно-сшивающие агенты, имеющие дисульфидные мостики в связующей цепи, можно синтезировать вместо алкильных производных так, чтобы снизить степень расщепления линкера *in vivo*. Помимо гетеробифункциональных кросс-линкеров существует ряд других перекрестно-сшивающих агентов, включая гомобифункциональные и фотореактивные кросс-линкеры. Дисукцинимидилсуберат (DSS), бисмалеимидогексан (BMH) и диметилпимелимидат·2HCl (DMP) являются примерами применимых гомобифункциональных перекрестно-сшивающих агентов, а бис-[B-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED) и N-сукцинимидил-6(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (SANPAH) являются примерами применимых фотореактивных кросс-линкеров.

Иллюстративные слитые белки

В некоторых аспектах описанный в данном документе слитый белок содержит первый Fc-полипептид, который связан с вариантом програнулина; и второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок дополнительно содержит второй програнулин или его вариант (например, програнулин дикого типа или вариант програнулина). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации с другим Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые снижают эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые продлевают сывороточное время полужизни. В некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc-полипептид содержит одну или более модификаций, которые обеспечивают связывание с рецептором ГЭБ, например, TfR.

В других аспектах описанный в данном документе слитый белок содержит первую полипептидную цепь, которая содержит Fc-полипептид, и вторую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с рецептором ГЭБ (например, TfR), например, TfR-связывающий Fc-

полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления програнулин дикого типа соединен с С-концом первой полипептидной цепи, а вариант програнулина соединен с N-концом второй полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления програнулин дикого типа соединен с С-концом первой полипептидной цепи, а вариант програнулина соединен с С-концом второй полипептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления K_D в отношении связывания сортилина слитого белка, описанного в данном документе, составляет менее чем около 100 нМ (например, менее чем около 95 нМ, 90 нМ, 85 нМ, 80 нМ, 75 нМ, 70 нМ, 65 нМ, 60 нМ, 55 нМ, 50 нМ, 45 нМ или 40 нМ). В некоторых вариантах осуществления EC_{50} в отношении связывания сортилина слитого белка, описанного в данном документе, составляет менее чем около 25 нМ (например, менее чем около 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ, 1,5 нМ или 1 нМ). В конкретных вариантах осуществления EC_{50} в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем около 10-кратное (например, менее чем около 9-кратное, 8-кратное, 7-кратное, 6-кратное или 5-кратное) снижение связывания сортилина по сравнению со слитым белком, содержащим SEQ ID NO:2 в первом полипептиде. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем около 10-кратное (например, менее чем около 9-кратное, 8-кратное, 7-кратное, 6-кратное или 5-кратное) снижение связывания сортилина по сравнению со слитым белком, содержащим SEQ ID NO:108 в первом полипептиде. В определенных вариантах осуществления EC_{50} измеряют методом ELISA. Типовой метод измерения EC_{50} в отношении сортилина с помощью ELISA описан в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе слитые белки получают в клетках CHO. В конкретных вариантах осуществления не происходит расщепление более 50% (например, более 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) слитых белков (например, слитых белков, полученных из клеток CHO) на С-конце части варианта програнулина слитого белка.

В конкретных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит: (a) первую полипептидную цепь, которая содержит вариант програнулина, соединенный с модифицированным Fc-полипептидом, содержащим замены T366S, L368A и Y407V (впадина) и замены L234A и L235A (LALA); и (b) вторую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, который связывается с TfR и содержит замену T366W (выступ) и замены L234A и L235A (LALA). Вариант програнулина может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%)

идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:4–54, 111–121 и 127–128, где позиции 574–576 варианта програнулина соответствуют определению в SEQ ID NO:4–54, 111–121 и 127–128. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:56, где позиции 574–579 варианта програнулина соответствуют определению в SEQ ID NO:56. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может содержать последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с SEQ ID NO:57, где позиции 574–581 варианта програнулина соответствуют определению в SEQ ID NO:57. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может быть соединен с N-концом или C-концом (например, C-концом) модифицированного Fc-полипептида. В конкретных вариантах осуществления шарнирная область или ее часть соединена в N-конце каждого из модифицированных Fc-полипептидов в первой и второй полипептидных цепях. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер (например, GGGGS (SEQ ID NO:90) или GGGSGGGGS (SEQ ID NO:91)) находится между вариантом програнулина и модифицированным Fc-полипептидом в первой полипептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:98, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:98, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Pro в позиции 811, Ile в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (б) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ

ID NO:98, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:98, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:99, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:99, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Pro в позиции 811, Phe в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:99, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:99, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:100, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:100, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Gln в позиции 811, Gln в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность

содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:100, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:100, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:101, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:101, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Val в позиции 811, Val в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:101, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:101, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:102, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных

относительно SEQ ID NO:102, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Val в позиции 811, Thr в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:102, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:102, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:123, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:123, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Pro в позиции 811, Pro в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:123, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:123, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый

белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:124, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:124, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Pro в позиции 811, Tyr в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:124, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:124, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:125, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:125, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Gln в позиции 811, Arg в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ

ID NO:125, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:125, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:126, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:126, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Gln в позиции 811, His в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (б) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:75, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:75, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:126, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:75. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:126, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:130.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:98, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:98, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Pro в позиции 811, Ile в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (б) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичности) с последовательностью SEQ ID NO:85, причем последовательность содержит в позициях,

пронумерованных относительно SEQ ID NO:85, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:98, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:98, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:132.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:99, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:99, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Pro в позиции 811, Phe в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:85, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:99, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:99, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:132.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:100, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:100, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala

в позиции 148, Val в позиции 187, Gln в позиции 811, Gln в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:85, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:100, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:100, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:132.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:101, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:101, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Val в позиции 811, Val в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:85, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:101, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:101, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:132.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и

модифицированный Fc-полипептид, причем первая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:102, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:102, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Val в позиции 187, Val в позиции 811, Thr в позиции 812 и Leu в позиции 813, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:85, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:85, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:102, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:85. В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:102, а вторая полипептидная цепь содержит последовательность SEQ ID NO:132.

В конкретных вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит: (a) первую полипептидную цепь, которая содержит модифицированный Fc-полипептид, который связывается с TfR и содержит замены T366S, L368A и Y407V (впадина) и замены L234A и L235A (LALA); и (b) вторую полипептидную цепь, которая содержит вариант програнулина, соединенный с модифицированным Fc-полипептидом, содержащий замену T366W (выступ) и замены L234A и L235A (LALA). Вариант програнулина может иметь последовательность, имеющую по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:3–57, 111–121 и 127–128. В некоторых вариантах осуществления вариант програнулина может быть соединен с N-концом или C-концом (например, C-концом) модифицированного Fc-полипептида. В конкретных вариантах осуществления шарнирная область или ее часть соединена в N-конце каждого из модифицированных Fc-полипептидов в первой и второй полипептидных цепях. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер (например, GGGGS (SEQ ID NO:90) или GGGSGGGGS (SEQ ID NO:91)) находится между вариантом програнулина и модифицированным Fc-полипептидом во второй полипептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый

белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:77, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:77, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:103, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:103, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Pro в позиции 811, Ile в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:77, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:77, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:104, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:104, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Pro в позиции 811, Phe в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:77, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:77, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Glu в позиции

160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:105, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:105, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Gln в позиции 811, Gln в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:77, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:77, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:106, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:106, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Val в позиции 811, Val в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (a) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:77, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:77, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Glu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ala в позиции 169, Asn в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%

(например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:107, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:107, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Val в позиции 811, Thr в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:87, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:87, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:103, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:103, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Pro в позиции 811, Leu в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:87, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:87, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:104, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:104, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Pro в позиции 811, Phe в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый

белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:87, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:87, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:105, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:105, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Gln в позиции 811, Gln в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:87, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:87, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Leu в позиции 160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:106, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:106, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Val в позиции 811, Val в позиции 812 и Leu в позиции 813.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе слитый белок содержит (а) первую полипептидную цепь, содержащую последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:87, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:87, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Ser в позиции 146, Ala в позиции 148, Leu в позиции

160, Tyr в позиции 164, Thr в позиции 166, Glu в позиции 167, Trp в позиции 168, Ser в позиции 169, Ser в позиции 170, Val в позиции 187, Thr в позиции 193, Glu в позиции 195, Glu в позиции 196 и Phe в позиции 201, и (b) вторую полипептидную цепь, содержащую вариант програнулина и модифицированный Fc-полипептид, причем вторая полипептидная цепь содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% (например по меньшей мере 95%, 98% или 99%) идентичности или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO:107, причем последовательность содержит в позициях, пронумерованных относительно SEQ ID NO:107, Ala в позиции 14, Ala в позиции 15, Trp в позиции 146, Val в позиции 811, Thr в позиции 812 и Leu в позиции 813.

Свойства связывания

Описанные в данном документе слитые белки могут иметь широкий диапазон аффинности связывания. Например, в некоторых вариантах осуществления белок имеет аффинность в отношении рецептора ГЭБ, например, Tfr, в диапазоне от 1 пМ до 10 мкМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность в отношении Tfr находится в диапазоне от 1 нМ до 5 мкМ или от 10 нМ до 1 мкМ.

Методы анализа аффинности связывания, кинетики связывания и перекрестной реактивности для анализа связывания с рецептором ГЭБ, например, Tfr, известны в данной области техники. Эти методы включают, но не ограничиваются этим, твердофазный анализ связывания (например, анализ ELISA), иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), анализ кинетического исключения (например, KinExA®), проточную цитометрию, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), биослойную интерферометрию (например, Octet® (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)) и вестерн-блот-анализ. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания и/или перекрестной реактивности используют ELISA. Методы проведения анализа ELISA известны в данной области техники и также описаны в разделе примеров ниже. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР). В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют анализ кинетического исключения. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют биослойную интерферометрию. Оценка эффектов слитых белков

Активность описанных в данном документе слитых белков, которые содержат

програнулин или его вариант, можно оценивать, используя различные анализы, включая анализы, в которых измеряется активность *in vitro* или *in vivo*. Как описано в примерах, клеточное поглощение описанных в данном документе слитых белков можно оценить, используя макрофаги костного мозга (МКМ) и иммуноокрашивание антителами к програнулину человека и Fc человека. Клеточные эффекты, вызванные мутацией *GRN* (например, повышенная активность катепсина D и повышенные уровни мРНК лизосомальных генов, таких как *Ctsl*, *Tmem106b* и *Psap*), можно оценивать снова после обработки клеток описанными в данном документе слитыми белками (примеры 6 и 7). В этих анализах можно использовать флуорогенные зонды и методики кПЦР. И наконец, фармакокинетические свойства и поглощение в головном мозге описанных в данном документе слитых белков можно определить, используя мышей дикого типа и/или трансгенных мышей, как показано в примерах 9 и 10.

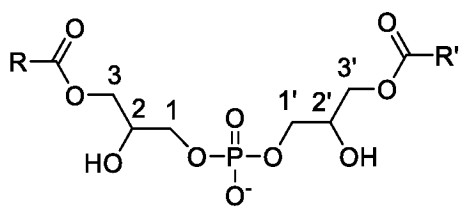
В случае клеточных образцов анализ может включать разрушение клеток и вскрытие микровезикул. Разрушение клеток можно осуществлять с помощью замораживания-размораживания и/или обработки ультразвуком. В некоторых вариантах осуществления оценивают тканевый образец. Тканевый образец можно оценивать, используя несколько циклов замораживания-размораживания, например 2, 3, 4, 5 или более, которые проводят перед этапом обработки ультразвуком, чтобы гарантировать вскрытие микровезикул.

Образцы, которые можно оценивать с помощью описанных в данном документе анализов, включают, например, головной мозг, печень, почки, легкие, селезенку, плазму, сыворотку, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) и мочу. В некоторых вариантах осуществления можно оценивать образцы ЦСЖ от пациента, получающего слитый белок, содержащий програнулин или его вариант, как описано в данном документе.

Бис(моноацилглицеро)фосфат (ВМР)

В данном документе предложены способы мониторинга уровня програнулина или варианта програнулина (например, в образце, в клетке, в ткани и/или в организме субъекта), причем определение уровня програнулина или варианта програнулина включает измерение содержания ВМР (например, в образце, клетке, ткани и/или организме субъекта).

ВМР представляет собой отрицательно заряженный глицерофосфолипид (например, при рН, обычно наблюдающемся в поздних эндосомах и лизосомах), имеющий структуру, изображенную в формуле I:



(I).

Молекулы ВМР содержат две боковые цепи жирной кислоты. R и R' в формуле I представляют независимо выбранные насыщенные или ненасыщенные алифатические цепи, каждая из которых обычно содержит 14, 16, 18, 20 или 22 атома углерода. Когда боковая цепь жирной кислоты является ненасыщенной, она может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более углерод-углеродных двойных связей. Кроме того, молекула ВМР может содержать один или два алкил-эфирных заместителя, причем карбонильный атом кислорода одной или обеих боковых цепей жирной кислоты замещен двумя атомами водорода. Номенклатура, которая используется в данном документе для описания конкретных видов ВМР, относится к видам, имеющим две боковые цепи жирной кислоты, причем структура боковых цепей жирной кислоты указана в скобках в формате ВМР (например, ВМР(18:1_18:1)). Числа соответствуют стандартному числовому формату обозначения жирных кислот «атомы углерода жирной кислоты:число двойных связей». Префикс «e-» используется для обозначения наличия алкил-эфирного заместителя, причем карбонильный атом кислорода боковой цепи жирной кислоты замещен двумя атомами водорода. Например, «e» в «ВМР(16:0e_18:0)» означает, что боковая цепь, имеющая 16 атомов углерода, является алкил-эфирным заместителем.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению измеряют содержание одного вида ВМР. В некоторых вариантах осуществления измеряют содержание двух или более видов ВМР. В некоторых вариантах осуществления измеряют содержание по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти или более видов ВМР из таблицы 1. Когда измеряют содержание двух или более видов ВМР, можно использовать любую комбинацию видов ВМР.

В некоторых вариантах осуществления содержание более чем одного вида ВМР можно суммировать, а общее содержание сравнивать с эталонным значением. Например, содержание одного или более видов ВМР (например, видов ВМР, перечисленных в таблице 1) можно суммировать, а затем общее содержание сравнивать с эталонным значением.

Таблица 1. Виды ВМР

| Название | Общее число атомов углерода:общая ненасыщенность | Название | Общее число атомов углерода:общая ненасыщенность | Название | Общее число атомов углерода:общая ненасыщенность |
|-----------------|--|-----------------|--|-----------------|--|
| BMP(14:0_14:0) | BMP(28:0) | BMP(16:0e_20:5) | BMP(36:5) | BMP(18:3_20:3) | BMP(38:6) |
| BMP(14:0_16:0) | BMP(30:0) | BMP(16:0e_22:4) | BMP(38:4) | BMP(18:3_20:4) | BMP(38:7) |
| BMP(14:0_16:1) | BMP(30:1) | BMP(16:0e_22:6) | BMP(38:6) | BMP(18:3_20:5) | BMP(38:8) |
| BMP(14:0_18:0) | BMP(32:0) | BMP(16:1e_14:0) | BMP(30:1) | BMP(18:3_22:4) | BMP(40:7) |
| BMP(14:0_18:1) | BMP(32:1) | BMP(16:1e_16:0) | BMP(32:1) | BMP(18:3_22:5) | BMP(40:8) |
| BMP(14:0_18:2) | BMP(32:2) | BMP(16:1e_18:0) | BMP(34:1) | BMP(18:3_22:6) | BMP(40:9) |
| BMP(14:0_18:3) | BMP(32:3) | BMP(16:1e_18:1) | BMP(34:2) | BMP(18:0e_14:0) | BMP(32:0) |
| BMP(14:0_20:1) | BMP(34:1) | BMP(16:1e_18:2) | BMP(34:3) | BMP(18:0e_16:0) | BMP(34:0) |
| BMP(14:0_20:2) | BMP(34:2) | BMP(16:1e_18:3) | BMP(34:4) | BMP(18:0e_18:0) | BMP(36:0) |
| BMP(14:0_20:3) | BMP(34:3) | BMP(16:1e_20:3) | BMP(36:4) | BMP(18:0e_18:1) | BMP(36:1) |
| BMP(14:0_20:4) | BMP(34:4) | BMP(16:1e_20:4) | BMP(36:5) | BMP(18:0e_18:2) | BMP(36:2) |
| BMP(14:0_20:5) | BMP(34:5) | BMP(16:1e_20:5) | BMP(36:6) | BMP(18:0e_18:3) | BMP(36:3) |
| BMP(14:0_22:4) | BMP(36:4) | BMP(16:1e_22:4) | BMP(38:5) | BMP(18:0e_20:3) | BMP(38:3) |
| BMP(14:0_22:5) | BMP(36:5) | BMP(16:1e_22:6) | BMP(38:7) | BMP(18:0e_20:4) | BMP(38:4) |
| BMP(14:0_22:6) | BMP(36:6) | BMP(18:0_18:0) | BMP(36:0) | BMP(18:0e_20:5) | BMP(38:5) |
| BMP(16:0_16:0) | BMP(32:0) | BMP(18:0_18:1) | BMP(36:1) | BMP(18:0e_22:4) | BMP(40:4) |
| BMP(16:0_16:1) | BMP(32:1) | BMP(18:0_18:2) | BMP(36:2) | BMP(18:0e_22:6) | BMP(40:6) |
| BMP(16:0_18:0) | BMP(34:0) | BMP(18:0_18:3) | BMP(36:3) | BMP(18:1e_14:0) | BMP(32:1) |
| BMP(16:0_18:1) | BMP(34:1) | BMP(18:0_20:1) | BMP(38:1) | BMP(18:1e_16:0) | BMP(34:1) |
| BMP(16:0_18:2) | BMP(34:2) | BMP(18:0_20:2) | BMP(38:2) | BMP(18:1e_18:0) | BMP(36:1) |
| BMP(16:0_18:3) | BMP(34:3) | BMP(18:0_20:3) | BMP(38:3) | BMP(18:1e_18:1) | BMP(36:2) |
| BMP(16:0_20:1) | BMP(36:1) | BMP(18:0_20:4) | BMP(38:4) | BMP(18:1e_18:2) | BMP(36:3) |
| BMP(16:0_20:2) | BMP(36:2) | BMP(18:0_20:5) | BMP(38:5) | BMP(18:1e_18:3) | BMP(36:4) |
| BMP(16:0_20:3) | BMP(36:3) | BMP(18:0_22:4) | BMP(40:4) | BMP(18:1e_20:3) | BMP(38:4) |
| BMP(16:0_20:4) | BMP(36:4) | BMP(18:0_22:5) | BMP(40:5) | BMP(18:1e_20:4) | BMP(38:5) |
| BMP(16:0_20:5) | BMP(36:5) | BMP(18:0_22:6) | BMP(40:6) | BMP(18:1e_20:5) | BMP(38:6) |
| BMP(16:0_22:4) | BMP(38:4) | BMP(18:1_18:1) | BMP(36:2) | BMP(18:1e_22:4) | BMP(40:5) |
| BMP(16:0_22:5) | BMP(38:5) | BMP(18:1_18:2) | BMP(36:3) | BMP(18:1e_22:6) | BMP(40:7) |
| BMP(16:0_22:6) | BMP(38:6) | BMP(18:1_18:3) | BMP(36:4) | BMP(20:3_20:3) | BMP(40:6) |
| BMP(16:1_16:1) | BMP(32:2) | BMP(18:1_20:1) | BMP(38:2) | BMP(20:3_20:4) | BMP(40:7) |
| BMP(16:1_18:0) | BMP(34:1) | BMP(18:1_20:2) | BMP(38:3) | BMP(20:3_20:5) | BMP(40:8) |
| BMP(16:1_18:1) | BMP(34:2) | BMP(18:1_20:3) | BMP(38:4) | BMP(20:3_22:4) | BMP(42:7) |
| BMP(16:1_18:2) | BMP(34:3) | BMP(18:1_20:4) | BMP(38:5) | BMP(20:3_22:5) | BMP(42:8) |
| BMP(16:1_18:3) | BMP(34:4) | BMP(18:1_20:5) | BMP(38:6) | BMP(20:3_22:6) | BMP(42:9) |
| BMP(16:1_20:1) | BMP(36:2) | BMP(18:1_22:4) | BMP(40:5) | BMP(20:4_20:4) | BMP(40:8) |
| BMP(16:1_20:2) | BMP(36:3) | BMP(18:1_22:5) | BMP(40:6) | BMP(20:4_20:5) | BMP(40:9) |
| BMP(16:1_20:3) | BMP(36:4) | BMP(18:1_22:6) | BMP(40:7) | BMP(20:4_22:4) | BMP(42:8) |
| BMP(16:1_20:4) | BMP(36:5) | BMP(18:2_18:2) | BMP(36:4) | BMP(20:4_22:5) | BMP(42:9) |
| BMP(16:1_20:5) | BMP(36:6) | BMP(18:2_18:3) | BMP(36:5) | BMP(20:4_22:6) | BMP(42:10) |
| BMP(16:1_22:4) | BMP(38:5) | BMP(18:2_20:1) | BMP(38:3) | BMP(20:5_20:5) | BMP(40:10) |
| BMP(16:1_22:5) | BMP(38:6) | BMP(18:2_20:2) | BMP(38:4) | BMP(20:5_22:4) | BMP(42:9) |
| BMP(16:1_22:6) | BMP(38:7) | BMP(18:2_20:3) | BMP(38:5) | BMP(20:5_22:5) | BMP(42:10) |
| BMP(16:0e_14:0) | BMP(40:0) | BMP(18:2_20:4) | BMP(38:6) | BMP(20:5_22:6) | BMP(42:11) |
| BMP(16:0e_16:0) | BMP(32:0) | BMP(18:2_20:5) | BMP(38:7) | BMP(22:4_22:4) | BMP(44:8) |
| BMP(16:0e_18:0) | BMP(34:0) | BMP(18:2_22:4) | BMP(40:6) | BMP(22:4_22:5) | BMP(44:9) |
| BMP(16:0e_18:1) | BMP(34:1) | BMP(18:2_22:5) | BMP(40:7) | BMP(22:4_22:6) | BMP(44:10) |
| BMP(16:0e_18:2) | BMP(34:2) | BMP(18:2_22:6) | BMP(40:8) | BMP(22:6_22:6) | BMP(44:12) |
| BMP(16:0e_18:3) | BMP(34:3) | BMP(18:3_18:3) | BMP(36:6) | | |
| BMP(16:0e_20:3) | BMP(36:3) | BMP(18:3_20:1) | BMP(38:4) | | |
| BMP(16:0e_20:4) | BMP(36:4) | BMP(18:3_20:2) | BMP(38:5) | | |

В некоторых случаях один или более видов ВМР могут экспрессироваться по-разному (например, быть более или менее распространенными) в одном типе образца по сравнению с другим, например, в клеточных образцах (например, культивируемые

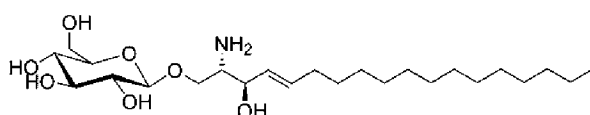
клетки) по сравнению с тканевыми образцами или образцами крови. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления выбор одного или более видов ВМР (т.е. для измерения содержание) зависит от типа образца. В некоторых вариантах осуществления один или более видов ВМР содержат ВМР(18:1_18:1), например, когда образец (например, тестируемый образец и/или эталонный образец) содержит МКМ. В других вариантах осуществления один или более видов ВМР содержат ВМР(20:4_20:4), например, когда образец содержит ткань (например, ткань головного мозга, ткань печени) или плазму, мочу или ЦСЖ. В других вариантах осуществления один или более видов ВМР содержат ВМР(22:6_22:6), например, когда образец содержит ткань (например, ткань головного мозга, ткань печени) или плазму, мочу или ЦСЖ.

В некоторых вариантах осуществления использую внутренний стандарт ВМР (например, ВМР(14:0_14:0)) для измерения содержания одного или более видов ВМР в образце и/или определения эталонного значения (например, измерения содержания одного или более видов ВМР в эталонном образце). Например, в образец (например, тестируемый образец и/или эталонный образец) можно добавлять известное количество внутреннего стандарта ВМР, чтобы оно служило точкой калибровки так, чтобы можно было определить количество одного или более видов ВМР, которые присутствуют в образце. В некоторых вариантах осуществления реагент, используемый при экстракции или выделении ВМР из образца (например, метанол) «обогащен» внутренним стандартом ВМР. Как правило, внутренний стандарт ВМР представляет собой вид, который естественным образом не присутствует у субъекта.

Глюкозилсфингозин (GlcSph)

В данном документе предложены способы мониторинга уровня програнулина или варианта програнулина (например, в образце, в клетке, в ткани и/или в организме субъекта), причем определение уровня програнулина или варианта програнулина включает измерение содержания глюкозилсфингозина (GlcSph) (например, в образце, клетке, ткани и/или организме субъекта).

GlcSph представляет собой лизогликофинголипид, имеющий структуру, изображенную в формуле I:



(I).

GlcSph является субстратом глюкоцереброзидазы (GCазы), и было обнаружено, что он накапливается в клетках и тканях пациентов-людей с болезнью Гоше и в мышечных моделях, которые демонстрируют сниженную активность GCазы. Накопление GlcSph

вовлечено в висцеральные и нейрональные патологии, наблюдаемые при болезни Гоше.

В некоторых вариантах осуществления содержание GlcSph можно сравнивать с эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий связанное с програнулином расстройство или подверженный риску его развития, имеет повышенный уровень GlcSph по сравнению с эталонным значением, например, содержание GlcSph в тестируемом образце субъекта может по меньшей мере в около 1,2 раза (например, около 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 5,5 раза, 6 раз, 6,5 раза, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 8,5 раза, 9 раз, 9,5 раза, 10 раз или более) превышать эталонное значение. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение представляет собой уровень GlcSph в тестируемом образце субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, до прохождения субъектом лечения.

В некоторых вариантах осуществления способов эталонное значение измеряют в эталонном образце, полученном от эталонного субъекта или группы эталонных субъектов. Эталонный субъект или популяция эталонных субъектов могут представлять собой здорового контрольного субъекта или популяцию здоровых контрольных субъектов. Эталонный субъект или популяция эталонных субъектов могут представлять собой субъекта или популяцию субъектов, которые не имеют связанное с програнулином расстройство или сниженный уровень програнулина. В некоторых вариантах осуществления после того, как субъект, имеющий связанное с програнулином расстройство или подверженный риску его развития, проходит лечение, уровень GlcSph в тестируемом образце от субъекта может быть улучшен относительно уровня GlcSph в тестируемом образце от субъекта до прохождения субъектом какого-либо лечения. В некоторых вариантах осуществления улучшенный уровень GlcSph ближе к эталонному значению (например, эталонному значению, измеренному в эталонном образце, полученном от здорового контрольного субъекта или популяции здоровых контрольных субъектов), чем уровень GlcSph у субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, до прохождения субъектом лечения, например, улучшенный уровень GlcSph находится в пределах около 20%, 15%, 10% или 5% от эталонного значения. В некоторых вариантах осуществления улучшенный уровень GlcSph является практически таким же, что и эталонный уровень.

В некоторых случаях у субъектов, имеющих связанное с програнулином расстройство или подверженных риску его развития, повышенный уровень GlcSph по сравнению с эталонным значением может быть обнаружен, например, в цельной крови, плазме, клетке, ткани, сыворотке, цереброспинальной жидкости, интерстициальной

жидкости, мокроте, моче, лимфе или их комбинации субъекта. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень GlcSph может быть обнаружен в плазме субъекта. В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению тестируемый образец, полученный от субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, или один или более эталонных образцов могут включать плазму или относиться к ней.

Кроме того, у субъектов, имеющих связанное с програнулином расстройство или подверженных риску его развития, повышенный уровень GlcSph по сравнению с эталонным значением может быть обнаружен в головном мозге субъекта, например, в лобной доле и/или височной доле головного мозга. В конкретных вариантах осуществления повышенный GlcSph может быть обнаружен в одной или более областях лобной доли, например, верхней лобной извилине, средней лобной извилине, нижней лобной извилине и/или прецентральной извилине.

Тестируемый образец, полученный от субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, используемый в описанных в данном документе способах, может содержать клетку, такую как клетка крови, клетка головного мозга, мононуклеарная клетка периферической крови (МКПК), макрофаг костного мозга (МКМ), клетка пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), эритроцит, лейкоцит, нервная клетка, клетка микроглии, клетка коры головного мозга, клетка спинного мозга, клетка костного мозга, клетка печени, клетка почки, клетка селезенки, клетка легкого, клетка глаза, клетка ворсинок хориона, мышечная клетка, клетка кожи, фибробласт, клетка сердца, клетка лимфатического узла или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец содержит клетку крови. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец содержит клетку головного мозга.

Тестируемый образец, полученный от субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, используемый в описанных в данном документе способах, может содержать ткань, такую как ткань головного мозга, ткань коры головного мозга, ткань спинного мозга, ткань печени, ткань почки, мышечную ткань, ткань сердца, ткань глаза, ткань сетчатки, лимфатический узел, костный мозг, ткань кожи, ткань кровеносного сосуда, ткань легкого, ткань селезенки, ткань клапана или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец содержит ткань головного мозга, такую как ткань головного мозга из лобной доли или височной доли головного мозга субъекта. В конкретных вариантах осуществления ткань головного мозга, используемая в тестируемом образце, может быть получена из

верхней лобной извилины, средней лобной извилины, нижней лобной извилины и/или прецентральной извилины.

Тестируемый образец, полученный от субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, используемый в описанных в данном документе способах, может содержать эндосому, лизосому, внеклеточную везикулу, экзосому, микровезикулу или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт GlcSph используют для измерения содержания GlcSph в тестируемом образце от субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство или подверженного риску его развития, и/или определения эталонного значения (например, измерения содержания GlcSph в эталонном образце). Например, в образец (например, тестируемый образец и/или эталонный образец) можно добавлять известное количество внутреннего стандарта GlcSph, чтобы оно служило точкой калибровки так, чтобы можно было определить количество GlcSph, который присутствует в образце. В некоторых вариантах осуществления реагент, используемый при экстракции или выделении GlcSph из образца (например, метанол) «обогащен» внутренним стандартом GlcSph. Как правило, внутренний стандарт GlcSph представляет собой вид, который естественным образом не присутствует у субъекта. В некоторых вариантах осуществления внутренний стандарт GlcSph представляет собой меченный дейтерием GlcSph, такой как GlcSph(d5), используемый в примерах.

Мониторинг ответа на лечение

В одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы мониторинга уровней програнулина или уровней варианта програнулина у субъекта (например, целевого субъекта). В других аспектах предложены способы мониторинга ответа субъекта на вариант програнулина или слитый белок, описанный в данном документе, или фармацевтическую композицию или схему введения его доз для лечения заболевания или расстройства (например, любого, описанного в данном документе).

