

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042608**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.03

(21) Номер заявки
201892554

(22) Дата подачи заявки
2017.05.10

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(54) МУТАНТ CD200 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **1608197.8**

(32) **2016.05.10**

(33) **GB**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/GB2017/051303**

(87) **WO 2017/194941 2017.11.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЬЮСЕНТИС
БАЙОТЕРАПЬЮТИКС ЛТД. (GB)**

(72) Изобретатель:
**Хаксли Филип, Шеридан Джозеф, Хил
Джонатан (GB)**

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

(56) HATHERLEY DEBORAH ET AL.:
"Structures of CD200/CD200 Receptor Family
and Implications for Topology, Regulation, and
Evolution", STRUCTURE (CAMBRIDGE), vol.
21, no. 5, May 2013 (2013-05), pages 820-832,
XP002771147, ISSN: 0969-2126, page 825; figure 4B
WO-A2-0242332

DATABASE Geneseq [Online], 18 December
2001 (2001-12-18), "Novel human secretory protein,
Seq ID No 672.", XP002771148, retrieved from EBI
accession no. GSP:AAU28315, Database accession
no. AAU28315 sequence & WO 01/66689 A2
(HYSEQ INC [US]; TANG Y TOM [US]; LIU
CHENGHUA [US]; ASUNDI VINOD [US]), 13
September 2001 (2001-09-13)
US-A1-2005048069

WRIGHT G.J. ET AL.: "Characterization of
the CD200 receptor family in mice and humans and
their interactions with CD200", THE JOURNAL OF
IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION
OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 171, no. 6, 15
September 2003 (2003-09-15), pages 3034-3046,
XP002358035, ISSN: 0022-1767, page 3036, right-
hand column, paragraph 2, page 3035, right-hand
column

HATHERLEY DEBORAH ET AL.:
"Recombinant CD200 protein does not bind activating
proteins closely related to CD200 receptor",
JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 175, no.
4, August 2005 (2005-08), pages 2469-2474,
XP002771149, the whole document

(57) Изобретение в целом относится к мутантным белкам CD200, связывающимся с рецептором CD200 с более высокой аффинностью, чем CD200 дикого типа, в частности изобретение относится к мутантному белку CD200, содержащему мутацию в положении аминокислотного остатка 130 и/или 131. Настоящее изобретение также относится к слитому белку, содержащему белок, как определено в настоящем описании, слитый с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части, фармацевтической композиции, содержащей белок, как определено в настоящем описании, и их применению.

B1**042608****042608 B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к мутантным белкам CD200, связывающимся с более высокой аффинностью с рецептором CD200, чем CD200 дикого типа, в частности изобретение относится к мутантному белку CD200, содержащему мутацию в положении аминокислотного остатка 130 и/или 131. Настоящее изобретение также относится к слитому белку, содержащему белок, как определено в настоящем описании, слитый с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части, фармацевтической композиции, содержащей белок, как определено в настоящем описании, и их применению.

Предпосылки изобретения

Аутоиммунные заболевания являются второй по распространенности причиной хронических заболеваний в мире и основной причиной заболеваемости у женщин в США. Согласно международному исследованию 2008 года, хронически больные пациенты в США по сравнению с другими странами чаще остаются без надлежащего лечения по причине высоких расходов (Schoen, C. et al. (2008) *Health Affairs Web Exclusive*, w1-w16). Кроме того, более вероятно, что эти пациенты столкнутся с самыми высокими показателями медицинских ошибок, проблемами с координацией оказания помощи и высокими затратами на оказание помощи из собственных средств.