Как правило, содержание каждого из одного или более видов BMP и/или GlcSph в тестируемом образце сравнивают с одним или более эталонными значениями (например, соответствующим эталонным значением). В некоторых вариантах осуществления значение BMP и/или значение GlcSph измеряют до лечения и в один или более моментов времени после лечения. Значение содержания, полученное в более поздний момент времени, можно сравнивать со значением до лечения, а также с контрольным значением, таким как здоровый или больной контроль, для определения того, как субъект отвечает на терапию. Одно или более эталонных значений могут быть получены от отличных клеток, тканей или жидкостей, соответствующих клетке, ткани или жидкости тестируемого

образца.

В некоторых вариантах осуществления эталонное значение представляет собой содержание одного или более видов ВМР, которое измерено в эталонном образце. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение представляет собой содержание GlcSph, которое измерено в эталонном образце. Эталонным значением может быть измеренное значение содержания (например, значение содержания, измеренное в эталонном образце) или же оно может быть получено или экстраполировано из измеренного значения содержания. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение представляет собой диапазон значений, например, когда эталонные значения получены для множества образцов или популяции субъектов. Кроме того, эталонное значение может быть представлено в виде одного значения (например, измеренного значения содержания, среднего значения или медианного значения) или диапазона значений со стандартным отклонением или стандартной погрешностью или без них.

Когда получают два или более тестируемых образцов (например, от субъекта), моменты времени, в которые они получены, может разделять около 1, 12, 24 или более часов; около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней; около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель; или даже больше. Когда получают три или более тестируемых образцов, временные интервалы между получением каждого из тестируемых образцов могут все быть одинаковыми, интервалы могут все быть разными или комбинированными.

В некоторых вариантах осуществления как первый тестируемый образец, так и второй тестируемый образец получены от субъекта (например, целевого субъекта) после прохождения субъектом лечения, т.е. первый тестируемый образец получен от субъекта в более ранний момент времени на протяжении лечения, чем второй тестируемый образец. В некоторых вариантах осуществления первый тестируемый образец получен до прохождения субъектом лечения расстройства, связанного со сниженным уровнем програнулина (т.е. тестируемый образец до лечения), а второй тестируемый образец получен после прохождения субъектом лечения расстройства, связанного со сниженным уровнем програнулина (т.е. тестируемый образец после лечения). В некоторых вариантах осуществления от субъекта получают более одного (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) тестируемого образца до лечения и/или после лечения. Кроме того, число получаемых тестируемых образцов до лечения и после лечения не обязательно должно быть одинаковым.

В некоторых вариантах осуществления может быть определено, что субъект не отвечает на лечение, когда измеренное содержание видов ВМР находится в пределах около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%,

18%, 19% или 20% от эталонного значения, полученного в эталонном образце от субъекта до прохождения субъектом какого-либо лечения.

В некоторых вариантах осуществления может быть определено, что субъект отвечает на лечение, когда измеренное содержание видов BMP находится в пределах около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% от эталонного значения, полученного в эталонном образце от здорового контрольного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления может быть определено, что субъект не отвечает на лечение, когда измеренное содержание GlcSph находится в пределах около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% от эталонного значения, полученного в эталонном образце от субъекта до прохождения субъектом какого-либо лечения.

В некоторых вариантах осуществления может быть определено, что субъект отвечает на лечение, когда измеренное содержание GlcSph находится в пределах около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% от эталонного значения, полученного в эталонном образце от здорового контрольного субъекта.

Когда субъект (например, целевой субъект) не отвечает на лечение (например, расстройства, связанного со сниженным уровнем програнулина), в некоторых вариантах осуществления изменяют (например, повышают) дозировку одного или более терапевтических агентов (например, програнулина) и/или изменяют интервал введения доз (например, время между дозами уменьшают). В некоторых вариантах осуществления, когда субъект не отвечает на лечение, выбирают другой терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, когда субъект не отвечает на лечение, прекращают применение одного или более терапевтических агентов.

Методики выявления BMP и Glcsph

В некоторых вариантах осуществления для выявления и/или измерения содержания одного или более видов BMP и/или GlcSph можно использовать антитела. В некоторых вариантах осуществления виды BMP, связанные с антителом, можно выявлять, например, с помощью микроскопии или ELISA. В некоторых вариантах осуществления GlcSph, связанный с антителом, можно выявлять, например, с помощью микроскопии или ELISA.

В других вариантах осуществления для выявления и/или измерения содержания одного или более видов BMP и/или GlcSph используют масс-спектрометрию (МС) в соответствии со способами по настоящему изобретению. Масс-спектрометрия

представляет собой методику, в которой соединения ионизируют, а полученные в результате ионы сортируют по отношению их массы и заряда (сокращенно m/Q , m/q , m/Z или m/z). Образец (например, содержащий молекулу ВМР и/или молекулу GlcSph), который может находиться в газообразной, жидкой или твердой форме, ионизируют, а полученные в результате ионы затем ускоряют в электрическом и/или магнитном поле, что приводит к их разделению по отношению их массы и заряда. Эти ионы в конечном итоге ударяются о детектор ионов, и создается масс-спектрограмма. Отношения массы к заряду регистрируемых ионов вместе с их относительным содержанием можно использовать для идентификации родительского(их) соединения(й), иногда путем корреляции известных масс (например, целых или интактных молекул) с массами регистрируемых ионов и/или путем распознавания профилей, регистрируемых на масс-спектрограмме.

В некоторых вариантах осуществления один или более видов ВМР и/или GlcSph можно выявлять с помощью одной МС, в которой используется один масс-анализатор (например, квадрупольный). В некоторых вариантах осуществления один или более видов ВМР и/или GlcSph можно выявлять с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), в которой используется ряд масс-анализаторов (например, три масс-анализатора) для проведения нескольких циклов масс-спектрометрии, как правило, с этапом фрагментации молекул между ними.

Для фрагментации можно использовать несколько методов, включая, но не ограничиваясь этим, индуцированную столкновениями диссоциацию (ИСД), диссоциацию с захватом электронов (ДЗЭ), диссоциацию с переносом электронов (ДПЭ), инфракрасную многофотонную диссоциацию (ИКМФД), чернотельную инфракрасную излучательную диссоциацию (ЧИЧД), диссоциацию с отрывом электронов (ДОЭ) и индуцированную поверхностью диссоциацию (ИПД).

Тандемные масс-спектрометры можно использовать для проведения разных типов экспериментов, включая полное сканирование, сканирование дочерних ионов, сканирование ионов-предшественников, сканирование потерь нейтральных частиц и сканирование с мониторингом селективных (или множественных) реакций (МСР или ММР). В эксперименте с полным сканированием проводится сканирование всего диапазона масс или его части в обоих масс-анализаторах (например, Q1 и Q3), а второй масс-анализатор (например, Q2) не содержит газ для соударений. Это позволяет регистрировать все ионы, содержащиеся в образце. В эксперименте со сканированием дочерних ионов для первого масс-анализатора (например, Q1) выбирается определенное отношение массы к заряду, второй масс-анализатор (например, Q2) наполняется газом для

соударений для фрагментации ионов, имеющих выбранное отношение массы к заряду, а затем сканируется весь диапазон масс (или его часть) третьего масс-анализатора (например, Q3). Это позволяет регистрировать все фрагментированные ионы выбранного иона-предшественника. В эксперименте со сканированием ионов-предшественников сканируется весь диапазон масс (или его часть) первого масс-анализатора (например, Q1), второй масс-анализатор (например, Q2) наполняется газом для соударений для фрагментации ионов, попадающих в диапазон сканирования, а для третьего масс-анализатора (например, Q3) выбирается определенное отношение массы к заряду. Путем корреляции времени между регистрацией дочернего иона и конкретного отношения массы к заряду, которое было выбрано непосредственно перед его регистрацией, этот тип эксперимента может позволить определить какой(ие) ион(ы)-предшественник(и) мог(могли) дать представляющий интерес дочерний ион. В эксперименте со сканированием потерь нейтральных частиц сканируется весь диапазон масс (или его часть) первого масс-анализатора (например, Q1), второй масс-анализатор (например, Q2) наполняется газом для соударений для фрагментации всех ионов в диапазоне сканирования, а третий масс-анализатор (например, Q3) сканируется в определенном диапазоне, который соответствует индуцированной фрагментацией потере одной определенной массы, появляющейся для каждого потенциального иона в диапазоне сканирования предшественников. Этот тип эксперимента позволяет идентифицировать всех предшественников, которые утратили конкретную представляющую интерес химическую группу (например, метильную группу) в целом. В эксперименте ММР для первого масс-анализатора (например, Q1) выбирается одно определенное отношение массы к заряду, второй масс-анализатор (например, Q2) наполняется газом для соударений, а третий масс-анализатор (например, Q3) устанавливается на другое определенное отношение массы к заряду. Этот тип эксперимента позволяет осуществлять высокоспецифическую регистрацию молекул, для которых известно, что они фрагментируются на продукты, которые выбраны для третьего масс-анализатора. Методы МС и МС/МС дополнительно описаны в Grebe *et al. Clin. Biochem. Rev.* (2011) 32:5-31, в полном объеме и во всех целях включенной в данный документ посредством ссылки.

Кроме того, методики МС и МС/МС могут быть сопряжены с методиками жидкостной хроматографии (ЖХ) или газовой хроматографии (ГХ). Такие методы жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ЖХ-МС), жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС), газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС), газовой хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ГХ-МС/МС) обеспечивают улучшенное масс-разрешение и определение массы по сравнению

с теми, которые обычно возможны только с МС или МС/МС.

Жидкостная хроматография относится к процессу, в котором один или более компонентов жидкого раствора избирательно замедляются по мере равномерного прохождения жидкости через колонку мелкодисперсного вещества или через капиллярные протоки. Замедление является результатом распределения компонентов смеси между одной или более стационарными фазами и объемобразующей жидкостью (т.е. подвижной фазой) по мере того, как жидкость перемещается относительно стационарной(ых) фазы (фаз). Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), также иногда известная как «жидкостная хроматография высокого давления», представляет собой вариант ЖХ, при котором степень разделения повышается за счет пропуска подвижной фазы под давлением через стационарную фазу, как правило, плотно упакованную колонку.

Кроме того, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ), также известная как «жидкостная хроматография ультравысокого давления» или «ультраэффективная жидкостная хроматография (УЭЖХ)», является вариантом ВЭЖХ, который проводят, используя намного большие давления, чем в случае традиционных методик ВЭЖХ.

Газовая хроматография относится к методу разделения и/или анализа соединений, которые можно переводить в парообразное состояние без разрушения. Подвижной фазой является газ-носитель, который, как правило, представляет собой инертный газ (например, гелий) или не вступающий в реакцию газ (например, азот), а стационарной фазой, как правило, является микроскопическая жидкость или полимерный слой, расположенный на инертной твердой подложке внутри стеклянной или металлической трубки, которая служит «колонкой». Когда представляющие интерес газообразные соединения взаимодействуют со стационарной фазой в колонке, они дифференциально замедляются и элюируются из колонки в разное время. Разделенные соединения затем можно вносить в масс-спектрометр.

В некоторых вариантах осуществления для выявления и/или измерения содержания одного или более видов ВМР и/или GlcSph используют методы на основе антител. Неограничивающие примеры подходящих методов включают методики ELISA, иммунофлуоресценции и радиоиммуноанализа (РИА). Методы проведения ELISA, иммунофлуоресценции и РИА известны в данной области техники.

В способах по настоящему изобретению можно использовать любое число типов образцов в качестве тестируемого образца и/или эталонного образца при условии, что образец содержит ВМР и/или GlcSph в количестве, достаточном для выявления, так, чтобы можно было измерить содержание. Неограничивающие примеры включают клетки,

ткани, кровь (например, цельную кровь, плазму, сыворотку), жидкости (например, цереброспинальную жидкость, мочу, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, лимфу, сперму, грудное молоко, околоплодную жидкость), кал, мокроту или любую их комбинацию. Неограничивающие примеры подходящих типов клеток включают МКМ, клетки крови (например, МКПК, эритроциты, лейкоциты), нервные клетки (например, клетки головного мозга, клетки коры головного мозга, клетки спинного мозга), клетки костного мозга, клетки печени, клетки почек, клетки селезенки, клетки легкого, клетки глаза (например, клетки сетчатки, такие как клетки ПЭС), клетки ворсинок хориона, мышечные клетки, клетки кожи, фибробласты, клетки сердца, клетки лимфатического узла или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления образец содержит часть клетки. В некоторых вариантах осуществления образец очищен из клетки или ткани. Неограничивающие примеры очищенных образцов включают эндосомы, лизосомы, внеклеточные везикулы (например, экзосомы, микровезикулы) и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления образец (например, тестируемый образец и/или эталонный образец) содержит клетку, которая является культивируемой клеткой. Неограничивающие примеры включают МКМ и клетки ПЭС. МКМ можно получать, например, путем обеспечения образца, содержащего МКПК и культивирования моноцитов, содержащихся в нем.

Неограничивающие примеры подходящего образца ткани включают нервную ткань (например, ткань головного мозга, ткань коры головного мозга, ткань спинного мозга), ткань печени, ткань почки, мышечную ткань, ткань сердца, ткань глаза, (например, ткань сетчатки), лимфатические узлы, костный мозг, ткань кожи, ткань кровеносного сосуда, ткань легкого, ткань селезенки, ткань клапана или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец и/или эталонный образец содержит ткань головного мозга или ткань печени. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец и/или эталонный образец содержит плазму.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

Полипептидные цепи, содержащиеся в описанных в данном документе слитых белках, как правило, получают, используя рекомбинантные методы. Соответственно, в некоторых аспектах в изобретении предложены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любой из вариантов програнулина, полипептидов или слитых белков, описанных в данном документе, и клетки-хозяева, в которые внесены нуклеиновые кислоты, которые используют для репликации кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот и/или для экспрессии полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является

эукариотической, например, клеткой человека.

В другом аспекте предложены полинуклеотиды, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует варианты програнулина и полипептидные цепи, описанные в данном документе. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой ДНК. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой кДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой РНК.

В изобретении предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, имеющий последовательности любой из SEQ ID NO:98–108 и 123–126. Также в данном документе предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант програнулина, имеющий последовательности любой из SEQ ID NO:3–57, 111–121, 127 и 128.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включен в конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой реплицируемый вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из плазмиды, вирусного вектора, фагмиды, дрожжевого хромосомного вектора и неэписомального вектора млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. В одной серии вариантов осуществления экспрессионные конструкции нуклеиновой кислоты адаптированы для применения в качестве библиотеки поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления библиотека адаптирована для поверхностной экспрессии в дрожжах. В некоторых вариантах осуществления библиотека адаптирована для поверхностной экспрессии в фаге. В другой серии вариантов осуществления экспрессионные конструкции нуклеиновой кислоты адаптированы для экспрессии полипептида в системе, которая позволяет выделять полипептид в количествах миллиграммов или граммов. В некоторых вариантах осуществления система представляет собой экспрессионную систему на основе клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления система представляет собой экспрессионную систему на основе клеток дрожжей.

Экспрессионные носители для получения рекомбинантного полипептида включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: плазмиды на основе pBR322, плазмиды на основе pEMBL, плазмиды на основе pEX, плазмиды на основе pVtas и плазмиды на основе pUC для экспрессии в

прокариотических клетках, таких как *E. coli*. Векторы на основе pсDNAI/amp, pсDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pко-neo и pНуг являются примерами экспрессионных векторов млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. В альтернативном варианте можно использовать производные вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барр (полученный из pHEBo, pREP и p205), для временной экспрессии полипептидов в эукариотических клетках. В некоторых вариантах осуществления может быть желательно экспрессировать рекомбинантный полипептид, используя бакуловирусную экспрессионную систему. Примеры таких бакуловирусных экспрессионных систем включают векторы на основе pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы на основе pAcUW (такие как pAcUW1) и векторы на основе pBlueBac. Дополнительные экспрессионные системы включают экспрессионные системы на основе аденовирусов, аденоассоциированных вирусов и других вирусов.

Векторы можно трансформировать в любую подходящую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, например, клетки бактерий или дрожжей, могут быть адаптированы для применения в качестве библиотеки поверхностной экспрессии. В некоторых случаях векторы экспрессируются в клетках-хозяевах для экспрессии относительно больших количеств полипептида. Такие клетки-хозяева включают клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых и прокариотические клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки NS0, клетки Y0, клетки HEK293, клетки COS, клетки Vero или клетки HeLa. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки CHO.

Клетку-хозяина, трансфицированную экспрессионным вектором, кодирующим один или более вариантов програнулина для слитого белка, описанного в данном документе, можно культивировать в соответствующих условиях, чтобы обеспечить экспрессию одного или более полипептидов. Полипептиды могут секретироваться и быть выделенными из смеси клеток и среды, содержащей полипептиды. В альтернативном варианте полипептиды могут оставаться в цитоплазме или в мембранной фракции, а клетки можно собирать, лизировать и выделять полипептиды, используя необходимый метод.

Фармацевтические композиции и наборы

В других аспектах предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие вариант програнулина или слитый белок в соответствии с изобретением.

Фармацевтические композиции

Руководство по приготовлению составов для применения в изобретении можно найти в ряде справочников по фармацевтическим препаратам и составам, которые известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит вариант програнулина или слитый белок, описанный в данном документе, и дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые не препятствуют активности активного агента или иным образом не ингибируют ее.

Вариант програнулина или слитый белок может быть составлен для парентерального введения путем инъекции. Как правило, фармацевтическая композиция для применения при *in vivo* введении является стерильной, например, была подвергнута термостерилизации, стерилизации паром, стерильной фильтрации или облучению.

Дозировки и необходимая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, могут варьироваться в зависимости от конкретного предполагаемого использования.

Наборы

В некоторых вариантах осуществления предложен набор для применения в лечении нейродегенеративного заболевания (например, ЛВД, НЦЛ, НПА, НПВ, НПС, C9ORF72-ассоциированного БАС/ЛВД, спорадического БАС, БА, болезни Гоше (например, болезни Гоше типов 2 и 3) и болезни Паркинсона), атеросклероза, расстройства, связанного с TDP-43, ВМД и связанного с програнулином расстройства, содержащий вариант програнулина или слитый белок, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит вариант програнулина или слитый белок, описанный в данном документе, и дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов для применения в лечении заболевания или расстройства, описанного в данном документе (например, нейродегенеративного заболевания (например, ЛВД)). В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструктирующие материалы, содержащие руководства (т.е. протоколы) для практического осуществления описанных в данном документе способов (например, инструкции по применению набора для введения слитого белка, содержащего вариант

програнулина). Хотя инструкции, как правило, включают письменные или печатные материалы, они не ограничены ими. Любой носитель информации, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, предусмотрен настоящим изобретением. Такие носители информации включают, но не ограничиваются этим, электронные носители данных (например, магнитные диски, ленты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т.п. Такие носители информации могут включать адреса интернет-сайтов, на которых предоставлены такие инструктирующие материалы.

Показания

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки применяют для лечения нейродегенеративного заболевания или нейродегенеративных заболеваний. Например, описанные в данном документе слитые белки можно применять для лечения одного или более нейродегенеративных заболеваний, выбранных из группы, состоящей из БА, первичной возрастной таупатии, деменции с тельцами Леви, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП), ЛВД, ЛВД с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, деменции с аргирофильным зерном, БАС, БАС/комплекса паркинсонизм – деменция Гуама (БАС-КПД), кортикобазальной дегенерации, хронической травматической энцефалопатии, болезни Крейтцфельдта-Якоба, деменции боксеров, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, синдрома Дауна, семейной деменции британского типа, семейной деменции датского типа, болезни Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, глобулярной глиальной таупатии, паркинсонизма гваделупского типа с деменцией, ПНП гваделупского типа, болезни Галлервордена-Шпатца, наследственной диффузной лейкоэнцефалопатии со сфероидными (НДЛС), миозита с тельцами включения, множественной системной атрофии, миотонической дистрофии, болезни Насу-Хакола, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, НПС, паллидо-понтонигральная дегенерация, болезни Паркинсона, болезни Пика, постэнцефалитного паркинсонизма, церебральной амилоидной ангиопатии, вызванной прионным белком, прогрессирующего субкортикального глиоза, подострого склерозирующего панэнцефалита и деменции, характеризующейся только клубками.

Ряд нейродегенеративных заболеваний может быть вызван или связан с лизосомными болезнями накопления, характеризующимися накоплением нерасщепленных или частично расщепленных макромолекул, что в конечном итоге приводит к дисфункции клеток и организма, а также к клиническим отклонениям. Лизосомные болезни накопления определяются типом накапливаемого субстрата и могут

быть классифицированы как нарушения накопления холестерина, сфинголипидозы, олигосахаридозы, муколипидозы, мукополисахаридозы, нарушения накопления липопротеинов, нейрональные цероидные липофузинозы и другие. В некоторых случаях лизосомные болезни накопления также включают дефициты или дефекты белков, которые приводят к накоплению макромолекул, таких как белки, необходимые для нормальной посттрансляционной модификации лизосомных ферментов, или белки, важные для правильной лизосомной направленной миграции. Примеры нейродегенеративных заболеваний, которые могут быть вызваны или связаны с лизосомными болезнями накопления, включают, например, ЛВД, НЦЛ, НПА, НПВ, НПС, C9ORF72-ассоциированный БАС/ЛВД, спорадический БАС, БА, болезнь Гоше (например, болезнь Гоше типов 2 и 3) и болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки применяют для лечения нейродегенеративного заболевания, вызванного или связанного с лизосомными болезнями накопления, включая, например, любые из вышеперечисленных нейродегенеративных заболеваний.

Примеры других расстройств включают атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, и ВМД. При таких расстройствах введение описанных в данном документе вариантов програнулина и слитых белков может принести пользу.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки применяют для лечения ЛВД. ЛВД представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание. ЛВД включает спектр клинически, патологически и генетически гетерогенных заболеваний, проявляющихся избирательным поражением лобных и височных долей (Gazzina et al., *Eur J Pharmacol.* 817:76-85, 2017). Клинические проявления ЛВД включают изменения в поведении и личности, недостаток исполнительных функций лобной доли и языковую дисфункцию. На основании разнообразия клинических фенотипов были идентифицированы различные проявления, такие как поведенческие варианты ЛВД (пвЛВД) и первичная прогрессирующая афазия (ППА), которые могут представлять собой нефлюэнтный/аграмматический вариант ППА (авППА), либо семантический вариант ППА (свППА). Эти клинические проявления могут также перекрываться с атипичным паркинсонизмом, таким как кортикобазальный синдром (КБС), прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП) и БАС (Gazzina et al., *Eur J Pharmacol.* 817:76-85, 2017). ЛВД ассоциируется с различными невропатологическими признаками, включая патологию тау-белка в нейронах и астроцитах или цитоплазматические включения убиквитина в нейронах. Трансактивирующий ДНК-связывающий белок с молекулярной массой 43 кДа (TDP-43) является наиболее

выраженной патологией убиквитинированного белка, накапливающейся в большинстве случаев ЛВД, а также при БАС (Petkau and Leavitt, выше). ЛВД является существенной причиной ранней деменции, причем до 80% случаев возникают в возрасте от 45 до 64 лет. Это заболевание также характеризуется существенным семейным компонентом: в около 30–50% случаев сообщается о семейном анамнезе заболевания (Petkau and Leavitt, выше).

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки применяют для лечения расстройства, связанного или ассоциированного с мутацией в *GRN*. Хотя с ЛВД было связано несколько генов, одним из наиболее часто мутирующих генов при ЛВД является *GRN*, который картирован на хромосоме 17q21 человека и кодирует богатый цистеином белок програнулин (также известный как проэпителин и акрогранин). Недавние оценки позволяют предположить, что мутации *GRN* присутствуют у 5–20% пациентов с ЛВД с положительным семейным анамнезом и в 1–5% спорадических случаев (Rademakers et al., выше). Точные молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе нейродегенерации и болезнетворных процессов при связанной с *GRN* ЛВД, неизвестны, хотя фенотипические характеристики мышей с нокаутом *GRN* в комбинации с гистологическим анализом головного мозга пациентов позволяют предположить, что как воспаление, так и лизосомные дефекты являются центральными для заболевания (Kao et al., *Nat Rev Neurosci.* 18(6):325-333, 2017). Действительно, в областях коры головного мозга пациентов присутствует массивный глиоз (Lui et al., *Cell.* 165(4):921-35, 2016), а липофусцин, лизосомный пигмент, свидетельствующий о лизосомном расстройстве, как сообщалось, был обнаружен в глазу и коре головного мозга носителей мутированного *GRN*, включая как предсимптоматических индивидов, так и пациентов (Ward et al., *Sci Transl Med.* 9(385), 2017).

Более семидесяти связанных с заболеванием мутаций *GRN* были зарегистрированы и картированы по всему гену, где они приводят к подтвержденным или спрогнозированным аллелям с потерей функции (LOF) (Ji et al. *J Med Genet.* 54:145–154, 2017). Большинство гетерозиготных мутаций, связанных с ЛВД, вызывают снижение уровня мРНК на около 50%, в первую очередь в результате деградации нонсенс-мРНК и сравнимого снижения уровня белка програнулина (Petkau and Leavitt, выше; Kao et al., выше). Более низкие уровни програнулина также присутствуют в крови (сыворотке) и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) носителей, включая предсимптоматических индивидов (Finch et al., *Nat Rev Neurosci.* 18(6):325-333, 2017; Goossens et al., *Alzheimers Res Ther.* 10(1):31, 2018; Meeter et al., *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 6(2):330-340, 2016). Таким образом, считается, что гаплонедостаточность является основным механизмом

развития заболевания при связанной с *GRN* ЛВД, что позволяет предположить, что терапевтические подходы, которые повышают уровни програнулина у носителей, могут повышать возраст появления, а также прогрессирование ЛВД (Petkau and Leavitt, *supra*; Kao et al., *supra*). Это мнение подтверждается генетическими исследованиями на людях, показывающими, что вариант гена *TMEM106B* как повышает уровни програнулина на 25%, так и повышает возраст появления связанной с *GRN* ЛВД на 13 лет (Nicholson and Rademakers, *Acta Neuropathol.* 132(5):639-651, 2016).

Сообщалось также о гомозиготных мутациях *GRN*, несмотря на то, что носители обладали совершенно другим клиническим фенотипом, известным как НЦЛ (болезнь Баттена; частота возникновения заболевания 1–2,5 на 100000 живорожденных; Cotman et al., *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13(8):366, 2013), который представляет собой лизосомную болезнь накопления (Smith et al., *Am J Hum Genet.* 90(6):1102-7, 2012; Almeida et al., *Neurobiol Aging.* 41:200.e1-200.e5, 2016). *GRN* фактически является одним из 14 генов нейронального цероидного липофуциноза (*CLN*), которые, как сообщается, связаны с НЦЛ, а *GRN* также известен как *CLN11* (Kollmann et al., *Biochim Biophys Acta.* 1832(11):1866-81, 2013). Описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки могут проявлять противовоспалительные свойства и усиливать лизосомную функцию, и то, и другое может быть полезным при НЦЛ. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки можно применять для лечения НЦЛ.

Пациенты с болезнью Гоше, несущие гомозиготные мутации в гене *GBA*, имеют более низкие уровни програнулина в сыворотке (Jian et al., *EBioMedicine* 11:127–137, 2016). Пациенты с болезнью Паркинсона с гетерозиготными мутациями в *GBA* также могут иметь более низкие уровни програнулина. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки можно применять для лечения болезни Гоше или болезни Паркинсона.

Варианты в *GRN* были связаны с БА (Rademakers et al., выше; Brouwers et al., *Neurology.* 71(9):656-64, 2008; Lee et al., *Neurodegener Dis.* 8(4):216-20, 2011; Viswanathan et al., *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 150B(5):747-50, 2009), а патология TDP-43 часто встречается в головном мозге пациентов с БА (Youmans and Wolozin, *Exp Neurol.* 237(1):90-5, 2012). Также было показано, что доставка гена програнулина снижает амилоидную нагрузку в мышечных моделях БА (van Kampen and Kay, *PLoS One.* 12(8):e0182896, 2017). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки можно применять для лечения БА.

НПА и НПВ являются результатом мутаций в гене, кодирующем кислую сфингомиелиназу (SMPD1). НПС является результатом мутаций в генах, задействованных в транспорте холестерина, т.е. NPC1 и NPC2 (Kolter and Sandhoff, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:81-103, 2005; Kobayashi et al., *Nat Cell Biol.* 1(2):113-8, 1999). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки можно применять для лечения НПА, НПВ и/или НПС.

В подавляющем большинстве случаев БАС присутствует патология TDP-43, которая также характерна для пациентов, несущих мутации *GRN* (Petkau and Leavitt, *Trends Neurosci.* 37(7):388-98, 2014; Rademakers et al., *Nat Rev Neurol.* 8(8):423-34, 2012). Среди всех случаев БАС экспансии повторов GGGGCC в гене *C9ORF72* являются наиболее частой причиной БАС и существенной причиной ЛВД. Средняя частота мутаций, зарегистрированная среди населения Северной Америки и Европы, составляет 37% для семейного БАС, 6% для спорадического БАС, 21% для семейной ЛВД и 6% для пациентов со спорадической ЛВД (Rademakers et al., выше). Кроме того, вариант *TMEM106B*, который имеет защитную функцию при связанной с *GRN* ЛВД, также имеет защитную функцию у пациентов с ЛВД, имеющих экспансии повторов в гене *C9ORF72* (van Blitterswijk et al., *Acta Neuropathol.* 127(3):397-406, 2014). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки можно применять для снижения патологии TDP-43 при *C9ORF72*-ассоциированном БАС/ЛВД, например, за счет стимуляции функции лизосом и/или уменьшения воспаления.

ВМД представляет собой дегенеративное заболевание и основную причину слепоты в развитых странах. Она вызывает повреждение макулы, небольшого пятна вблизи центра сетчатки и части глаза, необходимой для острого центрального зрения. Дегенеративные изменения глаза и потеря зрения могут быть вызваны нарушенной функцией лизосом и накоплением вредных белков за сетчаткой (Viiri et al., *PLoS One.* 8(7):e69563, 2013). По мере прогрессирования заболевания происходит повреждение сенсорных клеток сетчатки в центральной области зрения, что приводит к потере центрального зрения. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе варианты програнулина и слитые белки можно применять для лечения ВМД.

Способы лечения

Описанный в данном документе вариант програнулина или слитый белок можно применять терапевтически для лечения нейродегенеративного заболевания (например, ЛВД, НЦЛ, НПА, НПВ, НПС, *C9ORF72*-ассоциированного БАС/ЛВД, спорадического БАС, БА, болезни Гоше (например, болезни Гоше типов 2 и 3) и болезни Паркинсона),

атеросклероза, расстройства, связанного с TDP-43, ВМД или связанного с програнулином расстройства.

Описанный в данном документе вариант програнулина или слитый белок можно вводить субъекту в терапевтически эффективном количестве или дозе. Дозировки могут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая частоту введения дозы, выбранный путь введения, состав композиции, ответ пациента, тяжесть состояния, массу субъекта и мнение врача, назначающего препарат. Дозировку можно повышать или понижать с течением времени, как это необходимо для индивидуального пациента. В некоторых вариантах осуществления пациенту сначала вводят низкую дозу, которую затем увеличивают до эффективной дозы, переносимой пациентом.

В различных вариантах осуществления описанный в данном документе вариант програнулина или слитый белок вводят любым путем. В некоторых вариантах осуществления белок вводят путем парентеральной доставки. В некоторых вариантах осуществления белок вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления белок вводят путем внутрибрюшинной доставки.

Примеры

Настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью конкретных примеров. Следующие примеры предложены исключительно в иллюстративных целях и никоим образом не подразумевают ограничения изобретения. Специалисты в данной области техники легко распознают ряд некритических параметров, которые можно изменять или модифицировать для получения практически таких же результатов. Были приняты меры для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температур и т.д.), однако могут присутствовать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. При практическом осуществлении настоящего изобретения будут использовать, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. Кроме того, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что методы конструирования, применяемые к определенным библиотекам, также можно применять к другим библиотекам, описанным в данном документе.

Пример 1. Экспрессия и очистка рекомбинантного слитого белка Fc-димер:PGRN

Для экспрессии рекомбинантных слитых белков Fc-димер:PGRN экспрессировали конструкции посредством временной трансфекции клеток яичника китайского хомяка (CHO) K1 с нокаутом глутаминсинтетазы (GS) (Horizon Discovery) с использованием PEIMax (MW 40,000, Linear, Polysciences) при соотношении 1:4 ДНК (мкг) и ПЭИ

(мкл). Сначала клетки выращивали и трансфицировали в BalanCD Transfectory CHO (Irvine Scientific) при 37°C. После трансфекции температуру клеточной культуры изменяли до 32°C, и поддерживали во время культивирования условия с 5% CO₂ и 80% влажности в орбитальном шейкере (Infors Multitron). В день 1 культивирования добавляли питательную добавку BalanCD CHO Feed 4 (Irvine Scientific) при 20% исходного объема культуры. Через 7 дней путем центрифугирования собирали белок с последующей фильтрацией через 0,22 мкм ПЭС фильтр.

В случае слитых белков, экспрессируемых в клетках НЕК, в Expi293 (Thermo-Fisher), клетки трансфицировали при плотности 2×10^6 клеток/мл комплексом экспифектаминTM 293/плазмидная ДНК, следуя инструкциям производителя (Thermo-Fisher). После трансфекции клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 6–8% CO₂ в орбитальном шейкере (Infors HT Multitron). Через один день после трансфекции в культуру добавляли усилитель трансфекции экспифектаминTM 1 и 2. Супернатант среды собирали путем центрифугирования через 96 часов после трансфекции. В осветленный супернатант добавляли не содержащий ЭДТА ингибитор протеаз (Roche) и хранили при -80°C.

Для очистки слитого белка осветленный супернатант среды загружали в аффинную колонку с протеином А HiTrap MabSelect Prisma (GE Healthcare Life Sciences) и промывали 0,5% (об./об.) Тритона X-100 в буфере ФСБ, pH 7,4, с 0,5 М NaCl). Слитый белок элюировали в 50 мМ цитратном буфере с 100 мМ NaCl, pH 3,5–3,6. Элюат из аффинной колонки (1) загружали в колонку для обессоливания HiTrap® (GE Healthcare Life Sciences) для тандемной замены буфера на конечный буфер 1х ФСБ или (2) нейтрализовали добавлением аргинин-сукцинатного буфера (1 М аргинина, 685 мМ янтарной кислоты, pH 5,0) для доведения pH элюата. В случае некоторых слитых белков элюат из аффинной колонки дополнительно обрабатывали путем загрузки в катионообменную колонку (SP HP, HiTrapTM) и промывки колонки 200 мМ NaCl, pH 5,0. Затем слитый белок элюировали, применяя градиент раствора NaCl (от 200 мМ до 500 мМ), 20 объемами колонки. Затем объединяли фракции, содержащие > 95% белка. В объединенные фракции добавляли сульфат аммония до конечной концентрации около 1 М, после чего раствор загружали в колонку с гидрофобным взаимодействием (Butyl HP, HiTrapTM). Колонку промывали 1 М сульфатом аммония в 0,1 М цитратном буфере, pH 6,0, и элюировали белок, применяя градиент сульфата аммония (от 1 М до 0), 20 объемами колонки. Объединенные фракции, содержащие > 95% белка, объединяли и проводили их диализ в 10 мМ натрий-фосфатного буфере, содержащего 6% сахарозы. Получали очищенный белок в 10 мМ фосфате натрия, 6% сахарозы, pH 6,5. В таблицах 2 и 3 ниже

приведены последовательности типовых слитых белков.

На фиг. 1А и 1В приведены репрезентативные данные, показывающие, что слитые белки были очищены до более чем 98% чистоты.

Таблица 2. Последовательности слитых белков Fc-димер:PGRN

| Fc-димер:PGRN | Первый Fc-полипептид | Второй Fc-полипептид – PGRN |
|---------------|----------------------|-----------------------------|
| Слияние 1 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:98 |
| Слияние 2 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:99 |
| Слияние 3 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:100 |
| Слияние 4 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:101 |
| Слияние 5 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:102 |
| Слияние 6 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:98 |
| Слияние 7 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:99 |
| Слияние 8 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:100 |
| Слияние 9 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:101 |
| Слияние 10 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:102 |
| Слияние 11 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:108 |
| Слияние 32 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:123 |
| Слияние 34 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:124 |
| Слияние 36 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:125 |
| Слияние 37 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:126 |

Таблица 3. Дополнительные последовательности слитых белков Fc-димер:PGRN

| Fc-димер:PGRN | Первый Fc-полипептид | Второй Fc-полипептид – PGRN | | |
|---------------|----------------------|----------------------------------|--------------|---------------|
| | | Частичная шарнирная область + Fc | Линкер | Вариант PGRN |
| Слияние 12 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:111 |
| Слияние 13 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:112 |
| Слияние 14 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:113 |
| Слияние 15 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:114 |
| Слияние 16 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:115 |
| Слияние 17 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:116 |
| Слияние 18 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:117 |
| Слияние 19 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:118 |
| Слияние 20 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:119 |
| Слияние 21 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:120 |
| Слияние 22 | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:121 |
| Слияние 23 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:4 |
| Слияние 24 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:5 |
| Слияние 25 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:6 |
| Слияние 26 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:7 |
| Слияние 27 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:8 |
| Слияние 28 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:9 |
| Слияние 29 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:10 |
| Слияние 30 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:11 |
| Слияние 31 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:12 |
| Слияние 32 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:13 |
| Слияние 33 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:14 |
| Слияние 34 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:15 |
| Слияние 35 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:16 |
| Слияние 36 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:19 |
| Слияние 37 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:20 |
| Слияние 38 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:21 |
| Слияние 39 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:22 |

| Fc-димер:PGRN | Первый Fc-полипептид | Второй Fc-полипептид – PGRN | | |
|---------------|----------------------|----------------------------------|--------------|---------------|
| | | Частичная шарнирная область + Fc | Линкер | Вариант PGRN |
| Слияние 40 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:23 |
| Слияние 41 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:24 |
| Слияние 42 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:25 |
| Слияние 43 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:26 |
| Слияние 44 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:30 |
| Слияние 45 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:31 |
| Слияние 46 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:32 |
| Слияние 47 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:33 |
| Слияние 48 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:34 |
| Слияние 49 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:35 |
| Слияние 50 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:36 |
| Слияние 51 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:37 |
| Слияние 52 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:38 |
| Слияние 53 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:39 |
| Слияние 54 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:40 |
| Слияние 55 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:41 |
| Слияние 56 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:42 |
| Слияние 57 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:43 |
| Слияние 58 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:44 |
| Слияние 59 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:45 |
| Слияние 60 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:46 |
| Слияние 61 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:47 |
| Слияние 62 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:48 |
| Слияние 63 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:49 |
| Слияние 64 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:50 |
| Слияние 65 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:51 |
| Слияние 66 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:52 |
| Слияние 67 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:53 |
| Слияние 68 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:54 |
| Слияние 69 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:56 |
| Слияние 70 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:57 |
| Слияние 71 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:127 |
| Слияние 72 | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:110 | SEQ ID NO:91 | SEQ ID NO:128 |

Пример 2. Нисходящий масс-спектрометрический анализ расщепления С-конца слитых белков Fc-димер:PGRN

Измерения для интактных слитых белков Fc-димер:PGRN, экспрессированных и очищенных из клеток CHO, проводили посредством пептидного картирования или посредством нисходящей масс-спектрометрии, используя прибор Thermo Ultimate 3000 UHPLC в сочетании с масс-спектрометром Exactive plus EMR. Для сравнения также оценивали слитый белок, содержащий последовательность PGRN дикого типа (слияние 11), экспрессированный в клетках HEK293 или клетках CHO.

Нисходящий масс-спектрометрический анализ

Для анализа вводили приблизительно 10 мкг образца в буфере ФСБ или рецептурном буфере (10 мМ фосфатный буфер, pH 6,5, 6% сахарозы). Жидкостную хроматографию (ЖХ) проводили с помощью колонки Thermo MabPAC RP (4 мкм, 2,1 x 50

мм, P/N 88648) при температуре колонки 55°C, используя подвижную фазу (А) из 0,1 трифторуксусной кислоты (ТФУ) в H₂O и подвижную фазу (В) из ацетонитрила при скорости потока 0,3 мл/минута. Градиент начинался с 20% (В) с поэтапным повышением до 70% (В) перед возвращением до 20% (В). Выявление проводили, используя УФ/Вид на 214 нм и 280 нм. Масс-спектрометр EMR работал с двумя сканированиями в рамках анализа фрагментации всех ионов (AIF).

Настройки первого AIF: диапазон сканирования 350–5000 m/z. SE: 25. ИСД в источнике 90 эВ. Настройки разрешения: 17500 и целевая АРУ 3еб, максимальное ИВ: 200 мс. Микросканирований: 1.

Настройки второго AIF: диапазон сканирования 350–5000 m/z. SE: 200. ИСД в источнике 90 эВ. Настройки разрешения: 35000 и целевая АРУ 1еб, максимальное ИВ: 200 мс. Микросканирований: 5.

Условия источника ионизации электрораспылением (ИЭР): Скорость потока защитного газа: 25, скорость проходящего газа: 4. Напряжение распыления 3 кВ, темп. капилляра 325°C, S-линза, уровень ВЧ 125. Темп. нагревателя проходящего газа 300°C. Включен режим EMR. Настройки давления уловленного газа 2,0.

Индукцированное нисходящей реакцией газовой фазы расщепление С-конца PGRN между аминокислотами аспарагиновой кислотой (D) и пролином (P) (что соответствует позиции 569 и позиции 570 в SEQ ID NO:2), которое приводило к получению интактных пептидов длиной 7 аминокислот с последовательностями, соответствующими различным последовательностям С-конца разных вариантов програнулина. Отщепленные пептиды представляли последовательное уменьшение С-конца. Пептидные ХИС-пики получали, используя 20 м.д. (миллионных долей), а площадь под кривой (ППК) использовали, чтобы рассчитать процентное содержание интактных белков относительно общего содержания белка.

Анализ методом пептидного картирования

Для приготовления образцов приблизительно 40 мкг образца в 50 мМ бикарбоната (рН 7,8) инкубировали с AspN (New England Biolabs, кат. P8014S) при отношении фермент:белок 1:40 (масс./масс.) в течение 30 мин при 37°C. Чтобы погасить реакцию, добавляли муравьиную кислоту (1%) и переносили образцы во флаконы для ЖХМС для анализа. Анализ методом пептидного картирования проводили с помощью жидкостной хроматографии на приборе UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, CA, USA), сопряженном с УФ/Вид и масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, CA, USA). Для каждого анализа 25 мкл образца вводили в 1,7 мкм, 2,1×150 мм колонку CSH C18 (Waters), используя скорость потока 0,20 мл/мин при 40°C в

режиме положительной ионизации. Подвижная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты, тогда как подвижная фаза В состояла из ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты. Градиент начинался с 1% (В) и повышался за три этапа от 1% до 10% (В), от 10% до 40% (В) и от 40% до 70% (В) в течение 50-минутного периода перед возвращением до 1% (В). УФ/Вид-кривую записывали на длинах волн 280 и 214 нм, а данные получали, используя Full MS-ddMS2 в положительном режиме. Площади пиков использовали, чтобы рассчитать процентное содержание интактных и расщепленных пептидов.

В таблице 4 ниже показано, что более чем 95% продуктов слияния 1 имели интактный С-конец и более чем 80% продуктов слияния 2 имели интактный С-конец. Количество усеченного слитого белка (например, слитого белка с отсутствующим участком между аминокислотами 1 и 3 на С-конце) составляло менее 5% (слияние 1) и менее 20% (слияние 2). В таблице 4, «-L», «-IL», «-PIL», «-FL» и «-PFL» относятся к концевым аминокислотам, отщепленным от слитых белков. Данные для дополнительных слитых белков можно найти в таблицах 8А и 8В. В качестве точки сравнения 95% слитого белка, содержащего PGRN дикого типа (слияние 11), оставались интактными при экспрессии в клетках НЕК, тогда как 7% слияния 11 оставались интактными при экспрессии в клетках СНО.

Таблица 4

| | Слияние 1 (PIL) | | | Слияние 2 (PFL) | |
|-----------|------------------|-------------------------|-----------|------------------|-------------------------|
| | Значение площади | % относительной площади | | Значение площади | % относительной площади |
| Интактный | 50114249 | 95,6 | Интактный | 41831754 | 80,3 |
| -L | 2206596 | 4,2 | -L | 9100294 | 17,5 |
| -IL | 12728 | 0,0 | -FL | 529791 | 1,0 |
| -PIL | 76847 | 0,1 | -PFL | 608392 | 1,2 |

Пример 3. Термическая стабильность и стабильность при замораживании/размораживании

Термическую стабильность слитых белков измеряли на приборе Prometheus (NanoTemper). Использовали характерную флуоресценцию для мониторинга белка во время поэтапного повышения температуры с целью создания профиля плавления (T_m , $T_{начало}$). Результаты для слияния 1 и слияния 2 проиллюстрированы на фиг. 2.

Слитые белки также подвергали анализу с замораживанием-размораживанием. Вкратце, образец белка инкубировали на сухом льду в течение около 10 минут, после чего образец переносили в условия комнатной температуры и инкубировали в течение 30 минут. Цикл замораживания/размораживания повторяли пять раз, после чего температуру образцов устанавливали на 4°C и проводили анализ, используя ЭХ-ВЭЖХ (колонка Waters ВЕН SEC, 200 Å 1,7 мкм, 30 см, с подвижной фазой 2х ФСБ с 10% (об./об.) этанола, скорость потока 0,2 мл/мин). Результаты для слияния 1 и слияния 2

проиллюстрированы на фиг. 3.

Результаты, полученные для слияния 1 и слияния 2 (фиг. 2 и 3) показывают, что два слитых белка имели хорошую термическую стабильность и хорошую стабильность при замораживании/размораживании.

Пример 4. Связывание рекомбинантного слитого белка Fc-димер:PGRN с сортилином

Все эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу (ППР) проводили на приборе GE Healthcare Biacore 8K с сенсорным чипом серии S CM5 и подвижным буфером HBS-EP+ при 25°C. Для измерения аффинности связывания слитых белков Fc-димер:PGRN в отношении сортилина проводили захват слитых белков, используя сенсорный чип, который иммобилизовали с помощью набора для захвата человеческих антител GE Healthcare Human (для сортилина человека) или сенсорный чип с протеином A Biacore™ (для сортилина яванского макака и мыши, Cytiva, № 29127555). Использовали многоцикловую кинетику с сериями 3-кратных концентраций аналита сортилина в диапазоне 0,4 нМ – 100 нМ с обеспечением 300 секунд времени контакта, 600 секунд времени диссоциации и скорости потока 30 мкл/мин. 1:1 кинетическую модель использовали для оценки кинетики связывания для связывания сортилина. Данные Biacore по связыванию слитых белков Fc-димер:PGRN с сортилином приведены в таблицах 5–7 ниже. Аналит сортилин был предоставлен следующим образом: сортилин человека (R&D Systems); сортилин мыши (R&D Systems); сортилин яванского макака (внутрилабораторный, на основе UniProt A0A2K5VHG2).

Как проиллюстрировано в таблице 5, слияние 1 демонстрировало большую аффинность в отношении сортилина человека по сравнению со слиянием 2. По сравнению со слитым белком, содержащим PGRN дикого типа (слияние 11), экспрессированным в клетках НЕК, слияние 1 демонстрировало меньшую потерю аффинности связывания в отношении сортилина человека (приблизительно в 3 раза), чем слияние 2 (приблизительно в 14 раз). Потеря аффинности в отношении сортилина человека, по-видимому, является результатом более быстрой кинетики диссоциации в случае как слияния 1, так и слияния 2, по сравнению со слитым белком с PGRN дикого типа. По сравнению со слитым белком с PGRN дикого типа (слияние 11), экспрессированным в клетках НЕК, слияние 1 демонстрировало приблизительно такую же аффинность связывания в отношении сортилина мыши и в 2–3 раза более слабую аффинность связывания в отношении сортилина яванского макака.

Таблица 5. Связывание сортилина человека

| Слитый белок | k_a (1/Мс) | k_d (1/с) | K_D (М) | Кратность разницы относительно слияния 11 (НЕК) |
|------------------|--------------|-------------|-----------|---|
| Слияние 11 (НЕК) | 1,08E+05 | 1,66E-03 | 1,53E-08 | 1,0 |
| Слияние 1 (СНО) | 9,59E+04 | 4,66E-03 | 4,85E-08 | 3,2 |
| Слияние 2 (СНО) | 8,50E+04 | 1,82E-02 | 2,14E-07 | 14,0 |

Таблица 6. Связывание сортилина мыши

| Слитый белок | k_a (1/Мс) | k_d (1/с) | K_D (М) |
|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| Слияние 11 (НЕК) | $3,87 \times 10^4$ | $2,94 \times 10^{-3}$ | $7,61 \times 10^{-8}$ |
| Слияние 1 (СНО) | $2,03 \times 10^5$ | $1,38 \times 10^{-2}$ | $6,38 \times 10^{-8}$ |

Таблица 7. Связывание сортилина яванского макака

| Слитый белок | k_a (1/Мс) | k_d (1/с) | K_D (М) |
|------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| Слияние 11 (НЕК) | $5,38 \times 10^4$ | $1,43 \times 10^{-3}$ | $2,65 \times 10^{-8}$ |
| Слияние 1 (СНО) | $4,49 \times 10^4$ | $2,96 \times 10^{-3}$ | $6,58 \times 10^{-8}$ |

Связывание сортилина дополнительных слитых белков анализировали методом ППР (описанным выше) или методом стандартного колориметрического анализа ELISA, в котором измеряют связывание слитых белков Fc-димер: PGRN с иммобилизованным сортилином. Для измерений методом ELISA рекомбинантный His-меченный сортилин (R&D Systems, кат. 3154-ST-050) иммобилизовали на покрытом никелем 96-луночном планшете. Слитые белки, содержащие смесь интактного белка и белка с расщепленным C-концом («% интактного» в таблицах 8А и 8В) разводили в 3% БСА/ТБСТ и добавляли в покрытые лунки в серийных разведениях. После инкубации со слитыми белками при комнатной температуре в течение двух часов лунки промывали ТБСТ. Выявление слитых белков проводили путем инкубации при комнатной температуре в течение одного часа с антителом к IgG человека (козье HRP-конъюгированное антитело к IgG человека, Jackson ImmunoResearch, кат. 109-035-088), разведенным в 3% БСА/ТБСТ. После инкубации с антителом для выявления лунки промывали ТБСТ и инкубировали с раствором ТМБ (Surmodics, кат. TMBW-1000-01) в течение пяти минут. Ход реакции останавливали с помощью 450 нМ стоп-раствора (Surmodics, кат. LSTP-1000-01) и измеряли поглощение на 450 нм, используя планшет-ридер BioTek Synergy (модель Neo2). Результаты для типовых слитых белков приведены в таблицах 8А и 8В. Все слитые белки, перечисленные в таблицах 8А и 8В, были экспрессированы из клеток СНО за исключением тех, для которых указано иное.

Таблица 8А

| Слитый белок | Замена QLL на | % интактного (нисходящая МС) | % интактного (пептидное картирование) | EC50 сортилина (нМ) (ELISA) | Кратность разницы в EC50 |
|------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Слияние 11 (НЕК) | --- | 95% | --- | 2,8 | 1,0 |
| Слияние 11 (СНО) | --- | 7% | --- | 60 ± 12,7 | 21,0 |
| Слияние 6 | PIL | 98% | --- | 13,5 | 4,8 |
| Слияние 7 | PFL | 87% | --- | 14,3 | 5,1 |
| Слияние 8 | QQL | 59% | --- | 19,1 | 6,8 |
| Слияние 9 | VVL | 39% | --- | 18,6 | 6,6 |
| Слияние 10 | VTL | 29% | --- | 23,9 | 8,5 |
| Слияние 12 | NIL | 3% | --- | 34,4 | 12,3 |
| Слияние 13 | LLL | < 1% | --- | 56,5 | 20,2 |
| Слияние 14 | PLL | < 1% | --- | 55 | 19,6 |
| Слияние 15 | PRL | < 1% | --- | 120 | 42,9 |
| Слияние 16 | YIL | --- | 0,6% | > 100 | > 50 |
| Слияние 17 | VLL | --- | 2,5% | > 100 | > 50 |
| Слияние 18 | VIV | --- | 35% | > 100 | > 50 |
| Слияние 19 | FIL | --- | 4,4% | > 100 | > 50 |
| Слияние 20 | MLL | --- | 0,7% | > 100 | > 50 |
| Слияние 21 | QLLG (SEQ ID NO:142) | 0% | --- | > 100 | > 50 |
| Слияние 22 | QLLGK (SEQ ID NO:143) | 0% | --- | > 100 | > 50 |

Таблица 8В

| Слитый белок | Замена QLL на | % интактного (пептидное картирование) | K _D (М) сортилина (ППР) | Кратность разницы в K _D |
|------------------|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Слияние 11 (НЕК) | --- | 85,8% | 9,70E-09 | 1,0 |
| Слияние 1 | PIL | 91,0% | 3,27E-08 | 3,4 |
| Слияние 23 | PHL | --- | 5,18E-08 | 5,3 |
| Слияние 24 | PKL | 38,0% | 1,10E-08 | 1,1 |
| Слияние 25 | PDL | --- | 4,88E-08 | 5,0 |
| Слияние 26 | PEL | 51,4% | 2,98E-08 | 3,1 |
| Слияние 27 | PSL | --- | 7,96E-08 | 8,2 |
| Слияние 28 | PTL | --- | 5,51E-08 | 5,7 |
| Слияние 29 | PNL | --- | 1,04E-07 | 10,7 |
| Слияние 31 | PGL | --- | 4,67E-08 | 4,8 |
| Слияние 32 | PPL | 89,70% | 9,30E-09 | 1,0 |
| Слияние 34 | PYL | 77,8% | 2,62E-08 | 2,7 |
| Слияние 35 | PVL | --- | 4,57E-08 | 4,7 |
| Слияние 36 | QRL | 64,7% | 1,24E-08 | 1,3 |
| Слияние 37 | QHL | 62,6% | 1,17E-08 | 1,2 |
| Слияние 38 | QKL | 62,7% | 1,57E-08 | 1,6 |
| Слияние 39 | QDL | --- | 4,04E-08 | 4,2 |
| Слияние 41 | QNL | 36,5% | 2,68E-08 | 2,8 |
| Слияние 42 | QPL | --- | 6,25E-08 | 6,4 |

| Слитый белок | Замена QLL на | % интактного (пептидное картирование) | K _D (M) сортилина (ППР) | Кратность разницы в K _D |
|--------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Слияние 52 | EFL | 0,00% | 6,84E-09 | 0,7 |
| Слияние 54 | TFL | 0,0% | 1,66E-08 | 1,7 |
| Слияние 60 | RQL | 0,10% | 7,75E-09 | 0,8 |
| Слияние 62 | KQL | 2,4% | 1,91E-08 | 2,0 |
| Слияние 68 | YQL | 0,60% | 8,81E-09 | 0,9 |
| Слияние 70 | QLLLRQLL (SEQ ID NO:60) | 5,0% | 1,19E-08 | 1,2 |

Слияния 30, 33, 40, 43-51, 53, 55–59, 61, 62–67, 69, 71 и 72 демонстрировали слабое связывание с сортилином или его отсутствие по данным измерений ППР.

Слияние 1 и слияние 2 также оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в отношении связывания TfR человека. Эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу (ППР) проводили на приборе GE Healthcare Biacore 8K с сенсорным чипом серии S CM5 и подвижным буфером HBS-EP+ при 25°C. Для измерения аффинности связывания слитых белков в отношении hTfR сенсорный чип иммобилизовали со стрептавидином и проводили захват биотинилированного AviTag-hTfR. Использовали одноцикловую кинетику с сериями 3-кратных концентраций аналита слитого белка в диапазоне 25 нМ – 2 мкМ с обеспечением 80 секунд времени контакта, 180 секунд времени диссоциации и скорости потока 30 мкл/мин. Использовали модель аффинности в стационарном состоянии, чтобы продемонстрировать, что слитые белки были способны связывать hTfR с аффинностью от около 50 нМ до 150 нМ.

Пример 5. *In vitro* функциональный анализ

МКМ были получены *in vitro* из костного мозга мышей *GRN* KO/hTfR.KI (описанных ниже) с использованием метода, аналогичного описанному в Trouplin et al. *J. Vis. Exp.* 2013 (81) 50966, но рекомбинантный M-CSF добавляли непосредственно в среду для роста клеток, чтобы индуцировать дифференцировку. МКМ обрабатывали в течение 48 часов полулогарифмическим титром слияния 11, слияния 1 и слияния 2. Клеточные липиды экстрагировали путем добавления метанола, содержащего смесь внутреннего стандарта, и измеряли содержание ВМР с помощью жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) на Q-trap 6500 (SCIEX). МКМ *GRN* KO/hTfR.KI характеризовались приблизительно 2,5-кратным повышением ВМР 36:2 по сравнению с МКМ *GRN* WT/hTfR.KI. Как слияние 1, так и слияние 2 восстанавливали накопление ВМР дозозависимым образом со сравнимой эффективностью (фиг. 5). По сравнению со слитым белком, содержащим PGRN дикого типа (слияние 11), слияние 1 демонстрировало очень сходную *in vitro* активность.

Жидкостная хроматография – масс-спектрометрия

Анализ ВМР проводили методом жидкостной хроматографии (система Shimadzu Nexera X₂, прибор Shimadzu Scientific, Columbia, MD, USA) в сочетании с масс-спектрометрией с электрораспылением (Sciex 6500+ QTRAP, Sciex, Framingham, MA, USA). Для каждого анализа 5 мкл образца вводили в 1,7 мкм, 2,1×150 мм амидную колонку ВЕН (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA), используя скорость потока 0,40 мл/мин при 55°C. Подвижная фаза А состояла из воды с 10 мМ формиата аммония + 0,1% муравьиной кислоты. Подвижная фаза В состояла из ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Градиент был запрограммирован следующим образом: 0,0–1,0 мин при 95% В; от 1,0–7,0 мин до 50% В; от 7,0–7,1 мин до 95% В; и 7,1–12,0 мин при 95% В. Ионизацию электрораспылением проводили в режиме отрицательных ионов, используя следующие настройки: газовая завеса на 25; газ для соударений был установлен на средний уровень; напряжение распыления ионов на -4500; температура на 600; газ-источник ионов 1 на 50; газ-источник ионов 2 на 60; энергия соударений на -50, ВНЯ на -15; DP на -60; ВН на -10; время выдержки на 20 мс. Данные получали, используя Analyst 1.6.3 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) с параметрами, аналогичными описанным ранее (Ullman et al. 2020. *Sci Transl Med* 12(545):eaay1163). Выявление видов ВМР проводили, используя переходные параметры ММР. Количественную оценку видов ВМР проводили, используя ВМР(14:0_14:0) в качестве внутреннего стандарта. Идентификация видов ВМР была основана на времени их удержания и свойствах ММР. Количественную оценку проводили, используя MultiQuant 3.02 (Sciex), после коррекции в отношении изотопного перекрытия. Виды ВМР нормализовали относительно общего количества белка, массы ткани или объема биологической жидкости. Концентрацию белка измеряли, используя анализ с бицинониновой кислотой (BCA) (Pierce, Rockford, IL, USA).

Переходы ионов-предшественников (Q1) [M-H]⁻ и дочерних ионов (Q3) *m/z* использовали для измерения видов ВМР. Сокращения используются в данном документе для обозначения видов с двумя боковыми цепями, причем структура боковых цепей жирной кислоты указана в скобках в формате ВМР (например, ВМР(18:1_18:1)). Числа соответствуют стандартному числовому формату обозначения жирных кислот «атомы углерода жирной кислоты:число двойных связей». В альтернативном варианте виды ВМР могут быть обозначены обобщенно в соответствии с отношением общее число атомов углерода:общее число двойных связей; виды, имеющие одинаковые значения, можно различать по их значениям Q1 и Q3.

Пример 6. Слитые белки пересекают ГЭБ и корректируют релевантные фармакодинамические конечные точки у мышей *GRN KO/hTfR.KI*

Слияние 1 (таблица 2) вводили через хвостовую вену мышам *GRN KO* (Jackson Laboratory, линия № 013175), скрещенным с мышами *hTfR KI* (мыши *GRN KO/hTfR.KI*), чтобы исследовать способность пересекать ГЭБ. Мыши *hTfR KI* описаны в международной патентной публикации № WO2018152285. Для создания мышей *GRN KO/hTfR.KI* в первом раунде скрещивания гетерозиготных мышей *GRN (GRN HET)* скрещивали с гомозиготными мышами *TfR^{ms/hs} KI (TfR^{ms/hs}.KI HOM)* с получением потомства *GRN HET x TfR^{ms/hs}.KI HET*. Затем мышей *GRN HET x TfR^{ms/hs}.KI HET* скрещивали с мышами *TfR^{ms/hs}.KI HOM* с получением потомства *GRN HET x TfR^{ms/hs}.KI HOM* в этом втором раунде. В третьем и конечном раунде скрещивания мышей *GRN HET x TfR^{ms/hs}.KI HOM* скрещивали с мышами *GRN HET x TfR^{ms/hs}.KI HOM* с получением конечных мышей *GRN KO x TfR^{ms/hs}.KI HOM*, которых использовали в этом исследовании.

2–3-месячным мышам *GRN KO/hTfR.KI* внутривенно вводили одну дозу стерильного солевого раствора (носитель) или слияния 1 при 0,5, 1,5, 5 или 15 мг/кг через хвостовую вену. Через 3 дня после введения дозы у мышей брали кровь из подчелюстной вены для выделения плазмы. Через 7 дней после введения дозы мышей усыпляли авертином и проводили пункцию сердца для сбора цельной крови для выделения плазмы. Проводили транскардиальную перфузию животных охлажденным 1X ФСБ при скорости 5 мл/минута в течение 5–8 минут или до очищения печени от крови. Получали 100 мг часть печени и левое полушарие головного мозга. Образцы крови центрифугировали при 1000xg при 4°C, после чего верхний слой плазмы удаляли, моментально замораживали на сухом льду и хранили при -80°C или ниже до анализа, описанного ниже. Все тканевые образцы немедленно моментально замораживали на сухом льду и хранили при -80°C или ниже до анализа, описанного ниже.