В настоящее время по оценкам American Autoimmune Related Disease Association (AARDA) 50 миллионов американцев страдают аутоиммунными заболеваниями. Эпидемиологических данных не хватает для определения полных прямых и косвенных затрат общей системы здравоохранения на аутоиммунные заболевания. Однако, в 2001 году директор National Institutes of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Dr. Anthony Fauci заявил, что ежегодные затраты на лечение аутоиммунных заболеваний превышают 100 миллиардов долларов. Хотя затраты в 100 миллиардов долларов внушают страх, это, вероятно, представляет собой огромное преуменьшение истинных затрат на аутоиммунные заболевания, так как ежегодные затраты только на семь из более чем 100 известных аутоиммунных заболеваний, болезнь Крона, язвенный колит, системную красную волчанку (SLE), рассеянный склероз (MS), ревматоидный артрит (RA), псориаз и склеродермию, оценивают по результатам эпидемиологических исследований всего в размере 51,8-70,6 миллиардов долларов ежегодно. Кроме того, в эти оценки не входят затраты на иммуносупрессивную терапию при трансплантации.

Аутоиммунные заболевания являются хроническими состояниями без возможности излечения, возникающими, когда иммунная система решает, что здоровые клетки являются чужеродными, и атакует их. В зависимости от типа, аутоиммунное заболевание может поражать один или множество различных типов тканей организма и может вызывать аномальный рост органов и изменения функционирования органов. Нормальная регуляция иммунной системы, в значительной степени, является результатом взаимодействия пар рецептор/лиганд, включающих белки, экспрессируемые клетками, участвующими в иммунном ответе. Однако эти пары рецептор/лиганд зачастую входят в каскады передачи сигнала, что является препятствием для лечения аутоиммунных заболеваний. Существующее лечение аутоиммунных заболеваний включает попытки контроля процесса заболевания и снижения симптомов, особенно в течение обострений.

Мембранный гликопротеин OX-2, также названный CD200 (кластер дифференцировки 200), является белком человека, кодируемым геном CD200, экспрессирующимся во множестве типов клеток (Barclay, A. N. (1981) *Immunology* 44, 727) и имеющим высокую степень гомологии с молекулами семейства иммуноглобулиновых генов. Белок, кодируемый этим геном, является мембранным гликопротеином типа 1, содержащим два иммуноглобулиновых домена и связывающимся с рецептором CD200 (CD200R).

CD200R экспрессируется на миелоидных клетках (моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и эозинофилах) и Т-клетках (Wright, et al. (2000), *Immunity* 12, 233-242; Wright, et al. (2003), *J. Immunol.*, 171, 3034-3046).

Связывание CD200 с CD200R вызывает передачу ингибиторного сигнала в миелоидные клетки и Т-клетки, таким образом, проявляя иммуносупрессорный эффект в отношении врожденной и адаптивной частей иммунной системы (Rahim S.A. (2005) *AIDS*, 19, 1907-1925; Shiratori, I. (2005) *J. Immunol.*, 175, 4441-4449; Misstear, K., et al. (2012), *Journal of Virology*, 86(11), 6246-6257).

Показано, что агонисты CD200R снижают патологию в широком диапазоне моделей заболеваний, например, артрита (Gorczyński, et al. (2001) *Clin. Immunol.* 101, 328-34; Gorczyński, et al. (2002) *Clin. Immunol.* 104, 256-264), отторжения трансплантата (Gorczyński, et al. (2002) *Transplantation* 1948-1953), неудачной беременности (Gorczyński, et al. (2002) *Am. J. Reprod. Immunol.*, 48, 18-26), контактной гиперчувствительности (Rosenblum, et al. (2004) *Blood* 2691-8), вызванного вирусом гриппа воспаления легких (Snelgrove, et al. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1074-1083) и HSV-индуцированного воспалительного повреждения (Sarangi, et al. (2009) *Clin. Immunol.* 131, 31-40).

Кроме того, у мышей CD200^{-/-}, которым вводили вирус гриппа, развивалось более тяжелое заболевание, ассоциированное с повышенной инфильтрацией легких и повреждением эндотелия легких по сравнению с контролями дикого типа (Rygiel, T.P., et al. (2009) *J. Immunol.* 183(3), 1990-1996). У мышей CD200^{-/-} развивались иммунные ответы, которые могли контролировать вирусную нагрузку, что позволяет предполагать, что тяжелое заболевание было вызвано чрезмерным иммунным ответом. Заболевание

можно было предотвращать посредством истощения Т-клеток перед заражением вирусом, несмотря на значительно повышенную возникшую вирусную нагрузку. Rygiel. T.P., et al. (2009) делали вывод о том, что Т-клетки необходимы для манифестации симптомов заболевания при гриппе, и что отсутствие нисходящей модулирующей передачи сигнала CD200-CD200R, а не вирусная нагрузка, усиливает иммунную патологию.