Таблица 9. Дизайн исследования/экспериментальные группы

| Молекула | Линия клеток | Генотип | Доза (мг/кг) | N/группа |
|-----------------|--------------|----------------------|--------------|----------|
| Солевой раствор | Н/Д | TfR.KI | Н/Д | 8 |
| Солевой раствор | Н/Д | <i>GRN KO/TfR.KI</i> | Н/Д | 6 |
| Слияние 1 | CHO | <i>GRN KO/TfR.KI</i> | 0,5 | 6 |
| Слияние 1 | CHO | <i>GRN KO/TfR.KI</i> | 1,5 | 6 |
| Слияние 1 | CHO | <i>GRN KO/TfR.KI</i> | 5 | 6 |
| Слияние 1 | CHO | <i>GRN KO/TfR.KI</i> | 15 | 6 |

Для измерения содержания белка в тканевых образцах тканевые образцы взвешивали и гомогенизировали в 10X объеме по массе буфера для лизиса клеток (Cell Signaling Technologies; 20 mM Трис-НCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1% Тритон, 2,5 mM пиродифосфат натрия, 1 mM бета-глицерофосфат, 1 mM Na₃VO₄ и

1 мкг/мл лейпептина), дополненном 1X ингибитором протеаз (Roche) и 1X ингибитором фосфатаз (Roche). Образцы гомогенизировали, используя TissueLyzer с 3 мм металлическими гранулами в течение 2х 3 мин при 29 Гц. После гомогенизации образцы центрифугировали при максимальной скорости на настольной центрифуге в течение 20 минут при 4°C. Супернатант переносили в новые пробирки и анализировали часть супернатанта с помощью ELISA-анализа Fc-PGRN (ELISA с захватом Fc и выявлением PGRN) и ELISA-анализа Fc-Fc (ELISA с захватом Fc и выявлением Fc).

Анализ BMP в образцах проводили, как описано в примере 5.

Уровни растворимого TREM2 (sTREM2) измеряли следующим образом: 96-луночный планшет с малыми пятнами стрептавидина MSD GOLD (MSD L45SA) готовили для анализа Trem2 путем покрытия 1мкг/мл биотинилированного овечьего антитела к мышинному белку (R&D Systems BAF1729) в течение ночи при 4°C. На следующий день планшет MSD промывали забуференным трис солевым раствором с тритоном (ТБСТ) и блокировали в течение двух часов, используя 3% бычий сывороточный альбумин в ТБСТ со встряхиванием при 600 об/мин. Планшет MSD снова промывали ТБСТ, а лизаты головного мозга разводили 5х в блокирующем растворе и добавляли в планшет MSD для инкубации в течение 1 часа при 600 об/мин. После следующей промывки ТБСТ в планшет добавляли сульфо-меченное овечье антитело к мышинному белку (R&D Systems AF1729) и инкубировали в течение 1 часа, снова при 600 об/мин, и проводили конечную промывку перед добавлением 2X буфера для считывания MSD, разведенного в воде. Затем планшет считывали, используя MSD Meso Sector S600. Сигнал Trem2 нормализовали относительно концентрации белка и строили график с помощью GraphPad Prism.

Фиг. 6А–6С иллюстрируют фармакокинетику слияния 1 в плазме, головном мозге и печени мышей *GRN KO/hTfR.KI*. Полые круги представляют обработанную носителем когорту *GRN* ДТ, а квадраты представляют обработанную носителем когорту *GRN KO*. Обработанные слитым белком когорты *GRN KO* представлены треугольниками (15 мг/кг), ромбами (5 мг/кг), звездочками (1,5 мг/кг) и х-значками (0,5 мг/кг). При всех дозах слитый белок выводился из плазмы, головного мозга и печени с менее чем 0,1 нМ выявленного белка в ткани и около 1 нМ выявленного белка в плазме через 7 дней после введения дозы.

Фиг. 7А и 7В иллюстрируют уровни TREM2 в ткани головного мозга и печени мышей *GRN KO/hTfR.KI* через 7 дней после введения дозы. Полые круги представляют обработанную носителем когорту *GRN* ДТ, а квадраты представляют обработанную носителем когорту *GRN KO*. Обработанные слитым белком когорты *GRN KO* представлены треугольниками (15 мг/кг), ромбами (5 мг/кг), звездочками (1,5 мг/кг) и х-значками (0,5 мг/кг). Уровни дозы 5 мг/кг и 15 мг/кг были способны восстанавливать

уровни TREM2 в головном мозге, тогда как уровни дозы, составляющие всего 1,5 мг/кг, были способны восстанавливать уровни TREM2 в печени.

Фиг. 8А и 8В иллюстрируют уровни BMP(18:1/18:1) в ткани головного мозга и печени мышей *GRN KO/hTfR.KI* через 7 дней после введения дозы. Полые круги представляют обработанную носителем когорту *GRN* ДТ, а квадраты представляют обработанную носителем когорту *GRN KO*. Обработанные слитым белком когорты *GRN KO* представлены треугольниками (15 мг/кг), ромбами (5 мг/кг), звездочками (1,5 мг/кг) и х-значками (0,5 мг/кг). Уровни дозы, составляющие всего 1,5 мг/кг, были способны восстанавливать уровни BMP в головном мозге, тогда как уровни BMP в печени восстанавливались при всех дозах. Аналогичные результаты наблюдали для других видов BMP, включая BMP(20:4/20:4) и BMP(22:6/22:6).

Данные с фиг. 6А–6С, 7А и 7В и 8А и 8В показывают, что слияние 1 способно пересекать ГЭБ в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* и корректировать релевантные ФД конечные точки недостатка гранулина.

Пример 7. Восстановление уровней глюкозилсфингозина в ткани головного мозга мышей *GRN KO/hTfR.KI*

Получение и обработка головного мозга для экстракции липидов и анализа глюкозилсфингозина

Слияние 1 (описанное в таблице 2) или соответствующий слитый белок, который не обладает какой-либо TfR-связывающей способностью, вводили через хвостовую вену в однократной дозе 5 мг/кг мышам *GRN KO/hTfR.KI* («Gtn KO» на фиг. 9). Соответствующий слитый белок содержит первый полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:122, и второй полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:108. Оба слитых белка экспрессировали и очищали из клеток CHO, как описано в примере 1. Через семь дней после введения слитых белков мышей умерщвляли для исследования уровней глюкозилсфингозина (GlcSph) в головном мозге, печени и плазме. После анестезии летальной дозой бромалия проводили сердечную перфузию мышей ледяным ФСБ. Затем получали 18–20 мг лобной коры на льду, взвешивали, переносили в герметично закрывающиеся 1,5 пробирки Эппендорфа вместе с 3 мм гранулой из нержавеющей стали, затем моментально замораживали. Для получения образцов головного мозга для липидного анализа в образцы добавляли 400 мкл метанола для ЖХМС с внутренними стандартами. Затем ткани гомогенизировали с помощью Qiagen TissueLyser в течение 30 секунд при 25 Гц при 4°C. Затем образцы центрифугировали в течение 20 мин при 21000xg при 4°C. После центрифугирования супернатант переносили в 96-луночный планшет с V-образным дном и половинной

глубиной лунок и хранили при -20°C в течение 1 часа для дополнительного осаждения белков. После этой инкубации образцы центрифугировали еще в течение 10 мин при $21000\times g$ при 4°C . 100 мкл супернатанта переносили в 96-луночный планшет со стеклянными вставками (Analytical Sales & Services, Ref № 27350). Затем образцы сушили в потоке азота (около 2 ч), затем ресуспендировали в 100 мкл смеси ацетонитрил/изопропанол/вода (92,5/5/2,5, об./об./об.) с 5 мМ формиата аммония и 0,5% муравьиной кислоты.

ЖХМС анализ глюкозилсфингозина

Анализ глюкозилсфингозина (GlcSph) проводили методом жидкостной хроматографии (система Shimadzu Nexera X2, прибор Shimadzu Scientific, Columbia, MD, USA) в сочетании с масс-спектрометрией с электрораспылением (Sciex QTRAP 6500+ Sciex, Framingham, MA, USA). Для каждого анализа 10 мкл образца вводили в $2,0 \text{ мкм}, 3,0 \times 150 \text{ мм}$ колонку HALO HILIC (Advanced Materials Technology, PN 91813-701), используя скорость потока 0,45 мл/мин при 45°C . Подвижная фаза А состояла из 92,5/5/2,5 АЦН/ИПА/ H_2O с 5 мМ формиата аммония и 0,5% муравьиной кислоты. Подвижная фаза В состояла из 92,5/5/2,5 H_2O /ИПА/АЦН с 5 мМ формиата аммония и 0,5% муравьиной кислоты. Градиент был запрограммирован следующим образом: 0,0–3,1 мин при 100% В, 3,2 мин при 95% В, 5,7 мин при 85% В, выдержка до 7,1 мин при 85% В, понижение до 0% В при 7,25 мин и выдержка до 8,75 мин, и обратное повышение до 100% при 10,65 мин и выдержка до 11 мин. Ионизацию электрораспылением проводили в режиме положительных ионов, применяя следующие настройки: газовая завеса на 25; газ для соударений был установлен на средний уровень; напряжение распыления ионов на 5500; температура на 350°C ; газ-источник ионов 1 на 55; газ-источник ионов 2 на 60. Данные получали, используя Analyst 1.6 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) со следующими параметрами: время выдержки (мс) и энергия соударений (ЭС); входное напряжение (ВН) на 10; и выходное напряжение ячейки соударений (ВНЯ) на 12,5. Параметры получения данных были аналогичными, описанным ранее (Ullman et al. 2020. *Sci Transl Med* 12(545):eaay1163). Количественную оценку GlcSph проводили, используя изотопно меченный внутренний стандарт GlcSph(d5). Количественную оценку проводили, используя MultiQuant 3.02 (Sciex).

Результаты по глюкозилсфингозину в головном мозге

Оценивали уровни GlcSph в головном мозге мышей *GRN* КО и *GRN* ДТ, а также мышей *GRN* КО, которые получали вводимую в/а дозу 5 мг/кг слияния 1 или соответствующего слитого белка (фиг. 9). Уровни GlcSph в головном мозге *GRN* КО в среднем в 4,13 раза превышали значение для однопаметных животных ДТ ($23,91 \pm 1,963$

нг/мкл и $5,782 \pm 1,262$ нг/мкл, соответственно, $p = < 0,0001$). У обработанных слиянием 1 мышей наблюдали 88% восстановление до мышей *GRN* ДТ ($7,866 \pm 0,8237$ нг/мкл, $p = 0,0002$). И наоборот, мыши *GRN* КО, обработанные не нацеленным на ЦНС соответствующим слитым белком, демонстрировали лишь 22% восстановление до уровней GlcSph ДТ ($19,92 \pm 3,486$ нг/мкл, $p = 0,5619$).

Пример 8. Продолжительность коррекции BMP и глюкозилсфингозина у мышей *GRN* КО/hTfR.KI

Слияние 1 (описанное в таблице 2, экспрессированное и очищенное из клеток CHO, как описано в примере 1) вводили в однократной дозе через хвостовую вену мышам *GRN* КО/hTfR.KI в следующих дозах: 1 мг/кг, 2,5 мг/кг и 5 мг/кг. Для контроля мышам *GRN* КО/hTfR.KI и *GRN* дикого типа/hTfR.KI вводили солевой раствор. Через две, три и шесть недель после введения слитого белка или солевого раствора когорты мышей умерщвляли для исследования уровней BMP и глюкозилсфингозина (GlcSph) в головном мозге. Мышей анестезировали, а ткани головного мозга готовили, как описано в примере 7. Уровни BMP и GlcSph измеряли, как описано в примерах 5 и 7, соответственно. Результаты проиллюстрированы на фиг. 10–12.

Результаты по глюкозилсфингозину в головном мозге

Оценивали уровни глюкозилсфингозина (GlcSph) у мышей *GRN* КО/hTfR.KI и *GRN* дикого типа/hTfR.KI. Как проиллюстрировано на фиг. 10, уровни GlcSph у *GRN* КО/hTfR.KI были приблизительно в 4 раза повышены по сравнению с мышами *GRN* дикого типа/hTfR.KI. Введение слияния 1 во всех дозах корректировало повышенные уровни GlcSph у *GRN* КО/hTfR.KI, при этом наибольшая вводимая доза (5 мг/кг) демонстрировала наибольшее улучшение среди всех обработанных слитым белком когорт. Максимальную коррекцию практически до уровней *GRN* дикого типа при однократной дозе слияния 1 наблюдали через две недели после введения дозы, хотя частичную коррекцию наблюдали до шести недель после введения дозы.

Результаты по BMP в головном мозге

Как было отмечено ранее, на уровни BMP у *GRN* КО/hTfR.KI влияют незначительные уровни програнулина. Введение слияния 1 *GRN* КО/hTfR.KI было способно корректировать это влияние. Уровни репрезентативных видов BMP проиллюстрированы на фиг. 11 и 12. Введение слияния 1 во всех дозах корректировало уровни BMP у *GRN* КО/hTfR.KI. При наибольшей вводимой дозе максимальную коррекцию уровней BMP наблюдали через две недели после введения дозы с сохранением частичной коррекции через три недели после введения дозы.

Пример 9. Восстановление активности GСазы у мышей *GRN KO/hTfR.KI*

Слияние 1 (описанное в таблице 2, экспрессированное и очищенное из клеток СНО, как описано в примере 1) вводили через хвостовую вену мышам *GRN KO/hTfR.KI* в дозах, описанных в примере 8. Для контроля мышам *GRN KO/hTfR.KI* и *GRN* дикого типа/*hTfR.KI* вводили солевой раствор. Через две, три и шесть недель после введения слитого белка или солевого раствора когорты мышей умерщвляли для исследования активности фермента глюкоцереброзидазы (GСазы) в головном мозге. Мышей анестезировали, а ткани головного мозга готовили, как описано в примере 7. Активность GСазы оценивали следующим образом. Ткань головного мозга лизировали в 1% NP-40 в буфере ФСБ. Общие уровни белка в образцах лизата головного мозга измеряли с помощью анализа ВСА и нормализовали образцы для измерения активности GСазы. Тканевые образцы сначала разводили в буфере для активности GBA (фосфатно-цитратный буфер (Sigma-Aldrich, кат. № P4809) с 0,5% таурохолата натрия и 0,25% Тритон X-100) и добавляли в лунки 96-луночного планшета. После этого в каждую лунку для образца добавляли субстрат глюкозы 4-MU (Sigma-Aldrich, кат. M3633-1G) до конечной концентрации 1 мМ. Планшет накрывали и встряхивали при 700 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре перед тем, как перенести в инкубатор без CO₂, и инкубировали при 37°C в течение трех часов. В конце периода инкубации в образцы добавляли стоп-раствор (500 мМ глицина, 300 мМ NaOH, pH 9,8), чтобы остановить ферментативную реакцию, и измеряли ферментативную активность на планшет-ридере BioTek. Результаты проиллюстрированы на фиг. 13.

Как проиллюстрировано на фиг. 13, введение слияния 1 корректировало активность GСазы в головном мозге мышей *GRN KO/hTfR.KI* до уровней дикого типа через две недели после введения дозы.

Пример 10. Длительное введение доз слитых белков восстанавливает дистальные биомаркеры у мышей *GRN KO/hTfR.KI*

Проводили исследование, для определения, может ли длительное введение описанных в данном документе слитых белков восстанавливать дистальные биомаркеры. Слитые белки вводили путем внутрибрюшинной доставки 7-месячным мышам *GRN KO/hTfR.KI* в дозе 5 мг/кг один раз в неделю в течение восьми (8) недель. Для контроля мышам *GRN KO/hTfR.KI* и *GRN* дикого типа/*hTfR.KI* (также называемым «мышами *hTfR.KI*») вводили солевой раствор. Инъекции CD4 проводили мышам в каждой когорте, начиная с начальной дозы слитого белка, и после этого — каждые две недели. Образцы крови получали путем забора из подчелюстной вены для выделения плазмы на неделях 0, 2, 4, 6, и 8 (после введения дозы). Через двадцать четыре (24) часа после восьмой и

конечной дозы слитого белка когорты мышей умерщвляли; получали образцы терминальной крови и ЦСЖ, а ткани головного мозга и печени получали и хранили так, как было описано ранее (пример 6). Количества вводимых слитых белков измеряли в головном мозге и печени, используя ELISA-анализ Fc:Fc, описанный в примере 6. Уровни BMP, глюкозилсфингозина (GlcSph) и уровни Trem2 анализировали в головном мозге, печени, плазме и/или ЦСЖ. Кроме того, анализировали некоторые маркеры глиоза (CD68, Iba1, GFAP) в ткани головного мозга, а уровни легкой цепи нейрофиламента (Nf-L) анализировали в образцах ЦСЖ и плазмы. Уровни BMP, TREM2 и GlcSph измеряли, как описано в примерах 5, 6 и 7, соответственно. Уровни Nf-L в ЦСЖ и уровни маркеров глиоза в головном мозге измеряли, как описано ниже. В таблице 10 приведена общая информация по дизайну эксперимента, а результаты проиллюстрированы на фиг. 14–28.

Таблица 10. Дизайн исследования/экспериментальные группы для исследования длительного введения доз

| Молекула | Первый Fc-полипептид | Второй Fc-полипептид – PGRN | Линия клеток | Генотип | Доза (мг/кг) |
|------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Солевой раствор | -- | -- | Н/Д | hTfR.KI | Н/Д |
| Солевой раствор | -- | -- | Н/Д | GRN KO/hTfR.KI | Н/Д |
| Слияние I | SEQ ID NO:75 | SEQ ID NO:98 | CHO | GRN KO/hTfR.KI | 5 |
| Слияние II | SEQ ID NO:85 | SEQ ID NO:108 | HEK | GRN KO/hTfR.KI | 5 |
| Fc-PGRN (не связывающий TfR) | SEQ ID NO:122 | SEQ ID NO:108 | CHO | GRN KO/hTfR.KI | 5 |

Методы анализа Nf-L в ЦСЖ и плазме

Уровни Nf-L в ЦСЖ и плазме анализировали, как было описано ранее и в соответствии с рекомендациями производителя (Ullman et al. 2020. *Sci Transl Med* 12(545):eaay1163). Вкратце, использовали набор Quanterix Simoa Neurofilament Light Advantage (NFL). Вкратце, цереброспинальную жидкость разводили 100x, а плазму разводили 10X в разбавителе для образцов (Quanterix 102252), затем добавляли реагент для выявления Simoa и гранульный реагент (Quanterix 103159, 102246) и инкубировали образцы в течение 30 мин при 30°C со встряхиванием при 800 об/мин. После этого планшет с образцами промывали промывочным буфером A Simoa (Quanterix 103078) на устройстве для мойки микропланшетов Simoa в соответствии с двухэтапным протоколом Quanterix, добавляли реагент SBG (Quanterix 102250) и снова инкубировали образцы при 30°C, 800 об/мин в течение дополнительных 10 мин. Продолжали следовать двухэтапному протоколу промывки, при этом гранулы с образцами дважды ресуспендировали в промывочном буфере B Simoa (Quanterix 103079) перед конечной аспирацией буфера. После сушки в течение 10 минут при КТ измеряли концентрации Nf-L в образцах на

приборе Quanterix SR-X, используя протокол для анализа Nf-L, и интерполировали по калибровочной кривой, предоставленной с аналитическим набором Quanterix.

Анализ маркеров глиоза

После транскардиальной перфузии ФСБ и последующей фиксации в 4% ПФА делали коронарные срезы полушарий головного мозга мышей. Вкратце, совокупность головных мозгов (до 40) иссекали и заливали в один желатиновый блок, затем делали коронарные срезы толщиной 40мкм. Затем желатиновые слои с заключенным в них срезами головного мозга хранили в растворе для сохранения антигена (50% ФСБ:50% этиленгликоль + 1% ПВП) до окрашивания. Срезы окрашивали в отношении маркеров глиоза GFAP (ослиное антитело к куриному белку, Novus NBP1-05198, 1:1000), Iba1 (ослиное антитело к козьему белку, Novus NB100-1028, 1:1500) и CD68 (ослиное антитело к крысиному белку, BioRad MCA1957, 1:500). Вкратце, срезы инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение 4 часов в блокирующем буфере (ФСБ + 1% БСА + 0,1% рыбий желатин + 0,5% тритон X-100), затем переносили в буфер для разведения антител с первичными антителами в концентрациях, приведенных выше, и хранили со встряхиванием при 4°C в течение ночи. После 3X промывок в ФСБ образцы переносили в буфер для разведения антител со вторичными антителами (разведение 1:500) и инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение 4 часов. Затем образцы промывали ФСБ + ДАФИ (Invitrogen D1306 1:10000) в течение 20 минут, затем еще два раза промывали ФСБ перед заливкой в 2-х 3-дюймовые слайды со средой для заливки Prolong Glass hardset (Life Tech P36984) и оставляли сушиться на ночь при комнатной температуре. Проводили полную визуализацию полусфер головного мозга при 20X, используя цифровой сканер слайдов Zeiss Axio Scan.Z1. Анализ изображения проводили, используя программное обеспечение Zeiss Zen Blue 3.2. Выделяли ROI таламуса и использовали подход определения границ с помощью шарового указателя для определения площади каждого маркера глиоза по отношению к общей площади таламуса. Проводили анализ 1–3 срезов на головной мозг и рассчитывали среднее процентное значение охвата по всем изображениям.

Выделение типов клеток ЦНС

Для получения суспензий одиночных клеток для сортировки клеток ЦНС ткань головного мозга иссекали и перерабатывали в суспензию одиночных клеток в соответствии с протоколом производителя, используя набор для диссоциации взрослого головного мозга (Miltenyi Biotec 130-107-677). Проводили Fc-блокировку (Biolegend, № 101320, 1:100) и окрашивание клеток для анализа методом проточной цитометрии фиксируемым красителем для определения жизнеспособности BV510 (BD Biosciences, №

564406, 1:100) для исключения мертвых клеток, CD11b-BV421 (BD Biosciences 562605, 1:100), ACSA2-APC (Miltenyi, № 130-117-386, 1:100) и Thy1-PE (R&D, № FAB7335P, 1:100). Клетки промывали ФСБ/1% БСА и пропускали через 100 мкм фильтр перед сортировкой CD11b+ микроглии, ACSA2+ астроцитов и Thy1+ нейронов на FACS Aria III (BD Biosciences) с 100 мкм патрубком. Отсортированные клетки собирали непосредственно в метанол для МС с добавленными внутренними стандартами для липидного и метаболомического анализа. Приготовление клеточных лизатов и анализ ЖХМС для измерения GAG, BMP, ганглиозидов, GlcCer и GalCer проводили, используя методы, аналогичные описанным в примере 1.

Результаты

На фиг. 14 и 15 приведена информация по концентрации вводимых слитых белков в тканях головного мозга и печени когорт обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 14 и 15, связывание TfR в случае слияний 1 и 11 приводило к существенному повышению поглощения белка в головном мозге по сравнению с не связывающим TfR белком Fc:PGRN. Кроме того, еженедельная обработка в течение до восьми (8) недель слиянием 1 не снижала поглощение белка в головном мозге по сравнению с однократной внутрибрюшинной дозой того же препарата. С другой стороны, присутствие Fc:PGRN в печени было большим, чем для слияния 1 и слияния 11, вероятно, из-за недостатка TfR-опосредованного клиренса из периферии.

На фиг. 16–19 приведена информация по уровням типовых BMP (di-22:6) в головном мозге, ЦСЖ, печени и плазме когорт обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 16 и 17, еженедельное введение как слияния 1, так и слияния 11 в течение до восьми (8) недель улучшало восстановление уровней BMP в компартментах ЦНС (головной мозг, ЦСЖ) по сравнению с обработкой носителем или обработкой Fc:PGRN. В периферии (печень, плазма) введение Fc:PGRN, слияния 1 и слияния 11 восстанавливало уровни BMP с одинаковым эффектом.

На фиг. 20 и 21 приведена информация по уровням GlcSph в тканях головного мозга и печени когорт обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 20, еженедельное введение слияний 1 и 11 в течение до восьми (8) недель восстанавливало уровни GlcSph в головном мозге статистически значимым образом по сравнению с обработкой носителем и обработкой Fc:PGRN. В периферии (фиг. 21) еженедельное введение Fc:PGRN, слияния 1 и слияния 11 восстанавливало уровни GlcSph с одинаковым эффектом.

На фиг. 22 приведена информация по уровням Nf-L в ЦСЖ в когортах обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 22, тенденцию к

снижению Nf-L в ЦСЖ наблюдали после восьми (8) недель еженедельного введения слияния 1 у мышей GRN KO. В противоположность этому, коррекция Nf-L в ЦСЖ не происходила при еженедельной обработке Fc:PGRN или слиянием 11.

На фиг. 23 приведена информация по относительным уровням TREM2 в головном мозге когорт обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 23, еженедельное введение слияния 1 в течение до восьми (8) недель снижало уровни TREM2 в ткани головного мозга статистически значимым образом по сравнению с обработкой носителем. Еженедельное введение слияния 11 также снижало уровни TREM2 в головном мозге мышей GRN KO, но эффект не был настолько выраженным, как наблюдаемый при еженедельном введении слияния 1.

На фиг. 24–26 приведена информация по маркерам глиоза (таламус) для когорт обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 24–26, еженедельное введение Fc:PGRN, слияния 1 и слияния 11 в течение до восьми (8) недель снижало уровни CD68, Iba1 и GFAP в головном мозге мышей GRN KO по сравнению с обработкой носителем.

Фиг. 27 приведена тепловая карта BMP и некоторых липидов в нейронах, астроцитах и клетках микроглии, отсортированных из тканей головного мозга когорт обработанных мышей GRN KO. Как проиллюстрировано на фиг. 27, еженедельное введение слияния 1 в течение до восьми (8) недель восстанавливало фенотипы BMP в микроглии, астроцитах и нейронах. Восстановление было наиболее выраженным в клетках микроглии, хотя в астроцитах и нейронах также наблюдали коррекцию, но в меньшей степени. Фиг. 28–30 иллюстрируют тенденцию в коррекции некоторых видов BMP (BMP 18:1/18:1, BMP 22:6/22:6 и BMP 20:4/20:4) после введения слияния 1 в отсортированных популяциях нейронов, астроцитов и клеток микроглии обработанных GRN KO (по сравнению с клетками ЦНС обработанных носителем когорт GRN дикого типа (hTfR.KI)).

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены лишь для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения на их основе будут очевидны для специалистов в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Последовательности под порядковыми номерами, перечисленные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

Неофициальный перечень последовательностей

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|--|
| 1 | MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDV KCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL | Полипептид програнулина (PGRN), содержащий сигнальный полипептид (аминокислоты 1–17) |
| 2 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDV KCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL | Зреющий PRGN |
| 3 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDV KCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX ₁ X ₂ X ₃ , где каждый из X ₁ , X ₂ и X ₃ независимо представляет собой аминокислоту, а X ₁ X ₂ X ₃ вместе не представляют собой QLL | Вариант PRGN 1 |
| 4 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDV KCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPHL | Вариант PRGN 2 |
| 5 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDV KCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPKL | Вариант PRGN 3 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|-------------------|
| 6 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPDL | Вариант PGRN 4 |
| 7 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPEL | Вариант PGRN 5 |
| 8 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPSL | Вариант PGRN 6 |
| 9 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPTL | Вариант PGRN 7 |
| 10 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPNL | Вариант PGRN 8 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|--------------------|
| 11 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVS AQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPQL | Вариант PGRN 9 |
| 12 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVS AQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPGL | Вариант PGRN 10 |
| 13 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVS AQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPPL | Вариант PGRN 11 |
| 14 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVS AQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPAL | Вариант PGRN 12 |
| 15 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVS AQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPYL | Вариант PGRN 13 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|--------------------|
| 16 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPVL | Вариант PGRN 14 |
| 17 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPIL | Вариант PGRN 15 |
| 18 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRPFL | Вариант PGRN 16 |
| 19 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQRL | Вариант PGRN 17 |
| 20 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQHL | Вариант PGRN 18 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|--------------------|
| 21 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQKL | Вариант PGRN 19 |
| 22 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQDL | Вариант PGRN 20 |
| 23 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQEL | Вариант PGRN 21 |
| 24 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQNL | Вариант PGRN 22 |
| 25 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQPL | Вариант PGRN 23 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|-----------------|
| 26 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQYL | Вариант PGRN 24 |
| 27 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQQL | Вариант PGRN 25 |
| 28 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRVVL | Вариант PGRN 26 |
| 29 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRVTL | Вариант PGRN 27 |
| 30 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRRIL | Вариант PGRN 28 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|--------------------|
| 31 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRHIL | Вариант PGRN 29 |
| 32 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRKIL | Вариант PGRN 30 |
| 33 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALREIL | Вариант PGRN 31 |
| 34 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRRFL | Вариант PGRN 32 |
| 35 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRHFL | Вариант PGRN 33 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|-----------------|
| 36 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRKFL | Вариант PGRN 34 |
| 37 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRDFL | Вариант PGRN 35 |
| 38 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALREFL | Вариант PGRN 36 |
| 39 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRSFL | Вариант PGRN 37 |
| 40 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRFL | Вариант PGRN 38 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|--------------------|
| 41 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRNFL | Вариант PGRN 39 |
| 42 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQFL | Вариант PGRN 40 |
| 43 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRLFL | Вариант PGRN 41 |
| 44 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRFFL | Вариант PGRN 42 |
| 45 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRYFL | Вариант PGRN 43 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|--------------------|
| 46 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRRQL | Вариант PGRN 44 |
| 47 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRHQL | Вариант PGRN 45 |
| 48 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRKQL | Вариант PGRN 46 |
| 49 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRDQL | Вариант PGRN 47 |
| 50 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALREQL | Вариант PGRN 48 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|-----------------|
| 51 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRNQL | Вариант PGRN 49 |
| 52 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRLQL | Вариант PGRN 50 |
| 53 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRFQL | Вариант PGRN 51 |
| 54 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRYQL | Вариант PGRN 52 |
| 55 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQLLY ₁ Y ₂ QLL, где Y ₁ представляет собой L или отсутствует, а Y ₂ представляет собой R или отсутствует | Вариант PGRN 53 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|---|
| 56 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQLLQLL | Вариант PGRN 54 |
| 57 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQLLLRQLL | Вариант PGRN 55 |
| 58 | LRQLL | |
| 59 | QLLQLL | |
| 60 | QLLLRQLL | |
| 61 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последова- тельность Fc человека дикого типа позиции 231– 447 согласно нумерации по индексу EU |
| 62 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK | Последовател ьность домена CH2 позиции 231– 340 согласно нумерации по индексу EU |
| 63 | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последовател ьность домена CH3 позиции 341– 447 согласно нумерации по индексу EU |
| 64 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последова- тельность Fc с мутацией типа «выступ» |
| 65 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Последова- тельность Fc с мутациями типа «выступ» и LALA |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|--|
| 66 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» |
| 67 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALA |
| 68 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Клон CH3C.35.23.2 |
| 69 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Клон CH3C.35.23.2 с мутацией типа «выступ» |
| 70 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA |
| 71 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» |
| 72 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA |
| 73 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.23.2 |
| 74 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.23.2 с мутацией типа «выступ» |
| 75 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|---|
| 76 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» |
| 77 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA |
| 78 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Клон CH3C.35.21.1 7 |
| 79 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Клон CH3C.35.21.1 7 с мутацией типа «выступ» |
| 80 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «выступ» и LALA |
| 81 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «впадина» |
| 82 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «впадина» и LALA |
| 83 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.21.1 7 |
| 84 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.21.1 7 с мутацией типа «выступ» |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|---|
| 85 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «выступ» и LALA |
| 86 | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «впадина» |
| 87 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «впадина» и LALA |
| 88 | EPKSCDKTHTCPPCP | Аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1 человека |
| 89 | DKTHTCPPCP | Часть шарнирной последовательности IgG1 человека (частичная шарнирная область) |
| 90 | GGGGS | Полипептидный линкер |
| 91 | GGGGSGGGGS | Полипептидный линкер |
| 92 | GGSG | Полипептидный линкер |
| 93 | SGGG | Полипептидный линкер |
| 94 | KESGSVSSEQLAQFRSLD | Полипептидный линкер |
| 95 | EGKSSGSGSESKST | Полипептидный линкер |
| 96 | GSAGSAAGSGEF | Полипептидный линкер |
| 97 | AEAAAKA | Полипептидный линкер |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|--|
| 98 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAH CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQ CPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPT GTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSTGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGE GHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRPIL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(PIL) |
| 99 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAH CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQ CPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPT GTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSTGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGE GHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRPFL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(PFL) |
| 100 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAH CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQ CPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPT GTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSTGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGE GHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRQQL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(QQL) |
| 101 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAH CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQ CPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPT GTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSTGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGE GHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRVVL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(VVL) |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|--|
| 102 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQFRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRVTL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(VTL) |
| 103 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQFRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRPIL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «выступ» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(PIL) |
| 104 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQFRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRPFL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «выступ» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(PFL) |
| 105 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFNFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQFRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRQQL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «выступ» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(QQL) |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|---|
| 106 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSPDGYTCRQLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLVSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVVL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «выступ» и LALA – (G ₄ S) ₂ -PGRN(VVL) |
| 107 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSPDGYTCRQLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLVSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVTL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «выступ» и LALA – (G ₄ S) ₂ -PGRN(VTL) |
| 108 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSPDGYTCRQLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLVSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA – (G ₄ S) ₂ -PGRN |
| 109 | MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLYGCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKL VHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAEL SFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVCLTVSNVLKEIKILNIFGVKGFVEPDHYVVVG AQRDAWGPAAKSGVGTALLLKLQMFSDMVLKDFGQPSRSIIFASWSAGDFGSVGA TEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSA SPLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNVAASKVEKTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIE RIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVENLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTDFGNAEKTD R FVMKLLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPRHVFWGSGSHTLPALLENLKLKRNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF | Белок рецептора трансферрина 1 человека (TFR1) |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|---|
| 110 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область — последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALA |
| 111 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLP AQR TNRAVALSSSV MCPDARS RCPD GSTCC ELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQA PATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTC CRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRNIL | Вариант PGRN 56 |
| 112 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLP AQR TNRAVALSSSV MCPDARS RCPD GSTCC ELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQA PATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTC CRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRLLL | Вариант PGRN 57 |
| 113 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLP AQR TNRAVALSSSV MCPDARS RCPD GSTCC ELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQA PATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTC CRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPLL | Вариант PGRN 58 |
| 114 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRS GNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLP AQR TNRAVALSSSV MCPDARS RCPD GSTCC ELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQA PATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTC CRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPRL | Вариант PGRN 59 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|-----------------|
| 115 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRYIL | Вариант PGRN 60 |
| 116 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRVLL | Вариант PGRN 61 |
| 117 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRVIV | Вариант PGRN 62 |
| 118 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRFIL | Вариант PGRN 63 |
| 119 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIF TVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQT CCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRMLL | Вариант PGRN 64 |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|--|
| 120 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLG | Вариант PGRN 65 |
| 121 | TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLGK | Вариант PGRN 66 |
| 122 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | Частичная шарнирная область – последовательность Fc с мутациями типа «выступ» и LALA |
| 123 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPPL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(PPL) |
| 124 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGSTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCRRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPYL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G ₄ S) ₂ -PGRN(PYL) |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|--|---|
| 125 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGG GSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAH CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQ CPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPT GTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCARDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRQL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G4S) ₂ -PGRN(QRL) |
| 126 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGKGG GSGGGGSTRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAH CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQ CPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPT GTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC VAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACC QLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCARDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAP RWDAPLRDPALRQL | Частичная шарнирная область – Fc-полипептид с мутациями типа «впадина» и LALA (G4S) ₂ -PGRN(QHL) |
| 127 | TRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCARDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQLY | Вариант PGRN 67 |
| 128 | TRCPDGFQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFEC PDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKK LPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCC PQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTC CRLQSGAW GCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHL SLPDPQALK RDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQR GSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCE DRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCARDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP ALRQLP | Вариант PGRN 68 |
| 129 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKKEWQQGFVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPG | Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA, усеченный |

| SEQ ID NO: | Последовательность | Описание |
|------------|---|---|
| 130 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA, усеченный |
| 131 | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLDSGDSGDSFFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | Клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «выступ» и LALA, усеченный |
| 132 | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYK TTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | Частичная шарнирная область клон CH3C.35.21.1 7 с мутациями типа «выступ» и LALA, усеченный |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант програнулина, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной $X_1X_2X_3$ в позициях, соответствующих остаткам 574–576 SEQ ID NO:2, где каждый из X_1 , X_2 и X_3 независимо представляет собой аминокислоту, а вместе они не представляют собой QLL.

2. Вариант програнулина по п. 1, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:2.

3. Вариант програнулина по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO:2.

4. Вариант програнулина по любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO:2.

5. Вариант програнулина по п. 1, отличающийся тем, что вариант програнулина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:2.

6. Вариант програнулина по п. 1 или п. 5, отличающийся тем, что вариант програнулина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO:2.

7. Вариант програнулина по любому из пп. 1, 5 и 6, отличающийся тем, что вариант програнулина содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO:2.

8. Вариант програнулина по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет последовательность:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX₁X₂X₃
 (SEQ ID NO:3).

9. Вариант програнулина по любому из пп. 1–8, где X_1 представляет собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P или V.

10. Вариант програнулина по любому из пп. 1–9, где X_2 представляет собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R.

11. Вариант програнулина по любому из пп. 1–10, где X_3 представляет собой L, Y или P.

12. Вариант програнулина по любому из пп. 1–11, где $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1IL , X_1FL , X_1QL , PX_2L , QX_2L или VX_2L .

13. Вариант програнулина по любому из пп. 1–11, где $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1X_2L .

14. Вариант програнулина по п. 13, где X_2 представляет собой A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

15. Вариант програнулина по любому из пп. 1–11, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PIL, PFL, QQL, VVL или VTL.

16. Вариант програнулина по любому из пп. 1–11, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PPL, PYL, QQL, QHL или QRL.

17. Вариант програнулина, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной Y_1Y_2QLL (SEQ ID NO:137), которая является смежной и С-концевой относительно позиции, соответствующей остатку 576 SEQ ID NO:2, где Y_1 представляет собой L или отсутствует, а Y_2 представляет собой R или отсутствует.

18. Вариант програнулина по п. 17, отличающийся тем, что вариант програнулина содержит последовательность:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY₁
 Y₂QLL (SEQ ID NO:55),

где Y_1 представляет собой L или отсутствует, а Y_2 представляет собой R или отсутствует.

19. Вариант програнулина по п. 17 или п. 18, где Y_1 представляет собой L.

20. Вариант програнулина по любому из пп. 17–19, где Y_2 представляет собой R.

21. Вариант програнулина по п. 17 или п. 18, где Y_1 и Y_2 оба отсутствуют.

22. Полипептид, содержащий вариант програнулина, который содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной $X_1X_2X_3$ в позициях, соответствующих остаткам 574–576 SEQ ID NO:2, где каждый из X_1 , X_2 и X_3 независимо представляет собой аминокислоту, а вместе они не представляют собой QLL.

23. Полипептид по п. 22, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO:2.

24. Полипептид по п. 22 или п. 23, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO:2.

25. Полипептид по любому из пп. 22–24, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO:2.

26. Полипептид по любому из пп. 22–25, отличающийся тем, что вариант програнулина имеет последовательность:

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRX₁X₂X₃
 (SEQ ID NO:3).

27. Полипептид по любому из пп. 22–26, где X_1 представляет собой R, H, K, D, E, S, T, N, Q, L, F, Y, P или V.

28. Полипептид по любому из пп. 22–27, где X_2 представляет собой H, K, D, E, S, T, N, Q, G, P, A, Y, V, I, F, L или R.

29. Полипептид по любому из пп. 22–28, где X_3 представляет собой L, Y или P.

30. Полипептид по любому из пп. 22–29, где $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1IL , X_1FL или X_1QL .

31. Полипептид по любому из пп. 22–29, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PX_2L , QX_2L или VX_2L .

32. Полипептид по любому из пп. 22–29, где $X_1X_2X_3$ представляет собой X_1X_2L .
33. Полипептид по п. 32, где X_2 представляет собой A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.
34. Полипептид по любому из пп. 22–30, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PPL.
35. Полипептид по любому из пп. 22–30, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PFL.
36. Полипептид по любому из пп. 22–30, где $X_1X_2X_3$ представляет собой QQL.
37. Полипептид по любому из пп. 22–29 и 31, где $X_1X_2X_3$ представляет собой VVL.
38. Полипептид по любому из пп. 22–29 и 31, где $X_1X_2X_3$ представляет собой VTL.
39. Полипептид по любому из пп. 22–29 и 31, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PPL.
40. Полипептид по любому из пп. 22–29 и 31, где $X_1X_2X_3$ представляет собой PYL.
41. Полипептид по любому из пп. 22–29 и 31, где $X_1X_2X_3$ представляет собой QRL.
42. Полипептид по любому из пп. 22–29 и 31, где $X_1X_2X_3$ представляет собой QHL.
43. Полипептид, содержащий вариант програнулина, который содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO:2 и последовательностью, определенной Y_1Y_2QLL (SEQ ID NO:137), которая является смежной и С-концевой относительно позиции, соответствующей остатку 576 SEQ ID NO:2, где Y_1 представляет собой L или отсутствует, а Y_2 представляет собой R или отсутствует.
44. Полипептид по п. 43, отличающийся тем, что вариант програнулина содержит последовательность:
- TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGH
 SCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAK
 KLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCP
 QDTCVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGC
 CPFTQAVCCEDHHCPCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLPDPQALKRQDV
 PCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIV
 AGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC
 CPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNR
 QGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLLY₁
 Y₂QLL (SEQ ID NO:55),
- где Y_1 представляет собой L или отсутствует, а Y_2 представляет собой R или отсутствует.
45. Полипептид по п. 44, где Y_1 представляет собой L.
46. Полипептид по любому из пп. 43–45, где Y_2 представляет собой R.

47. Полипептид по п. 43 или п. 44, где Y_1 и Y_2 оба отсутствуют.
48. Полипептид по любому из пп. 22–47, дополнительно содержащий Fc-полипептид, который связан с вариантом програнулина.
49. Полипептид по п. 48, отличающийся тем, что с вариантом програнулина связан N-конец или C-конец Fc-полипептида.
50. Полипептид по п. 48 или п. 49, отличающийся тем, что Fc-полипептид связан с вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером.
51. Полипептид по п. 50, отличающийся тем, что длина полипептидного линкера составляет 1–50 аминокислот.
52. Полипептид по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер.
53. Полипептид по п. 52, отличающийся тем, что гибкий полипептидный линкер представляет собой богатый глицином линкер.
54. Полипептид по п. 53, отличающийся тем, что богатый глицином линкер представляет собой G_4S (SEQ ID NO:90) или $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:91).
55. Полипептид по любому из пп. 48–54, отличающийся тем, что Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:64–67.
56. Полипептид по любому из пп. 48–54, отличающийся тем, что Fc-полипептид представляет собой модифицированный Fc-полипептид, который специфически связывается с рецептором трансферрина.
57. Полипептид по п. 56, отличающийся тем, что Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:68–87 и 129–132.
58. Полипептид по п. 57, отличающийся тем, что Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 и 129–132.
59. Слитый белок, содержащий:
- (a) вариант програнулина по любому из пп. 1–21;
 - (b) первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина по (a); и
 - (c) второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом.
60. Слитый белок по п. 59, отличающийся тем, что второй Fc-полипептид связан со вторым вариантом програнулина по любому из пп. 1–21.
61. Слитый белок по п. 59 или п. 60, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид связан с вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером и/или второй Fc-полипептид связан с вариантом програнулина пептидной связью или полипептидным линкером.

62. Слитый белок по п. 61, отличающийся тем, что длина полипептидного линкера составляет 1–50 аминокислот.

63. Слитый белок по п. 61 или п. 62, отличающийся тем, что полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер.

64. Слитый белок по п. 63, отличающийся тем, что гибкий полипептидный линкер представляет собой богатый глицином линкер.

65. Слитый белок по п. 64, отличающийся тем, что богатый глицином линкер представляет собой G₄S (SEQ ID NO:90) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:91).

66. Слитый белок по любому из пп. 59–65, отличающийся тем, что С-конец первого Fc-полипептида связан с N-концом програнулина и/или С-конец второго Fc-полипептида связан с N-концом варианта програнулина.

67. Слитый белок по любому из пп. 59–66, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид или второй Fc-полипептид специфически связывается с рецептором трансферрина.

68. Слитый белок по любому из пп. 59–67, отличающийся тем, что каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации.

69. Слитый белок по п. 68, отличающийся тем, что:

(i) первый Fc-полипептид содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU; или

(ii) первый Fc-полипептид содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй Fc-полипептид содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

70. Слитый белок по любому из пп. 59–69, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид и/или второй Fc-полипептид независимо содержит модификации, которые снижают эффекторную функцию.

71. Слитый белок по п. 70, отличающийся тем, что модификации, которые снижают эффекторную функцию, представляют собой замены L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU.

72. Слитый белок по любому из пп. 59–71, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:64–67.

73. Слитый белок по любому из пп. 59–72, отличающийся тем, что второй Fc-полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:68–87 и 129–132.

74. Слитый белок по п. 73, отличающийся тем, что второй Fc-полипептид содержит

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:70, 75, 80, 85 и 129–132.

75. Слитый белок по любому из пп. 59–74, отличающийся тем, что шарнирная область или ее часть связана с первым Fc-полипептидом и/или вторым Fc-полипептидом.

76. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:98, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

77. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:98, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

78. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:99, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

79. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:99, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

80. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:100, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

81. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:100, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

82. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:101, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

83. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:101, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

84. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:102, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

85. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:102, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

86. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-

полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:123, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

87. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:123, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

88. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:124, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

89. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:124, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

90. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:125, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

91. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:125, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

92. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:126, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:75.

93. Слитый белок по любому из пп. 59–75, отличающийся тем, что первый Fc-полипептид, связанный с вариантом програнулина, содержит последовательность SEQ ID NO:126, а второй Fc-полипептид содержит последовательность SEQ ID NO:130.

94. Слитый белок по любому из пп. 59–93, отличающийся тем, что слитый белок в клетке яичника китайского хомяка (CHO).

95. Слитый белок по п. 94, отличающийся тем, что слитый белок очищают по существу так, как описано в примере 1.

96. Слитый белок по любому из пп. 59–95, отличающийся тем, что более 50% вариантов програнулина в первых полипептидах слитых белков не усечены на C-конце.

97. Слитый белок по любому из пп. 59–96, отличающийся тем, что значение K_D в отношении связывания сортилина для слитого белка составляет менее чем около 100 нМ.

98. Слитый белок по любому из пп. 59–97, отличающийся тем, что EC_{50} в отношении связывания сортилина для слитого белка составляет менее чем около 25 нМ.

99. Слитый белок по п. 98, отличающийся тем, что EC_{50} измеряют с помощью ELISA.

100. Слитый белок по п. 99, отличающийся тем, что анализ ELISA проводят по существу так, как описано в примере 4.

101. Слитый белок по любому из пп. 59–100, отличающийся тем, что EC50 в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем 10-кратное снижение связывания сортилина по сравнению с эталонным слитым белком, причем эталонный слитый белок содержит (i) первый полипептид, содержащий SEQ ID NO:2, и (ii) второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом.

102. Слитый белок по любому из пп. 59–101, отличающийся тем, что EC50 в отношении связывания сортилина слитого белка демонстрирует менее чем 10-кратное снижение связывания сортилина по сравнению с эталонным слитым белком, причем эталонный слитый белок содержит (i) первый полипептид, содержащий SEQ ID NO:108, и (ii) второй Fc-полипептид, который образует Fc-полипептидный димер с первым Fc-полипептидом.

103. Слитый белок по п. 101 или п. 102, отличающийся тем, что эталонный слитый белок выработан в клетке НЕК.

104. Слитый белок по п. 103, отличающийся тем, что эталонный слитый белок очищают по существу так, как описано в примере 1.

105. Фармацевтическая композиция, содержащая вариант програнулина по любому из пп. 1–21, полипептид по любому из пп. 22–58 или слитый белок по любому из пп. 59–104 и фармацевтически приемлемый носитель.

106. Фармацевтическая композиция, содержащая множество слитых белков по любому из пп. 59–104 и фармацевтически приемлемый носитель.

107. Фармацевтическая композиция по п. 106, отличающаяся тем, что более 50% из множества слитых белков содержат интактный С-конец в варианте програнулина слитого белка.

108. Способ лечения субъекта, имеющего нейродегенеративное заболевание, атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, возрастную макулярную дегенерацию (ВМД) или связанное с програнулином расстройство, включающий введение субъекту варианта програнулина по любому из пп. 1–21, полипептида по любому из пп. 22–58, слитого белка по любому из пп. 59–104 или фармацевтической композиции по любому из пп. 105–107.

109. Способ повышения количества програнулина или его варианта у субъекта, включающий введение субъекту варианта програнулина по любому из пп. 1–21, полипептида по любому из пп. 22–58, слитого белка по любому из пп. 59–104 или

фармацевтической композиции по любому из пп. 105–107.

110. Способ снижения активности катепсина D у субъекта, включающий введение субъекту варианта програнулина по любому из пп. 1–21, полипептида по любому из пп. 22–58, слитого белка по любому из пп. 59–104 или фармацевтической композиции по любому из пп. 105–107.

111. Способ повышения лизосомной деградации у субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство, включающий введение субъекту варианта програнулина по любому из пп. 1–21, полипептида по любому из пп. 22–58, слитого белка по любому из пп. 59–104 или фармацевтической композиции по любому из пп. 105–107.

112. Способ улучшения или восстановления лизосомной функции у субъекта, имеющего связанное с програнулином расстройство, включающий введение субъекту варианта програнулина по любому из пп. 1–21, полипептида по любому из пп. 22–58, слитого белка по любому из пп. 59–104 или фармацевтической композиции по любому из пп. 105–107.

113. Способ по любому из пп. 109–112, отличающийся тем, что субъект имеет нейродегенеративное заболевание, атеросклероз, расстройство, связанное с TDP-43, или ВМД.

114. Способ по любому из пп. 108–113, отличающийся тем, что субъект имеет нейродегенеративное заболевание.

115. Способ по п. 114, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из лобно-височной деменции (ЛВД), нейронального цероидного липофусциноза (НЦЛ), болезни Ниманна — Пика типа А (НПА), болезни Ниманна — Пика типа В (НПВ), болезни Ниманна — Пика типа С (НПС), C9ORF72-ассоциированного бокового амиотрофического склероза (БАС)/ЛВД, спорадического БАС, болезни Альцгеймера (БА), болезни Гоше и болезни Паркинсона.

116. Способ по п. 115, отличающийся тем, что нейродегенеративное заболевание представляет собой ЛВД.

117. Способ по любому из пп. 108–116, отличающийся тем, что субъект имеет мутацию в гене, кодирующем програнулин.

118. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариант програнулина по любому из пп. 1–21 или полипептид по любому из пп. 22–58.

119. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 118.

120. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 118 или вектор по п. 119.

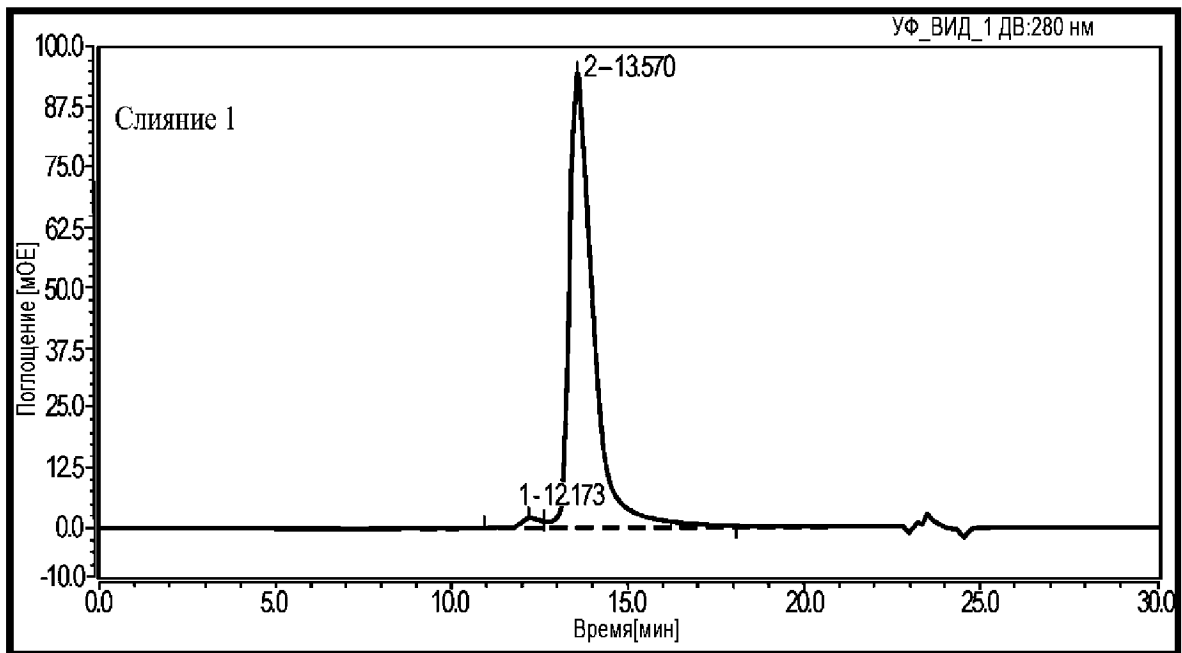
121. Клетка-хозяин по п. 120, дополнительно содержащая полинуклеотид,

содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй Fc-полипептид.

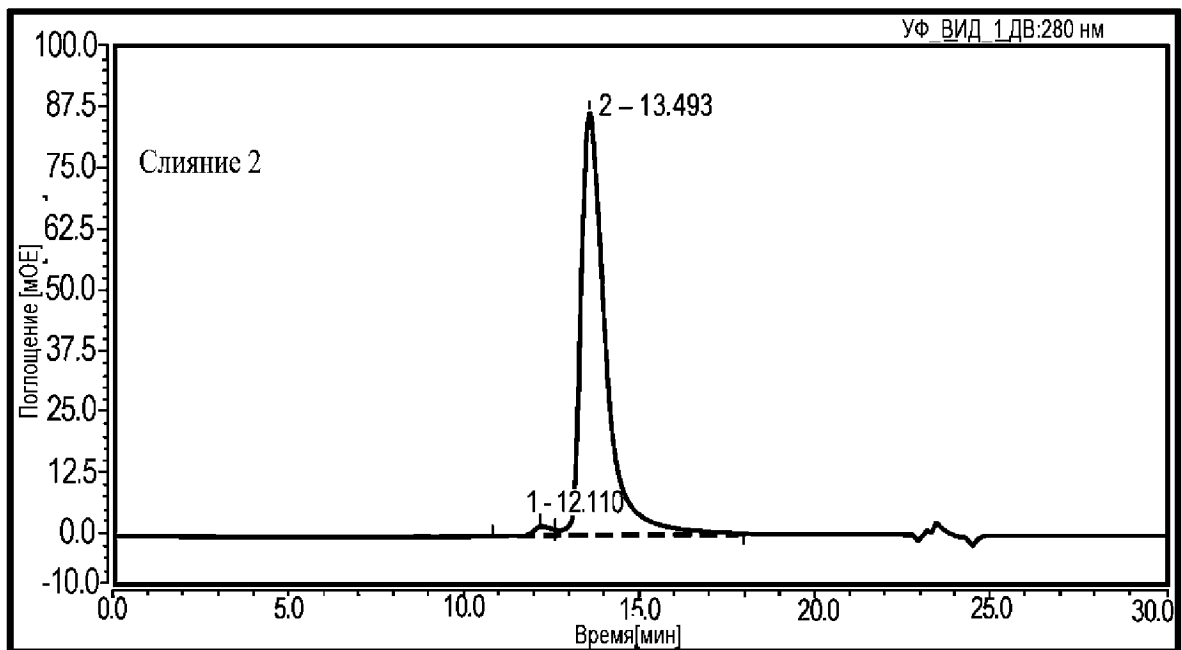
122. Клетка-хозяин по п. 121, отличающаяся тем, что второй Fc-полипептид имеет последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:61 и 64–87.

123. Способ получения полипептида, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется полипептид, кодируемый полинуклеотидом по п. 118.

Фиг. 1А



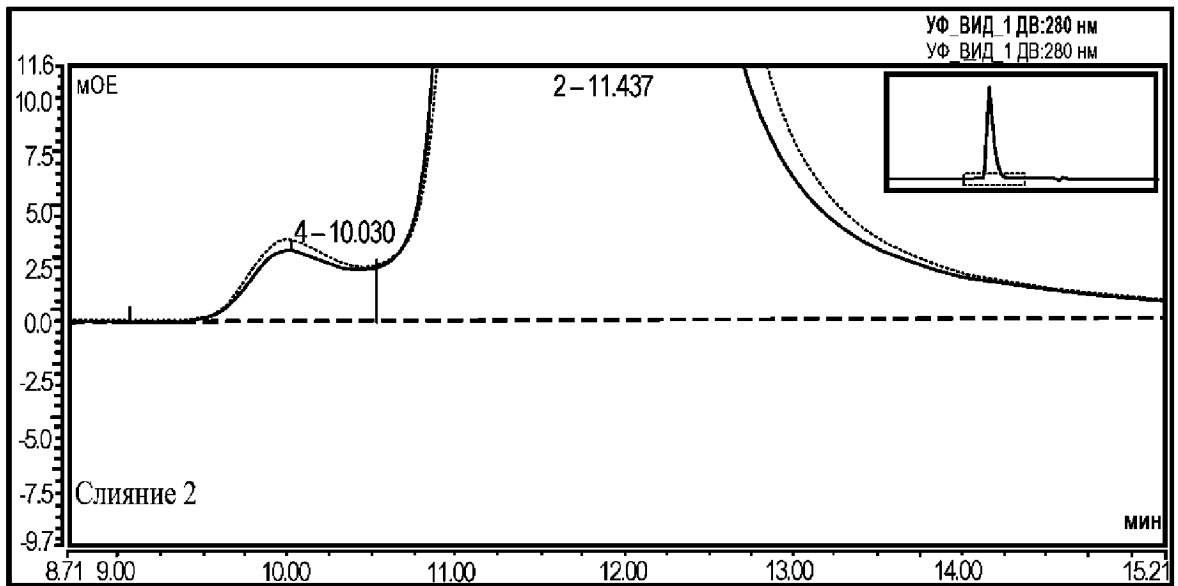
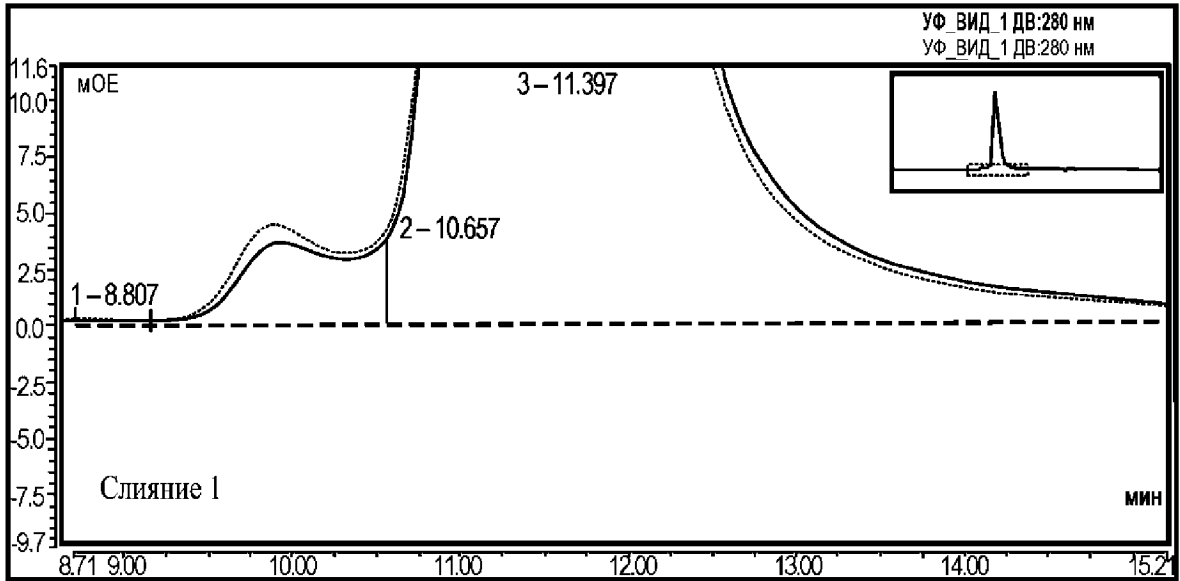
Фиг. 1В.



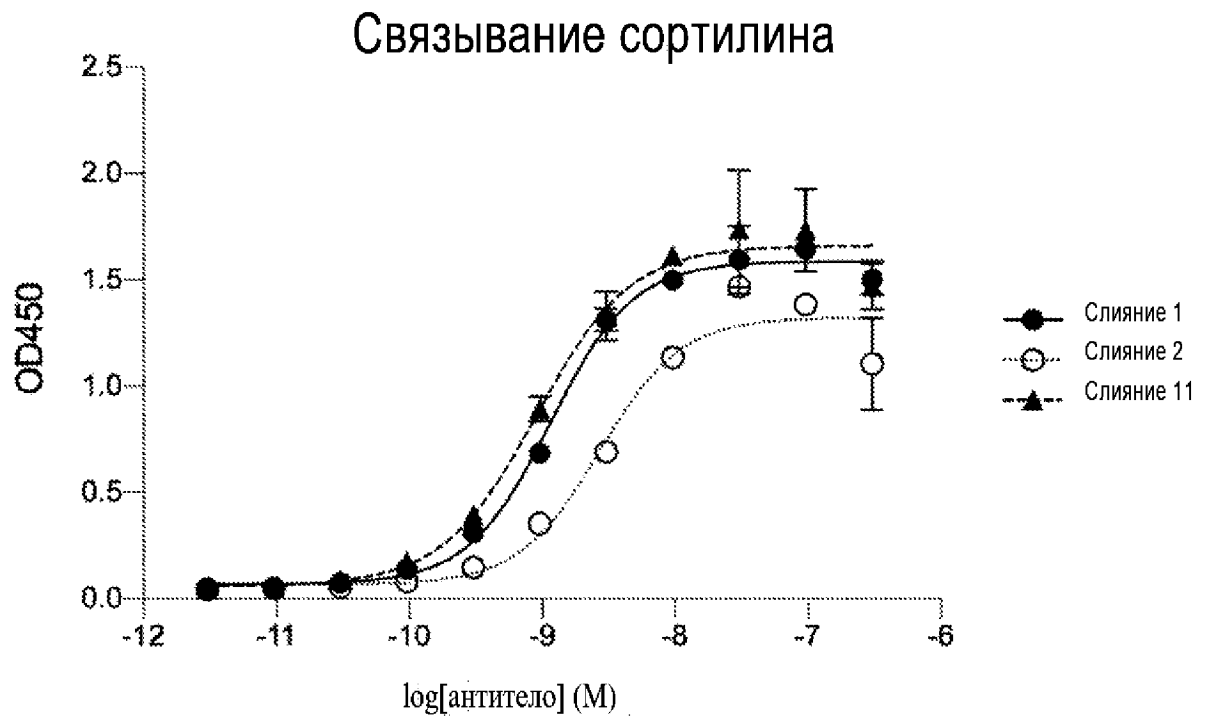
Фиг. 2

| Слитый белок | Буфер | DSF Tm1 | DSF TON |
|--------------|--|--------------|--------------|
| Слияние 1 | 20 мМ фосфат: натрия, 6 % сахароза, рН 6,5 | 69,32 (0,26) | 63,19 (0,45) |
| Слияние 2 | 20 мМ фосфат натрия, 6 % сахароза, рН 6,5 | 69,57 (0,27) | 62,61 (0,52) |

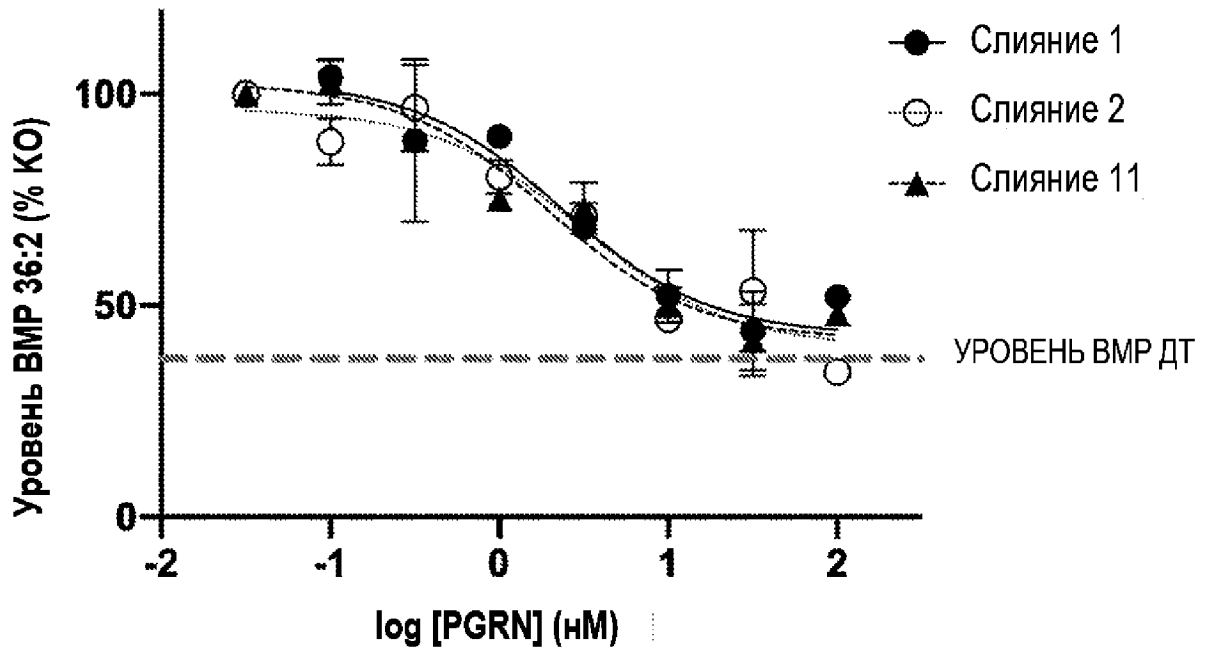
Фиг. 3



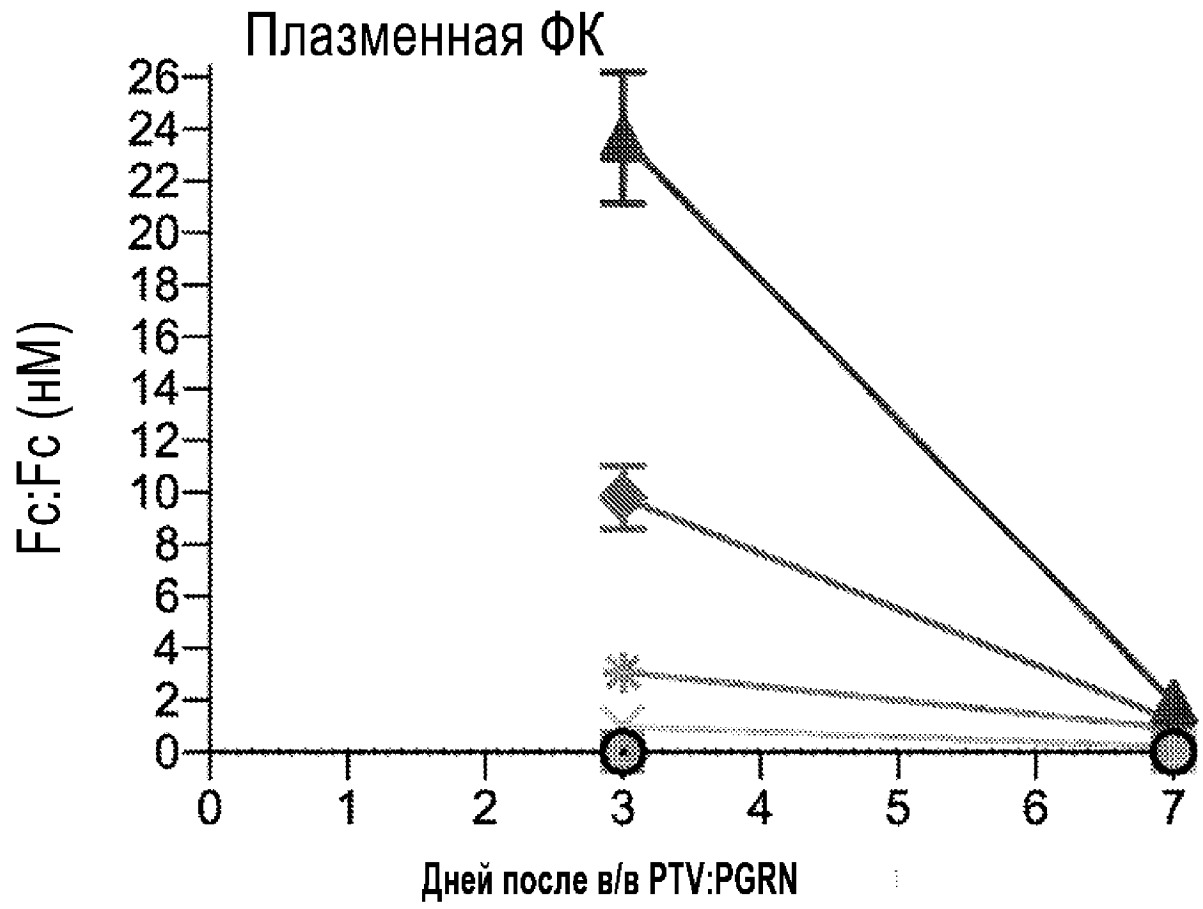
20 мМ фосфат натрия, 6 % сахароза, рН 6,5



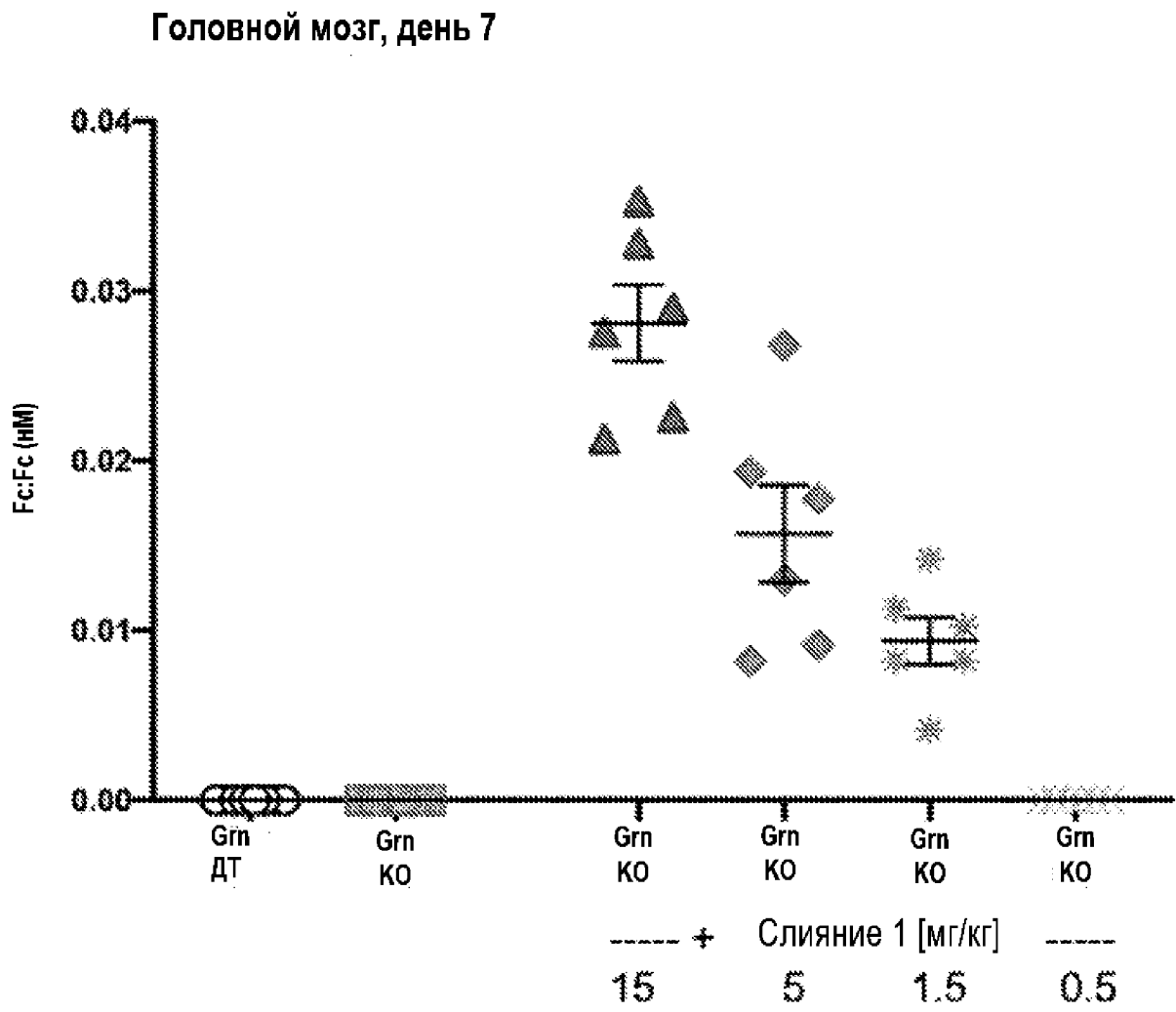
Фиг. 5



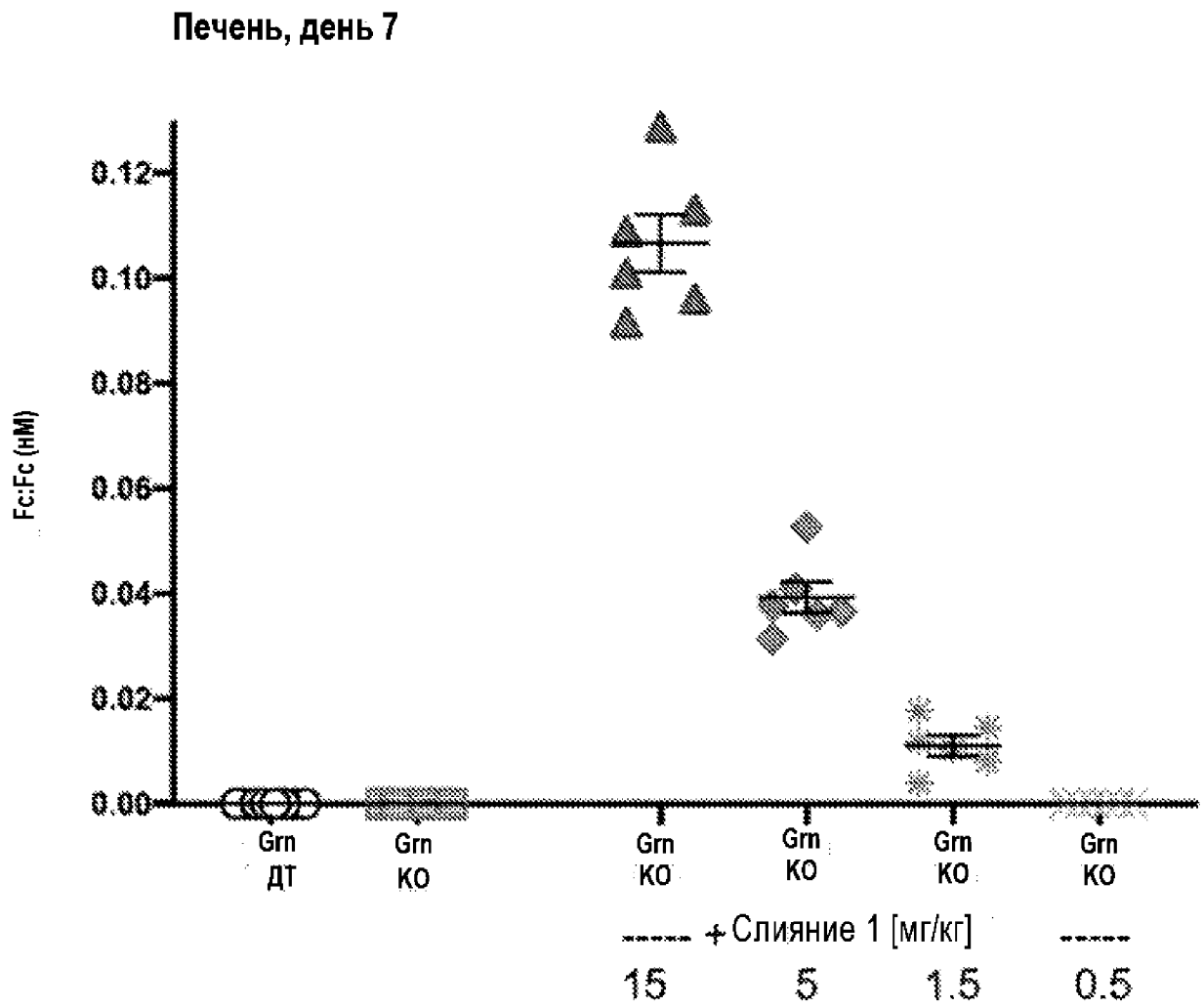
Фиг. 6А



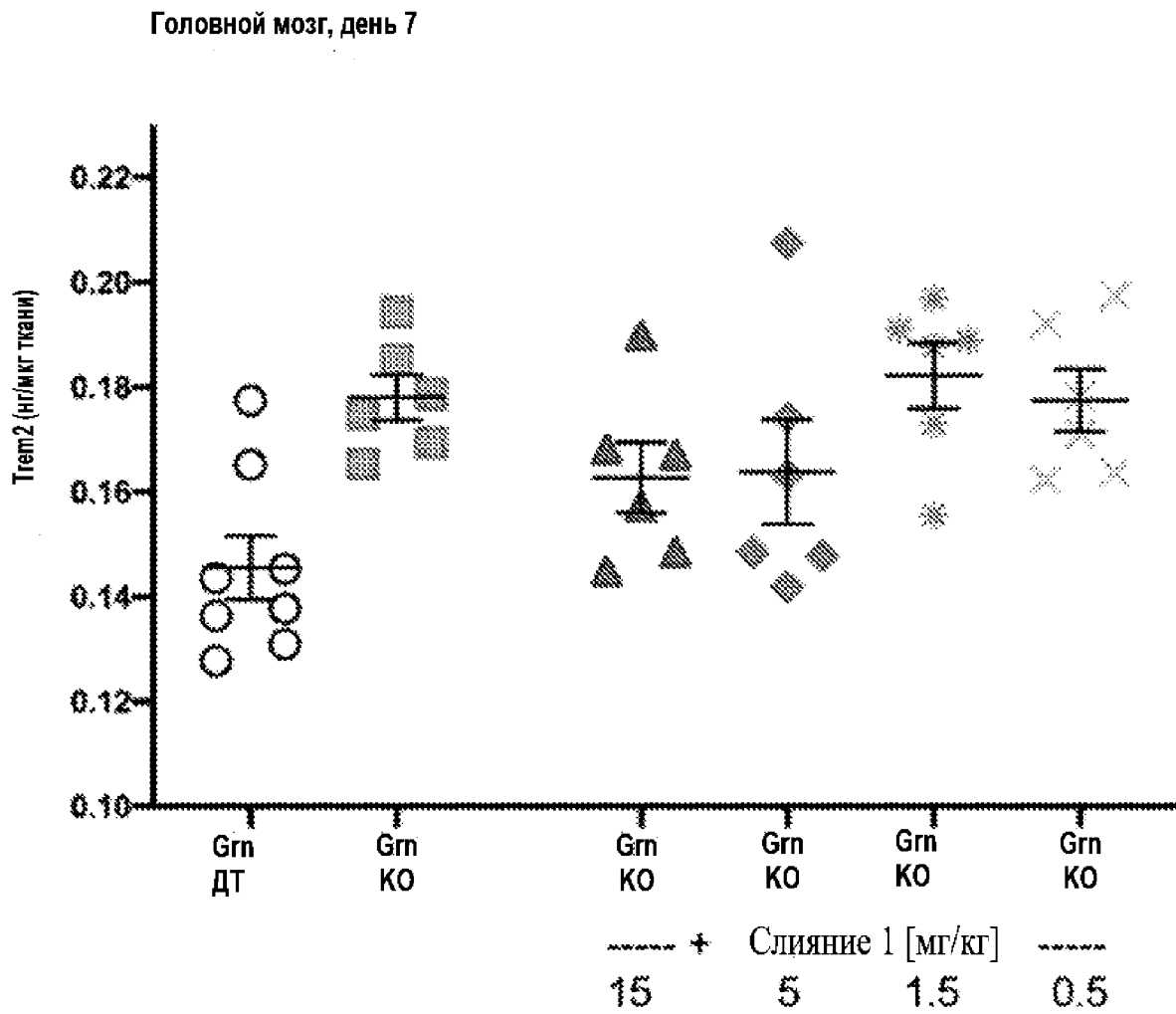
Фиг. 6В



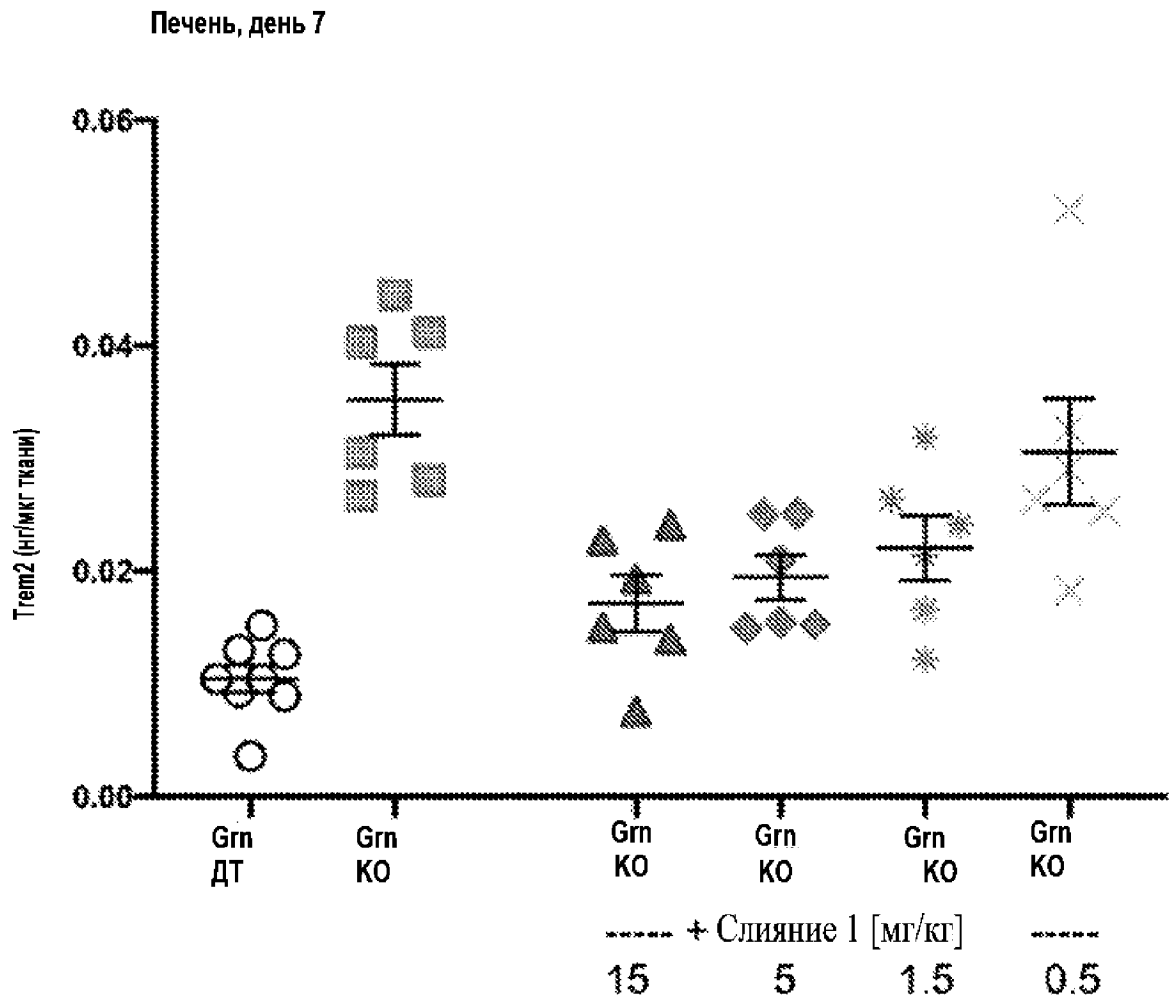
Фиг. 6С



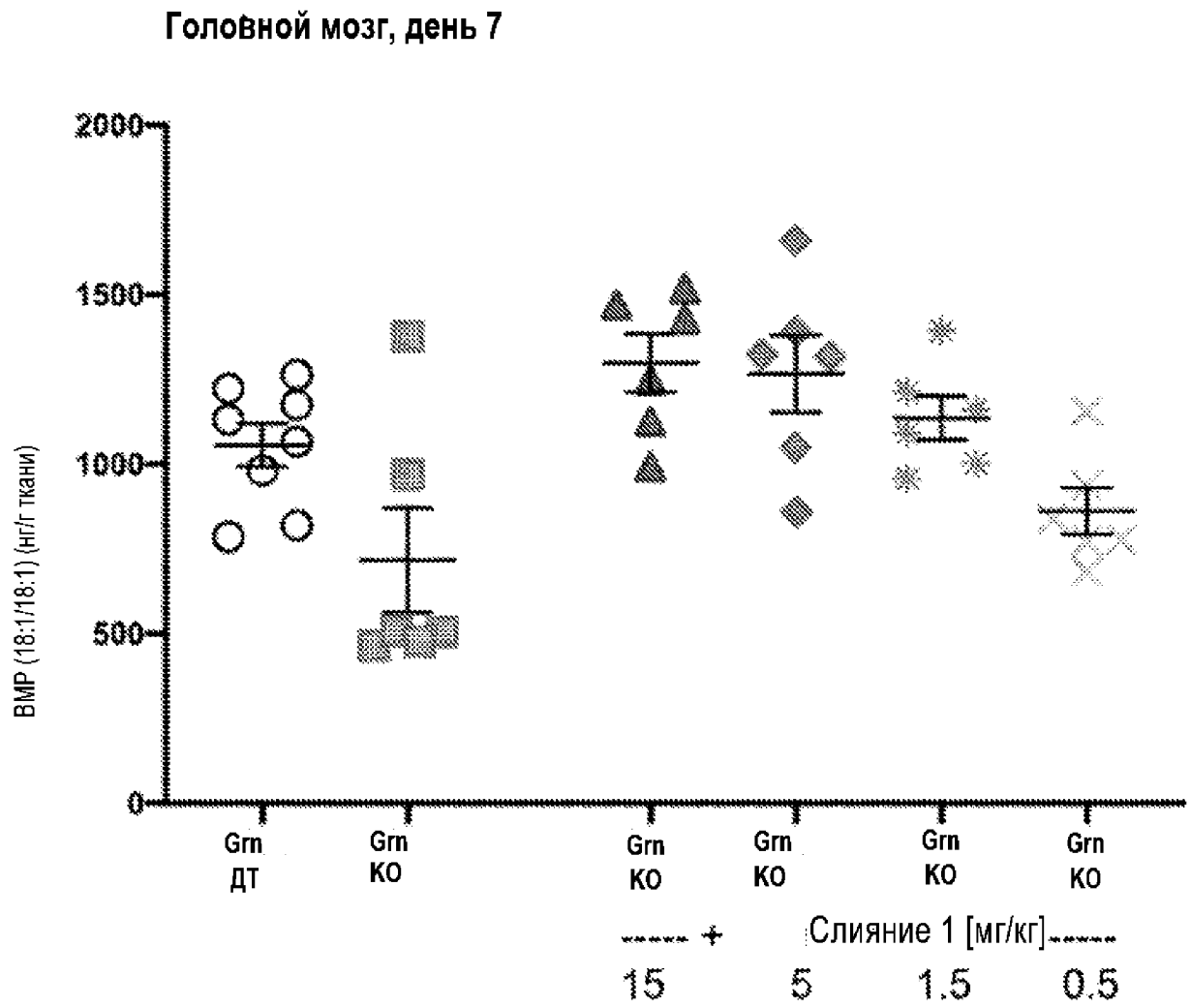
Фиг. 7А



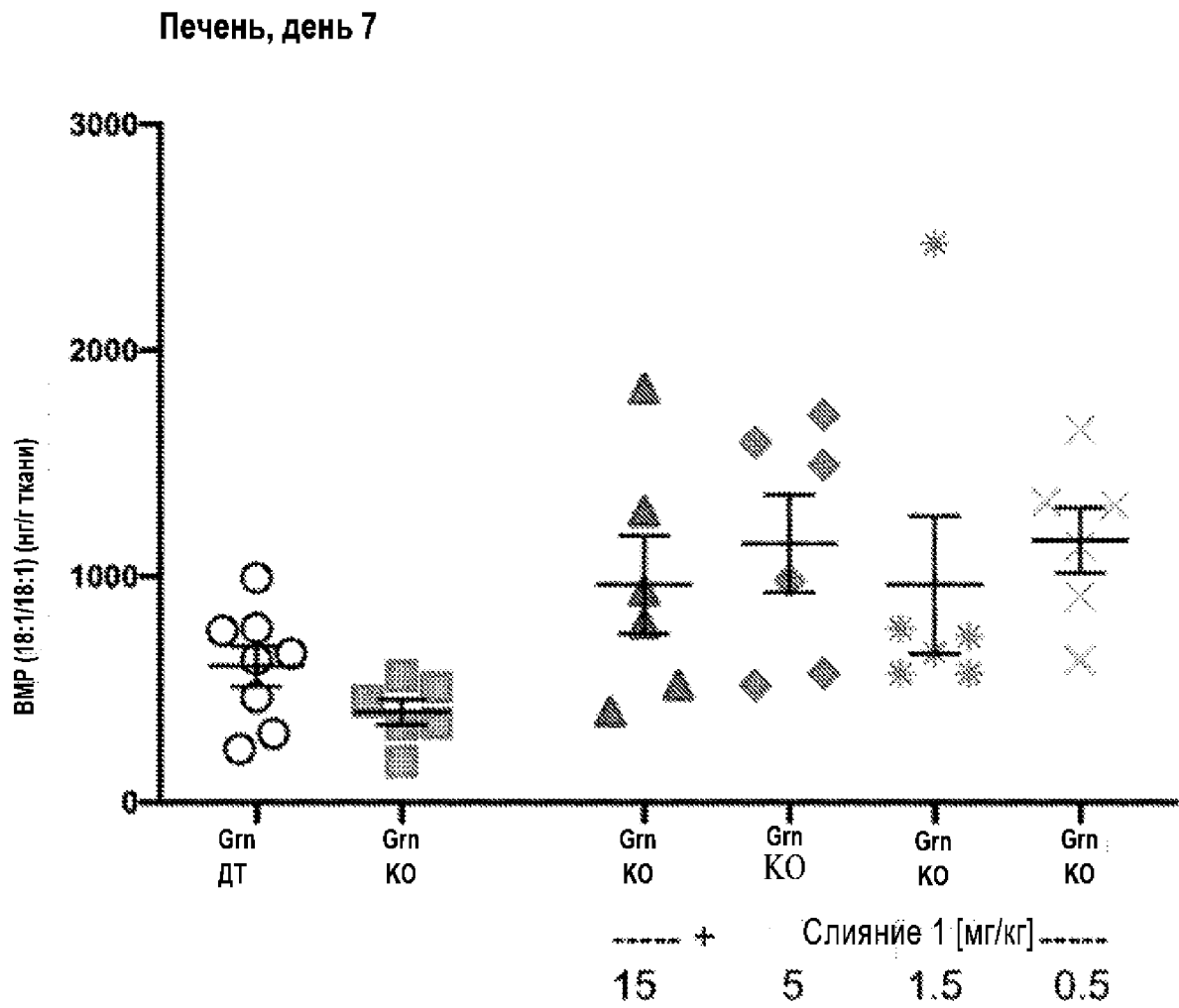
Фиг. 7В



Фиг. 8А

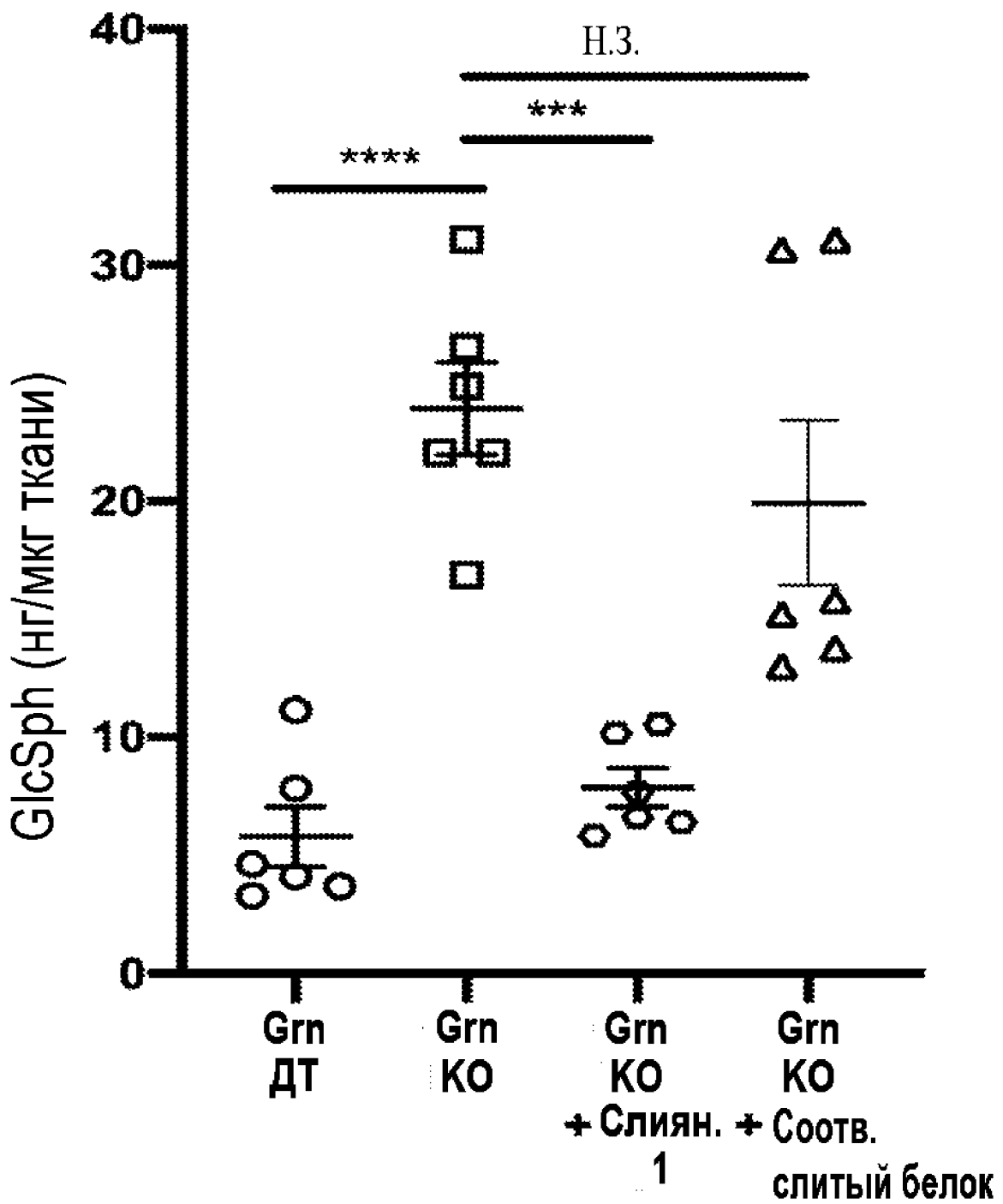


Фиг. 8В

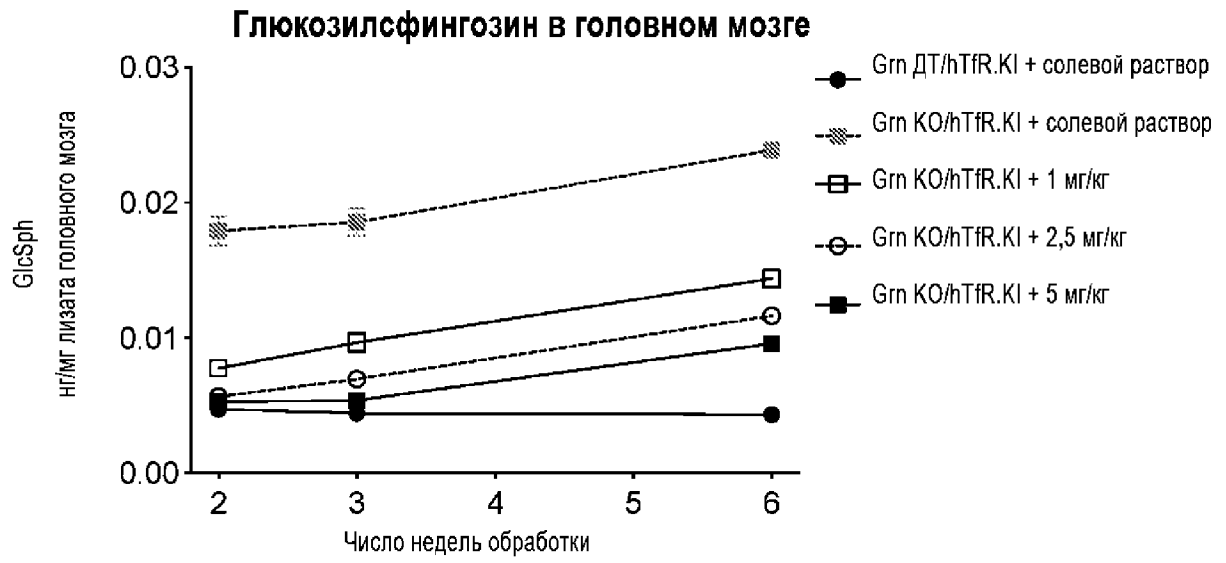


Фиг. 9

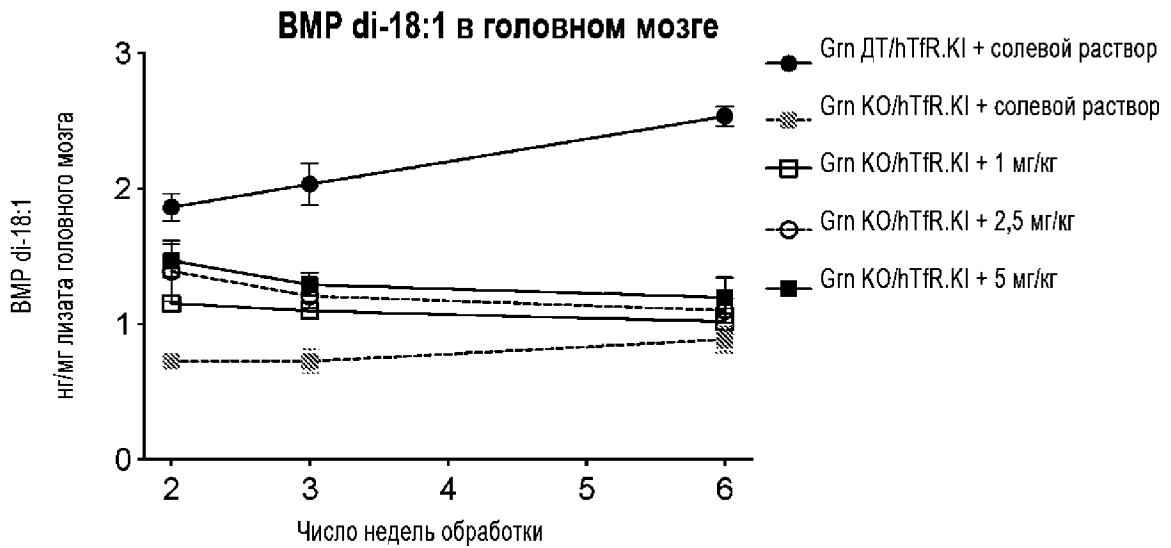
Глюкозилсфингозин в головном мозге



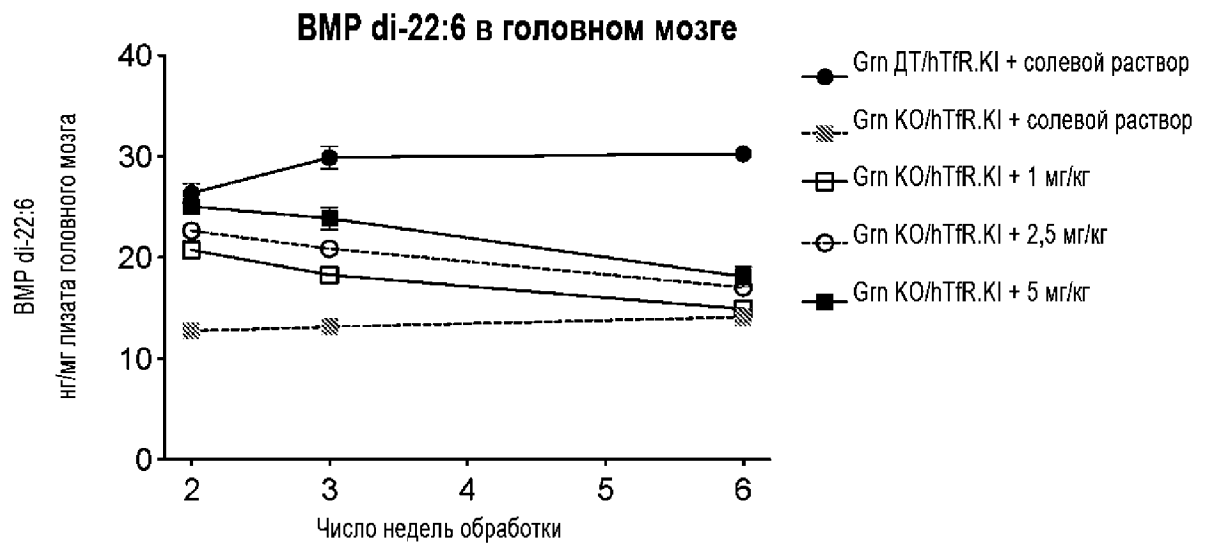
Фиг. 10



Фиг. 11

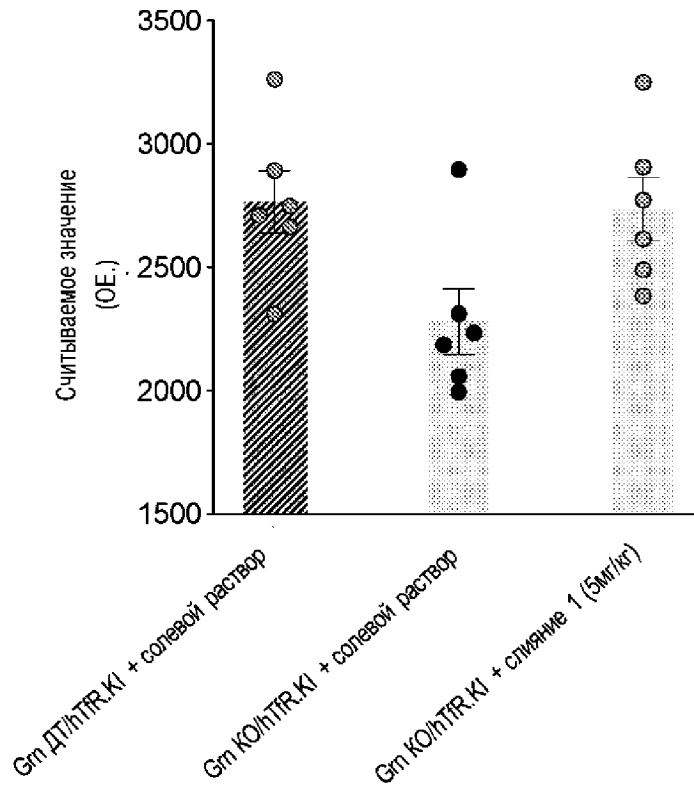


Фиг. 12

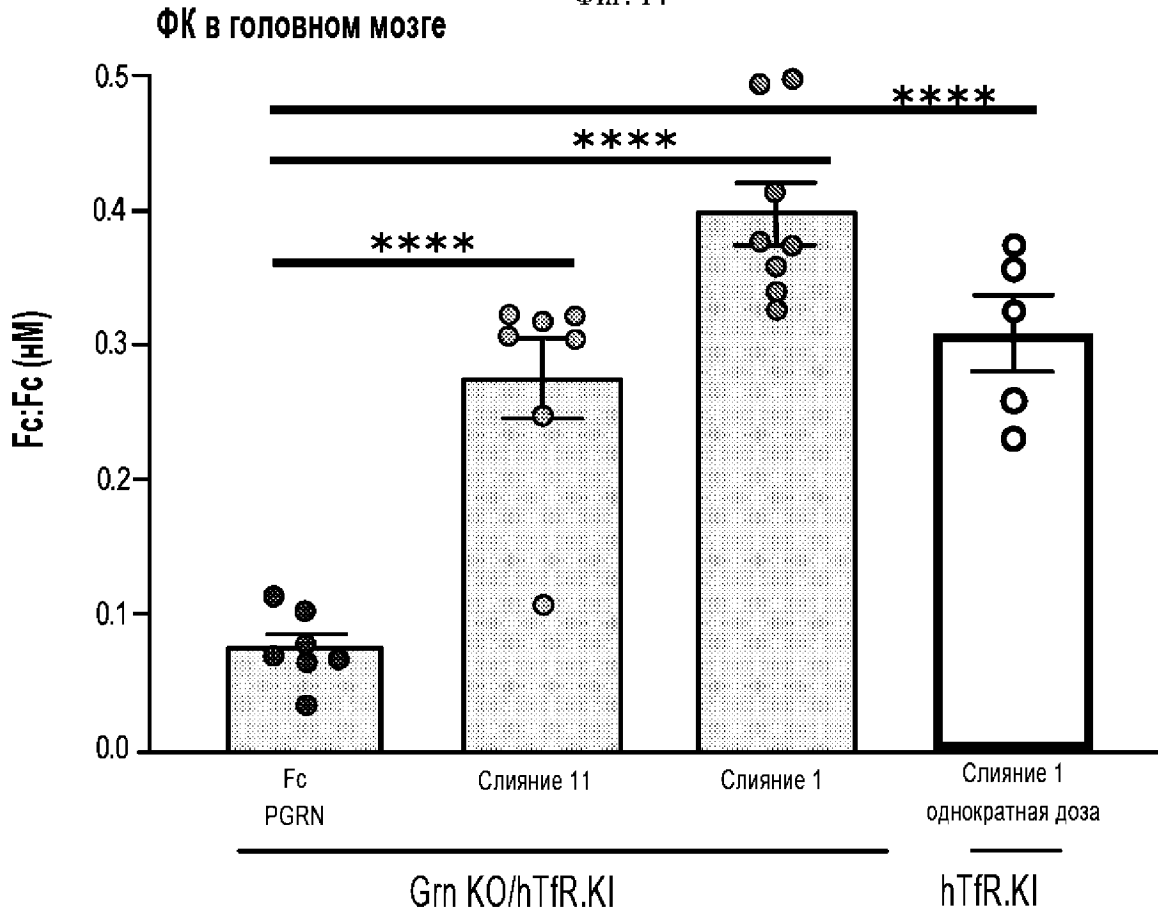


Фиг. 13

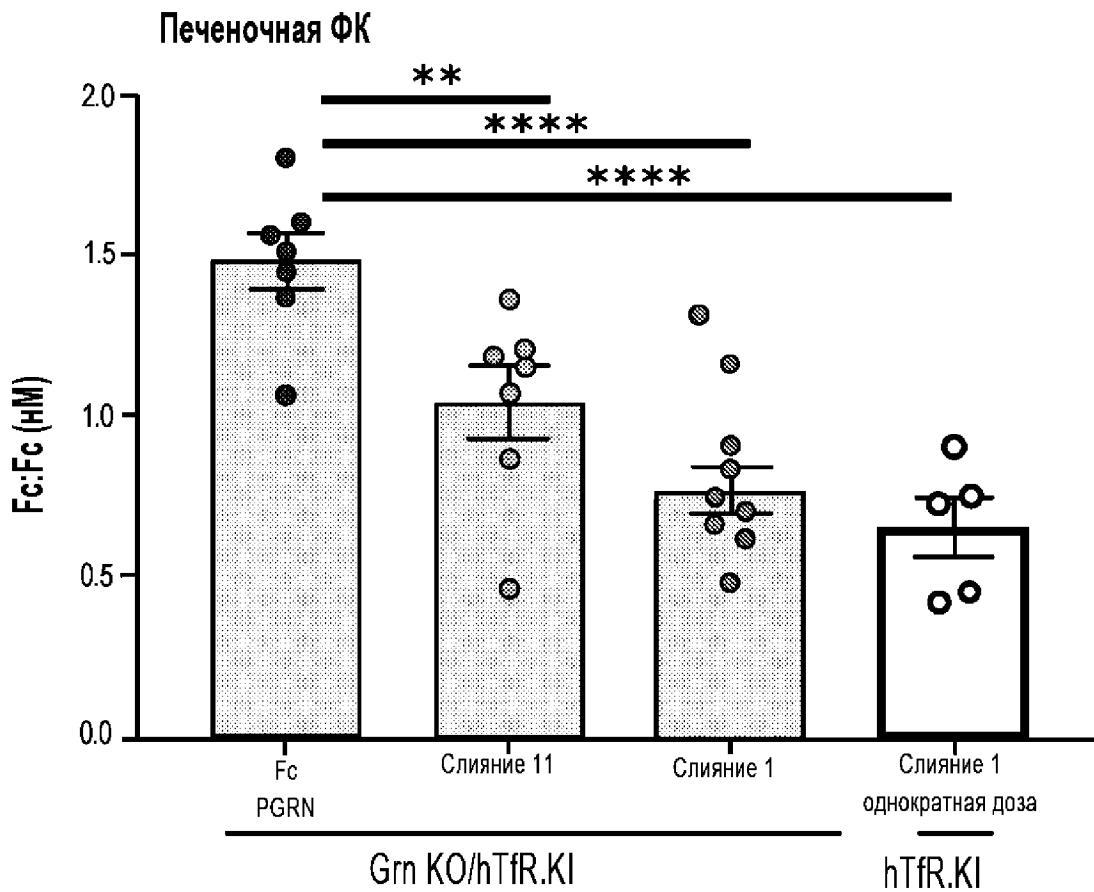
Восстановление фенотипа активности Gсазы (2 недели после обработки)



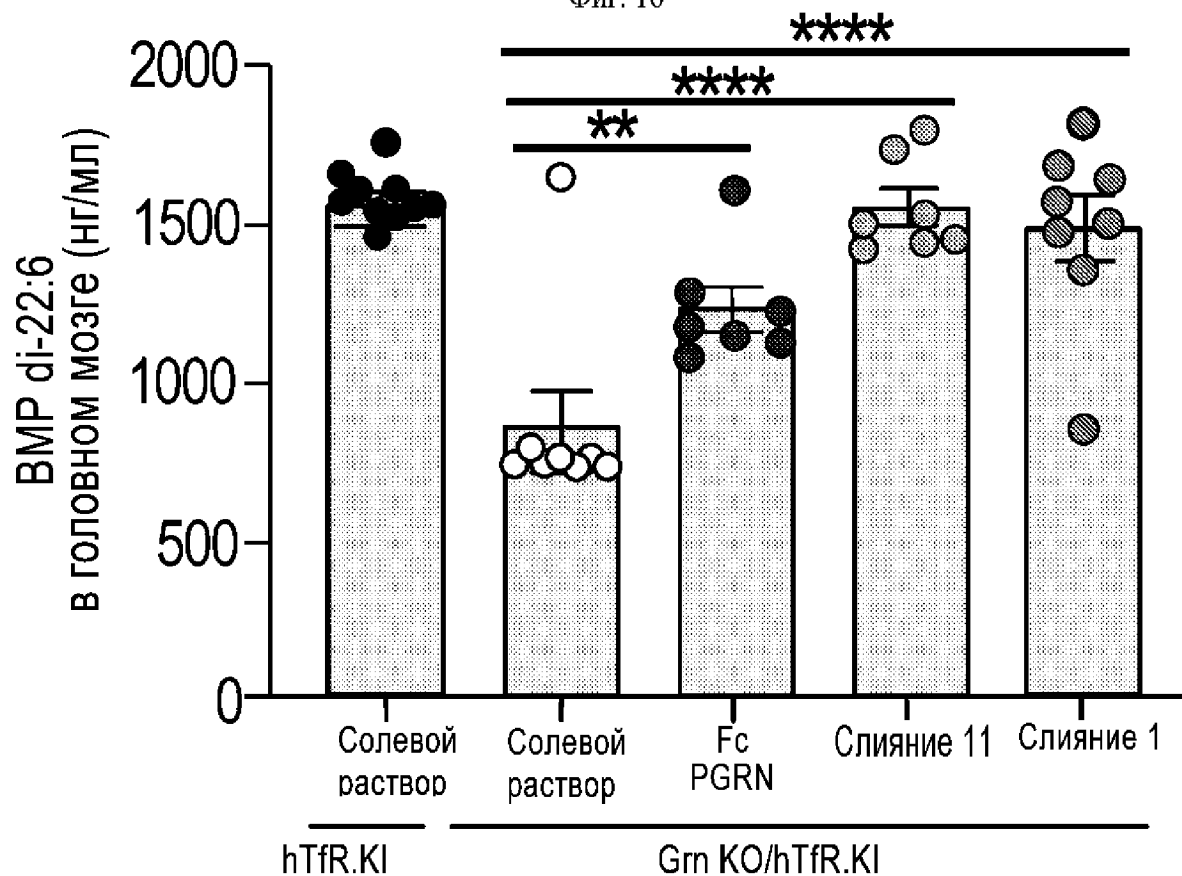
Фиг. 14



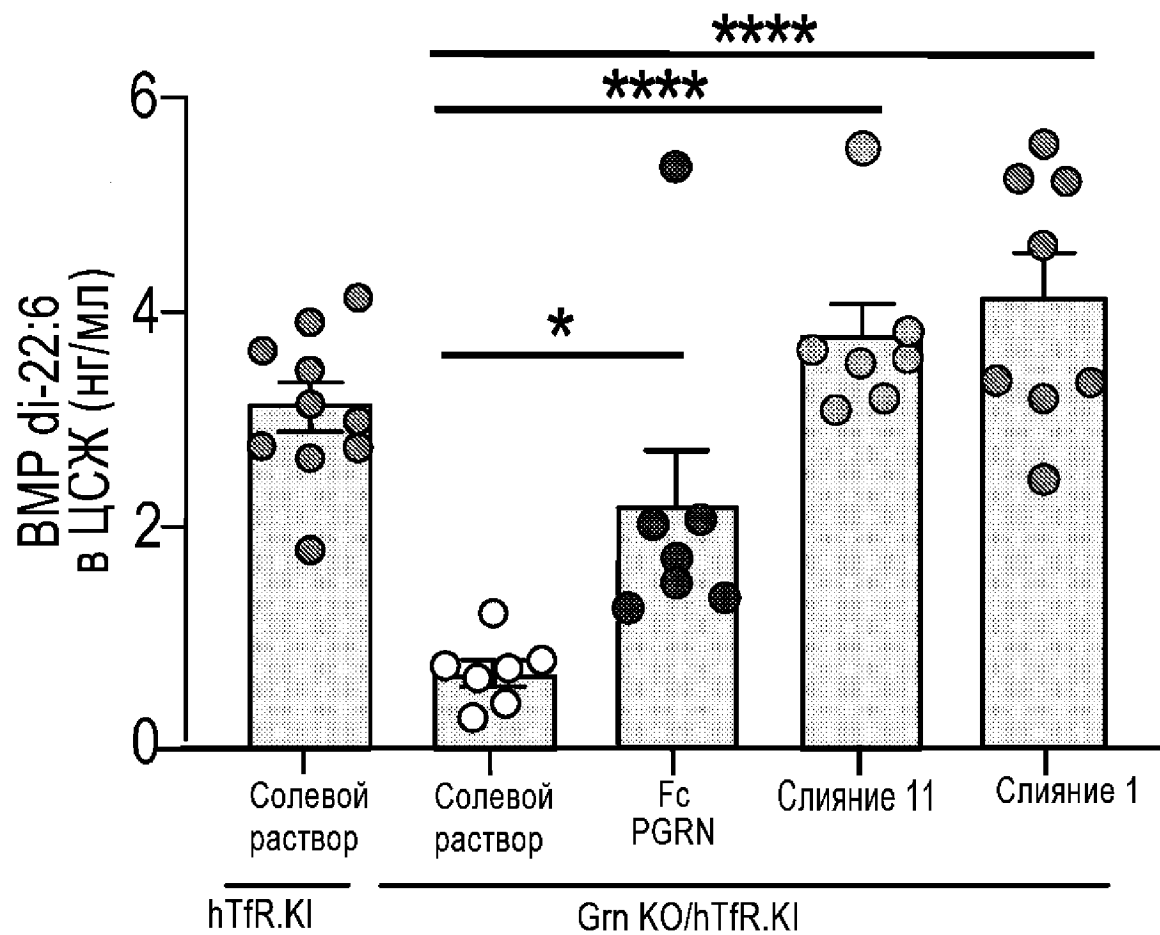
Фиг. 15



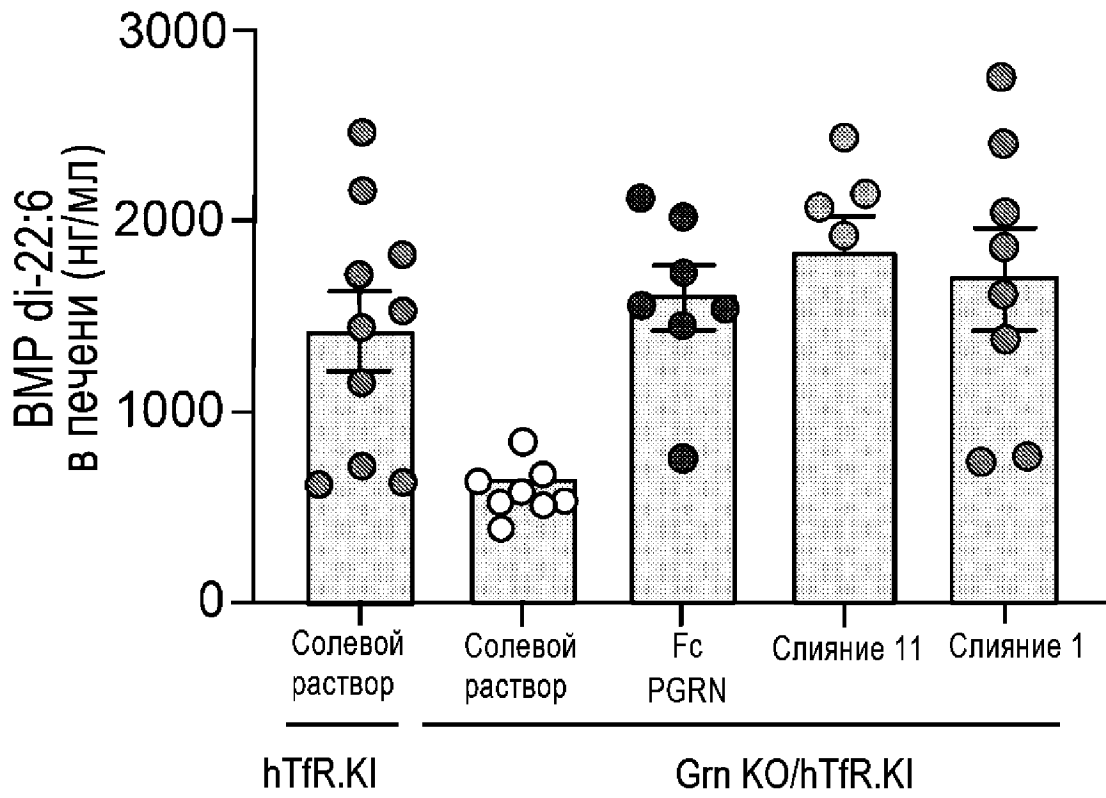
Фиг. 16



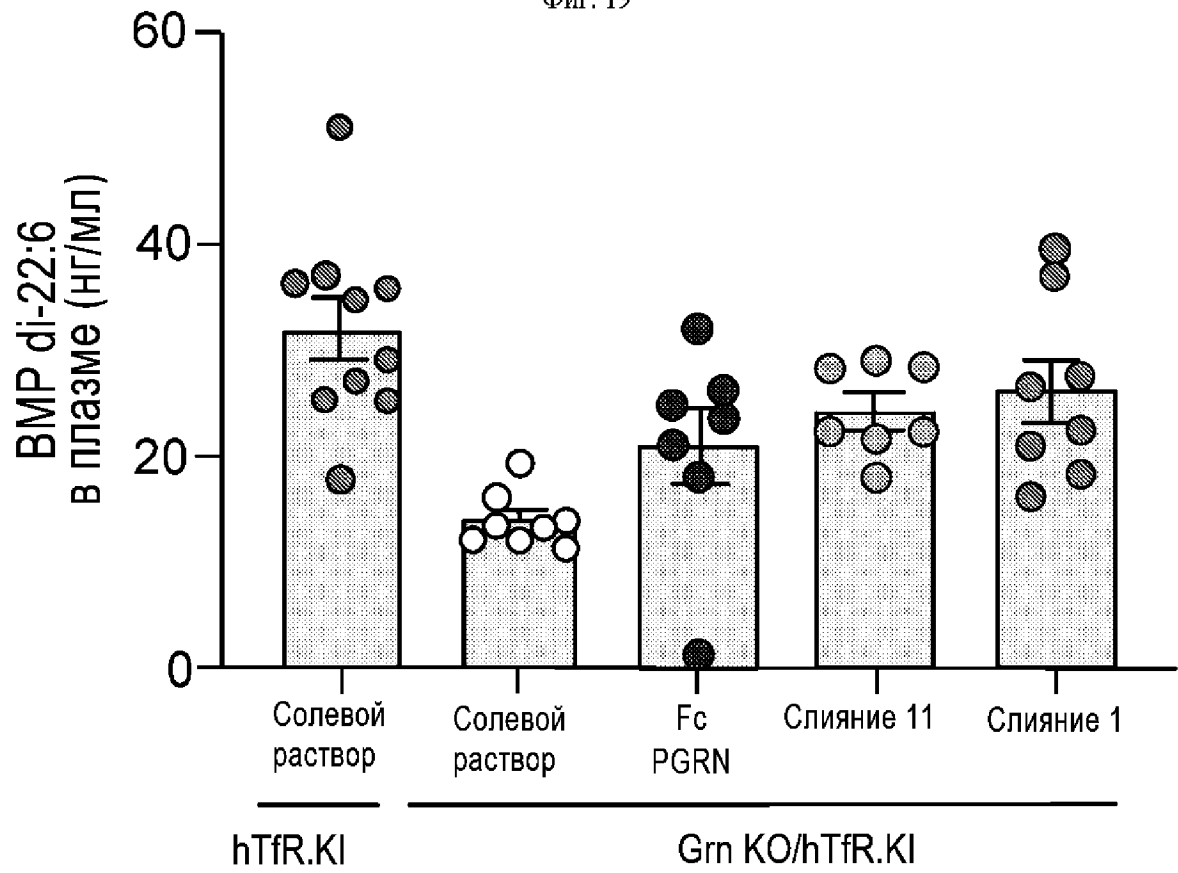
Фиг. 17



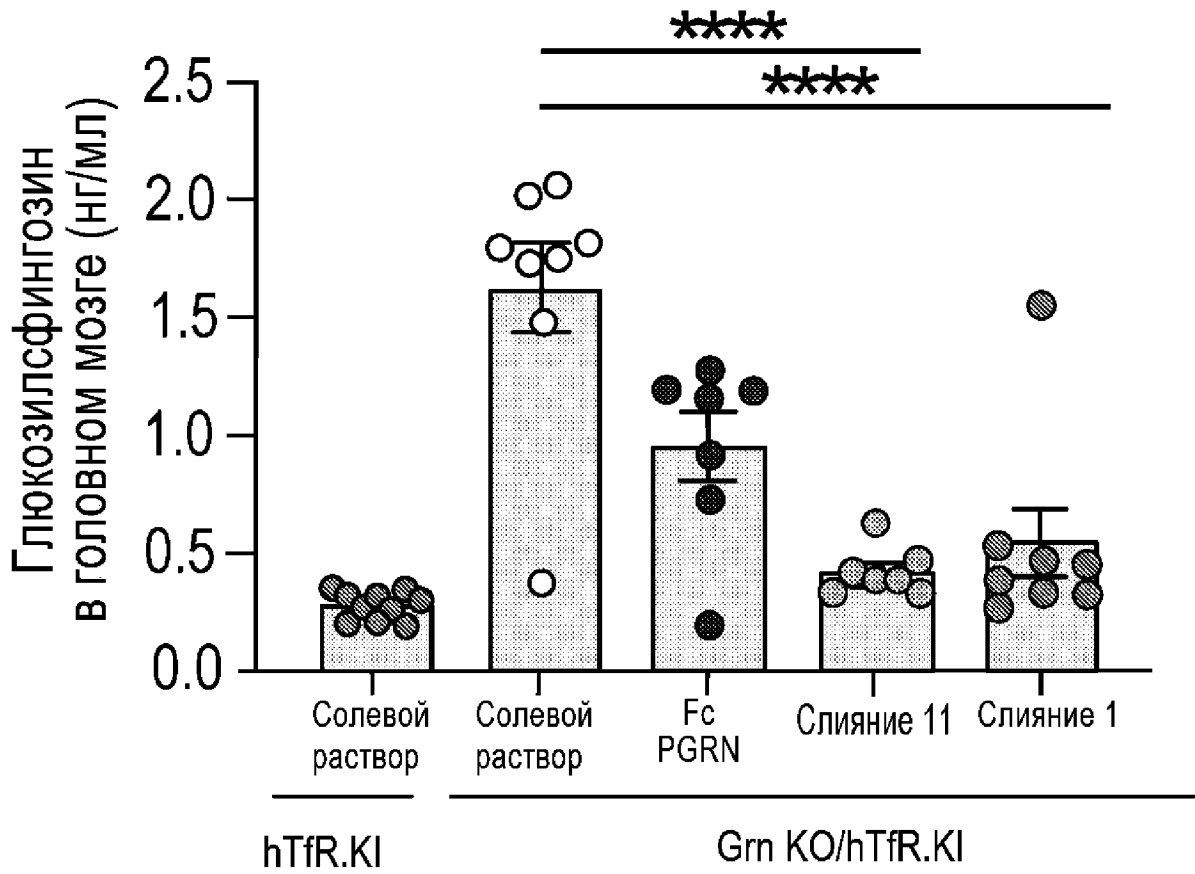
Фиг. 18



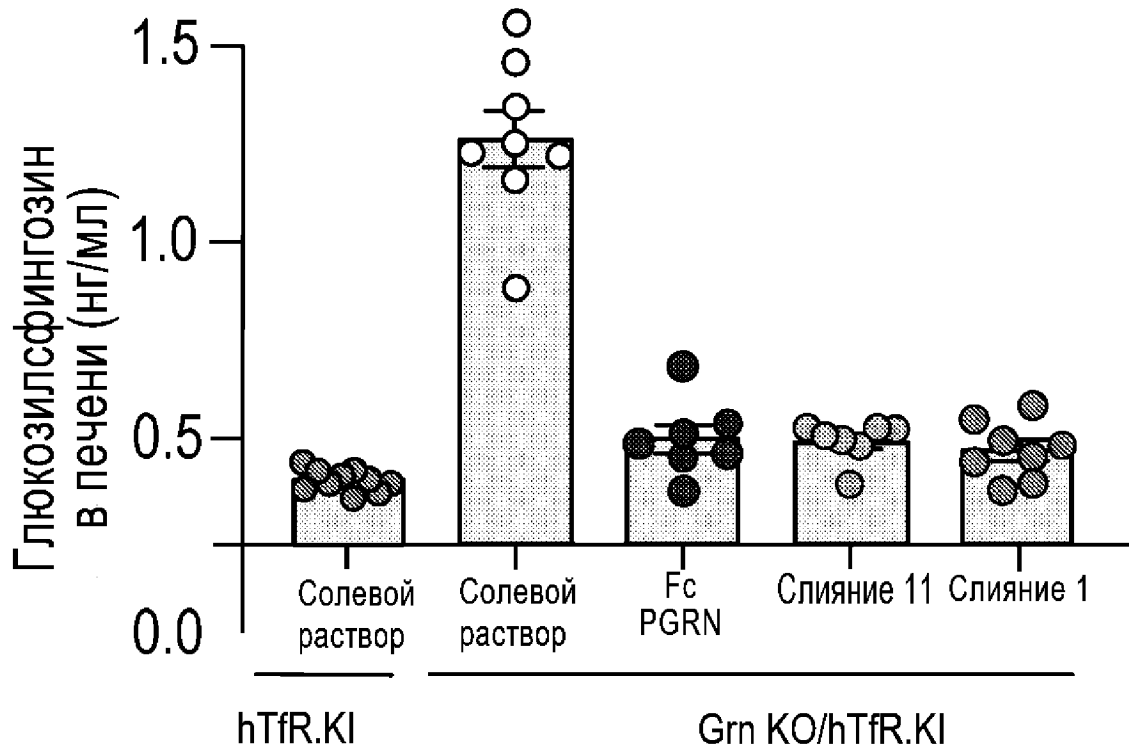
Фиг. 19



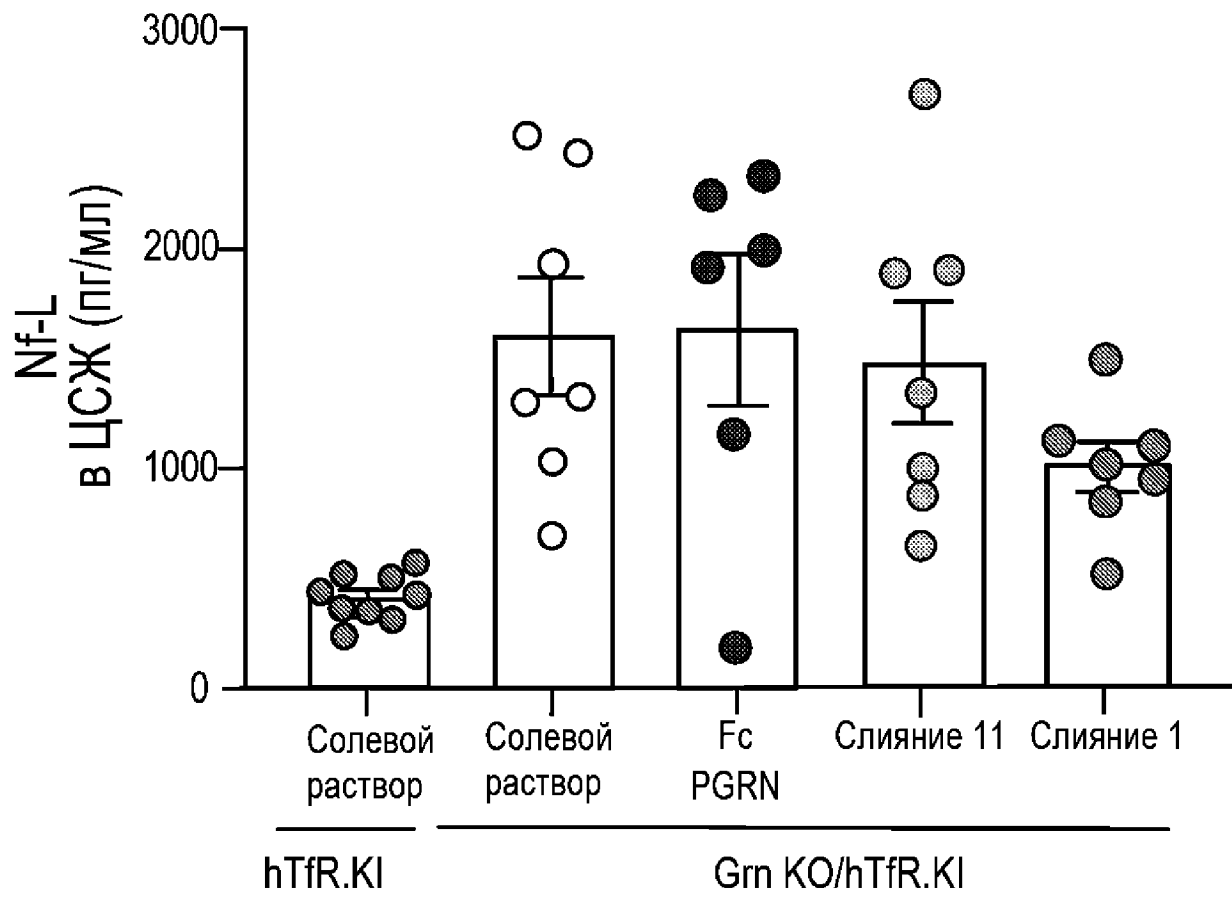
Фиг. 20



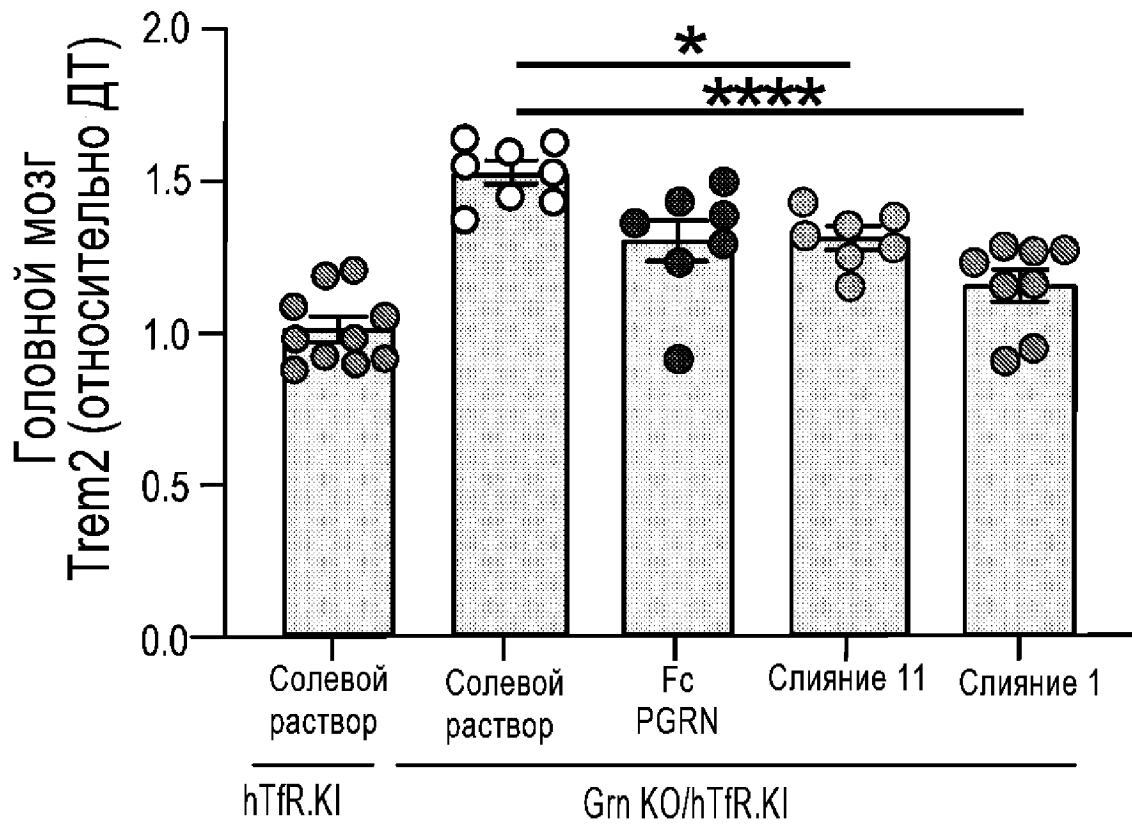
Фиг. 21



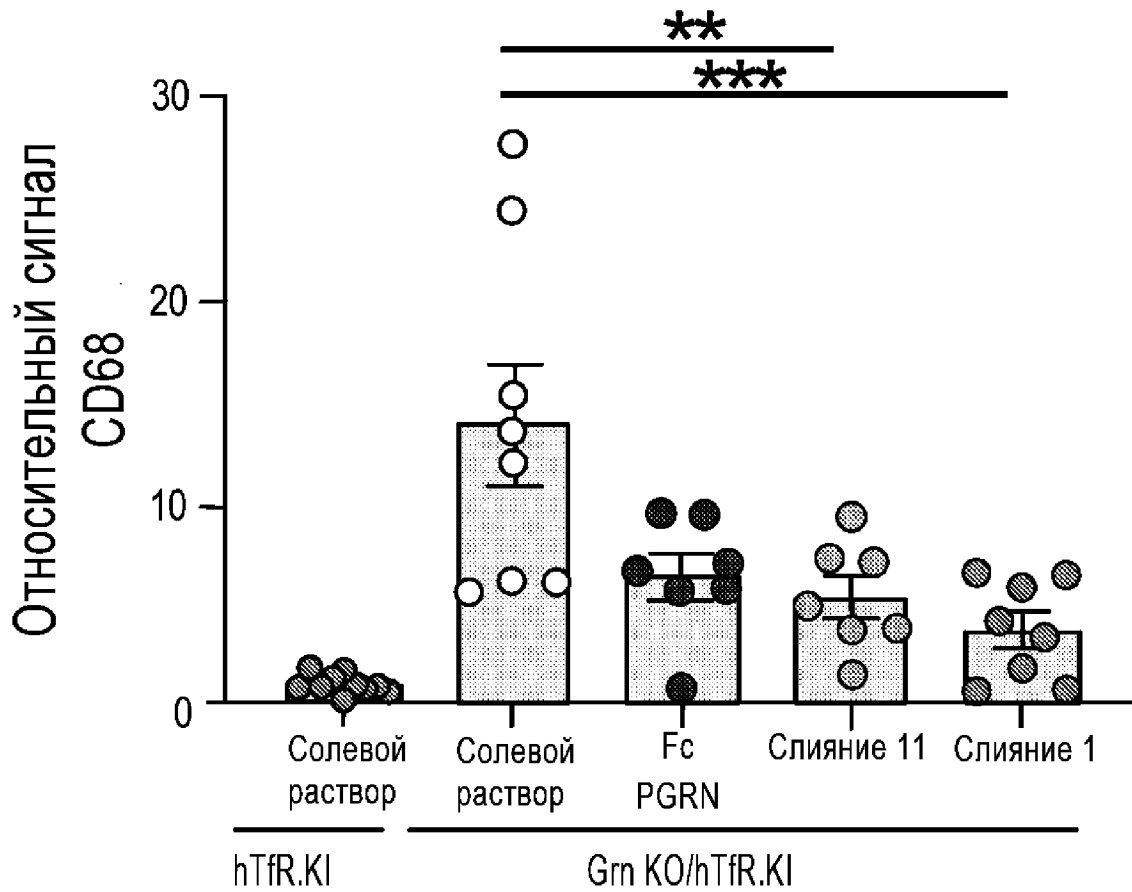
Фиг. 22



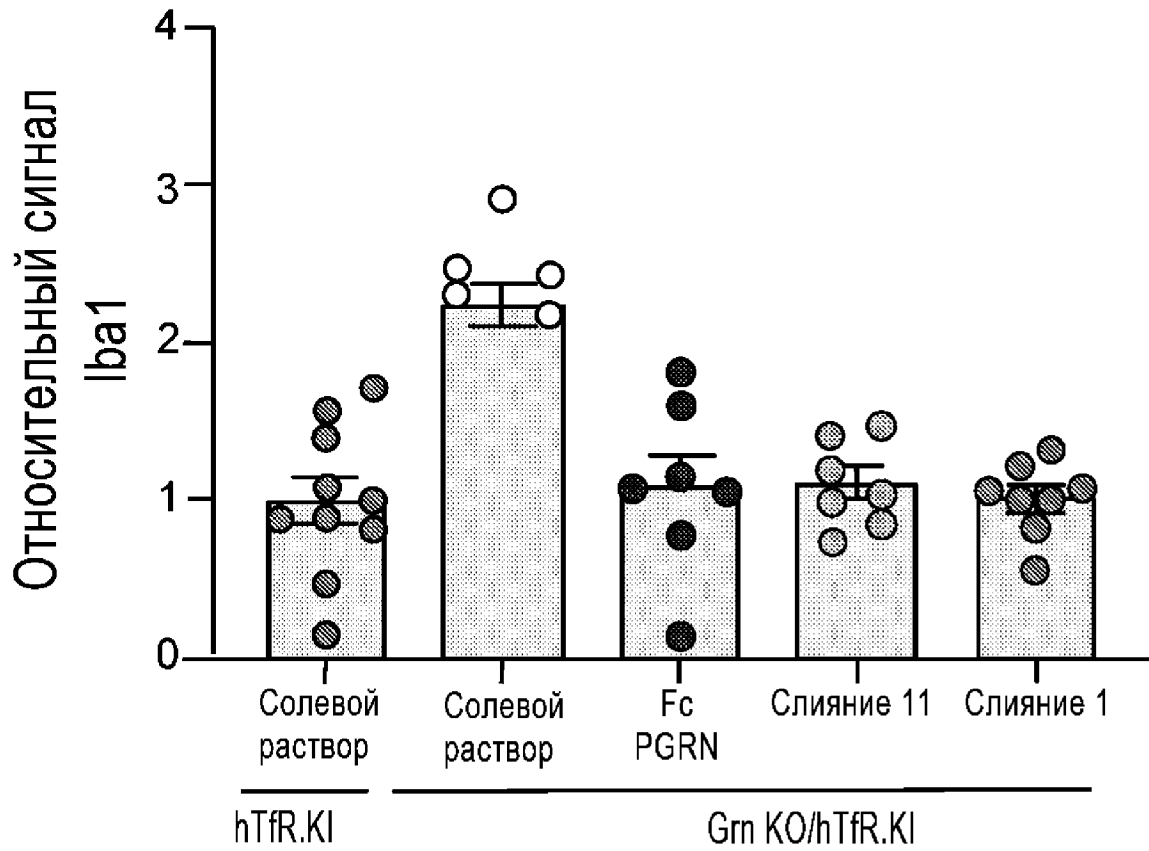
Фиг. 23



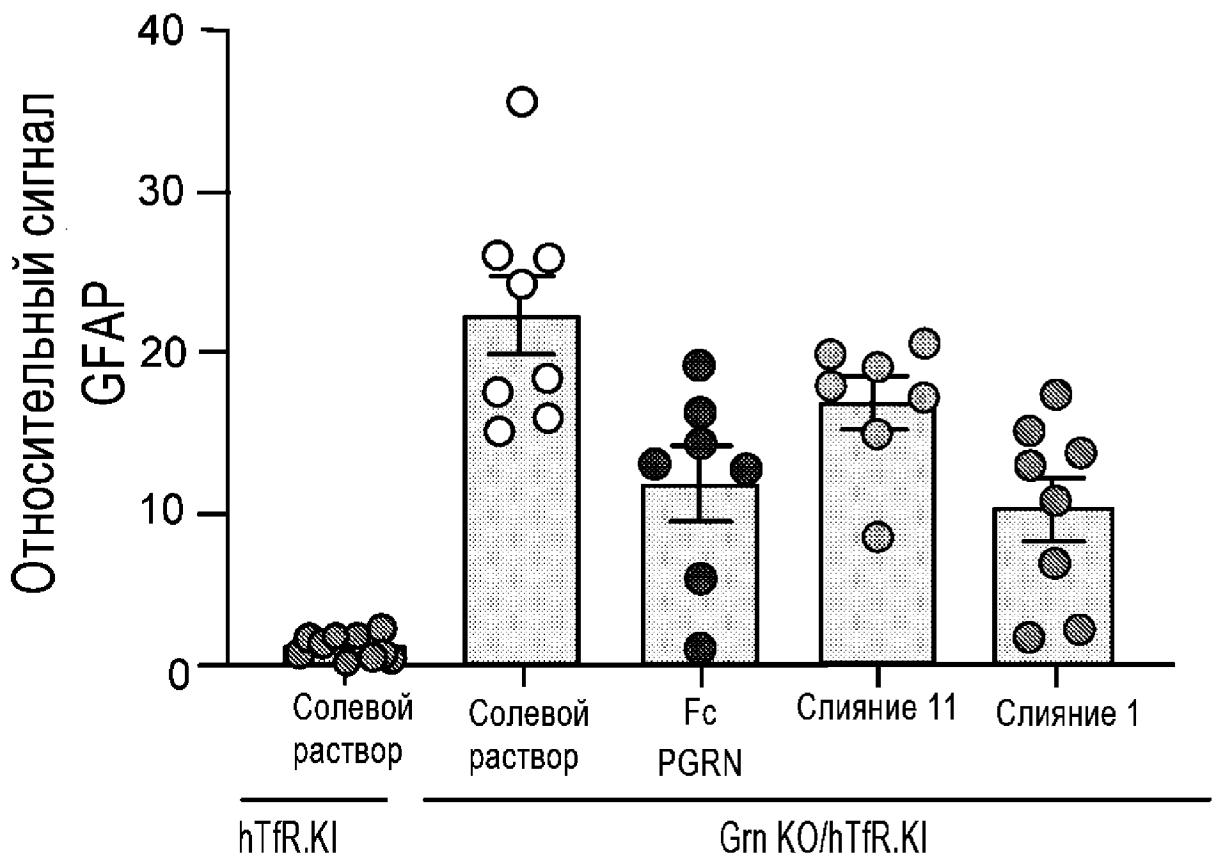
Фиг. 24



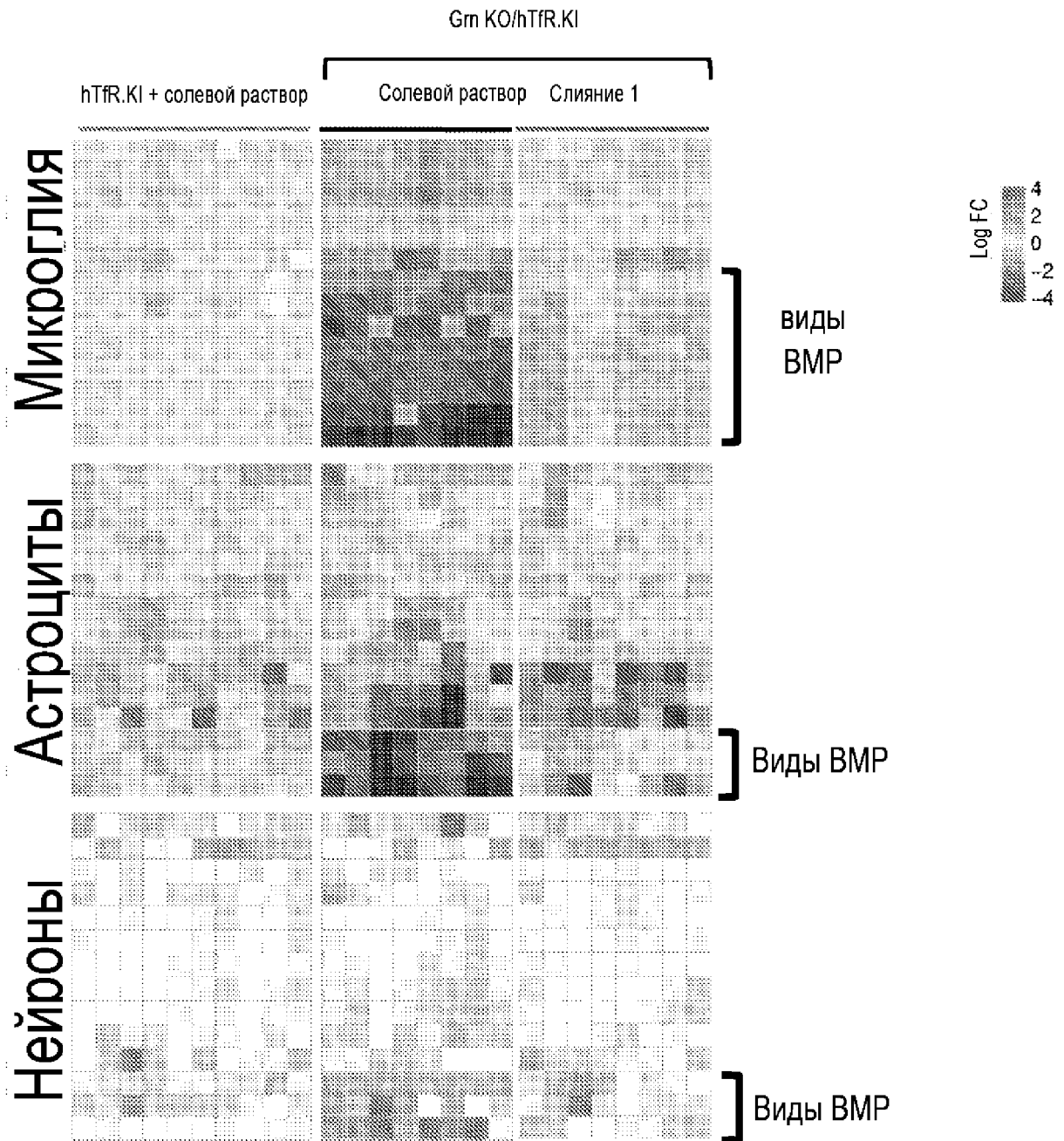
Фиг. 25



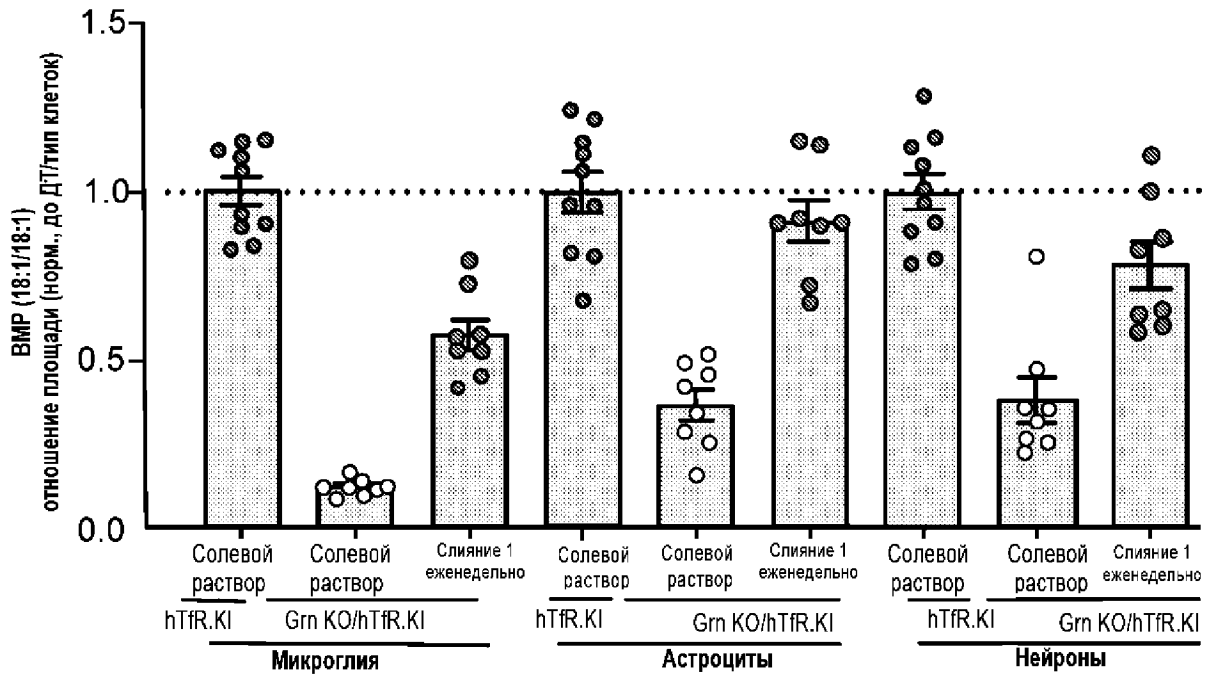
Фиг. 26



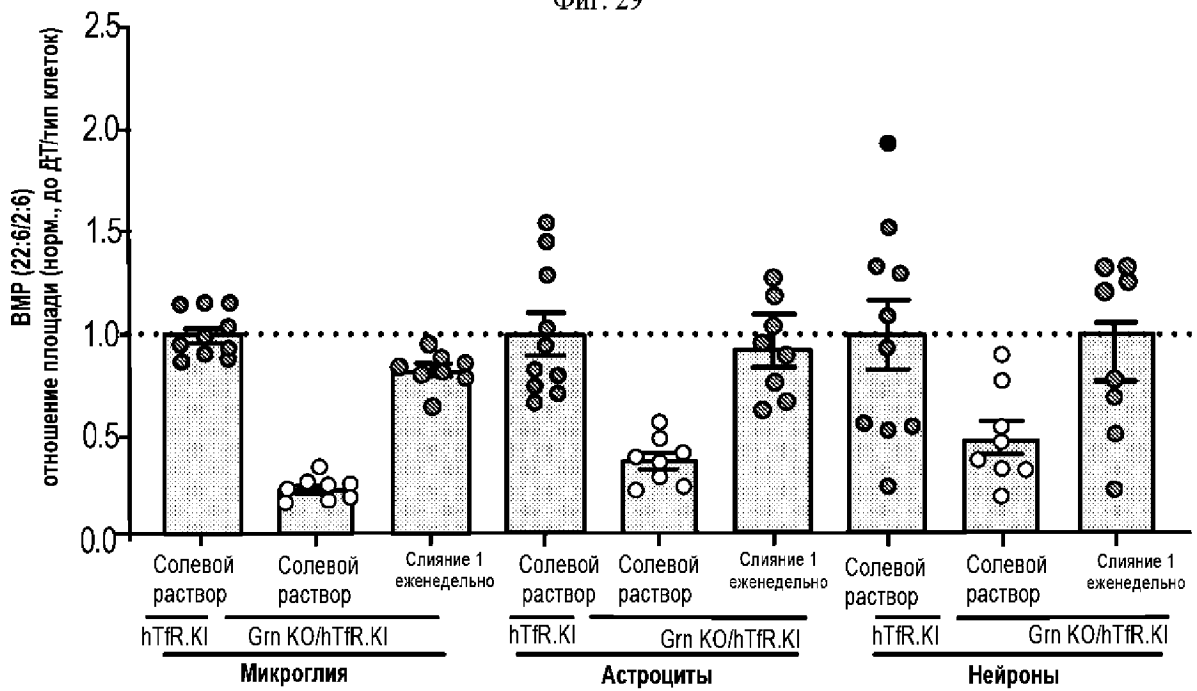
Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30