Профилирующие исследования показали, что экспрессия hCD200 отрицательно регулируется в различных популяциях пациентов, таких как пациенты с рассеянным склерозом (Koning, et al. (2007) *Ann.Neurol.* 62, 504-514), обострением астмы (Aoki, et al. (2009) *Clin.Exp. Allergy* 39, 213-221), болезнью Альцгеймера (Walker, et al. (2009) *Exp. Neurol.* 215, 5-19), первичной гипертрофической остеоартропатией (Ren, et al. (2013) *Rheumatol. Int.* 33(10), 2509-2512), неудачной беременностью (Clark (2009) *Am. J. Reprod. Immunol.* 61, 75-84) и плоским фолликулярным лишаем (облысением) (Harries, et al. (2013) *J. Pathol.* 231(2), 236-247).

Агонисты белков CD200 описаны, например, в WO 2000/061171 и WO 2008/089022. В литературе описано применение молекул CD200 дикого типа для модуляции функций иммунных клеток. Настоящее изобретение относится к мутантным белкам CD200, связывающимся с рецептором CD200 с более высокой аффинностью, чем CD200 дикого типа.

Таким образом, существует потребность в обеспечении улучшенной клинической эффективности при более низких дозах, что позволит преодолеть проблемы, связанные с доступным в настоящее время лечением аутоиммунных заболеваний.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к мутантному белку CD200, содержащему мутацию в положении аминокислотного остатка 130 и/или 131.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему белок, как определено в настоящем описании, слитый с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему белок, как определено в настоящем описании.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белок, как определено в настоящем описании.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к белку, как определено в настоящем описании, или композиции, как определено в настоящем описании, для применения в лечении аутоиммунного заболевания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: гели после электрофореза в присутствии SDS с WT-CD200-FC, K130Y и I131Y.

Фиг. 2: А: эксклюзионная хроматография K130Y; В: эксклюзионная хроматография I131Y.

Фиг. 3: иммобилизация антитела против Fc человека на поверхности сенсорного чипа.

Фиг. 4: фиксация герцептина и ассоциация/диссоциация hCD200R.

Фиг. 5: А: сенсограмма, на которой показаны фазы ассоциации и диссоциации связывания CD200R с зафиксированным CD200 дикого типа; В: сенсограмма, на которой показаны фазы ассоциации и диссоциации связывания CD200R с зафиксированным K130Y.

Фиг. 6: результаты исследования зависимости от дозы, в котором сравнивали ингибирование стимулированного РМА окислительного взрыва в выделенных нейтрофилах человека посредством CD200-FC дикого типа и K130Y.

Подробное описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к мутантному белку CD200, содержащему мутацию в положении аминокислотного остатка 130 и/или 131. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутации во внеклеточном домене CD200 в этих конкретных аминокислотных остатках приводят к получению мутантного CD200 с повышенной аффинностью связывания с рецептором CD200 (CD200R). Кроме того, мутантные белки CD200, как представлено в настоящем описании, обладают значительными преимуществами, в частности, в отношении лечения с большей клинической эффективностью и в более низких дозах.

В рамках изобретения термин "белок CD200" относится к белку CD200 дикого типа.

В рамках изобретения термин "дикий тип" относится к белкам, пептидам, аминокислотным и нуклеотидным последовательностям, встречающимся в природе. Например, в рамках изобретения термин "белок CD200 дикого типа" относится к любой полноразмерной изоформе CD200 (UNIPROT P41217 OX2G_HUMAN; SEQ ID NO: 1) или любой ее части, связывающейся с рецептором CD200. Белок CD200 также известен как мембранный гликопротеин OX-2.

CD200 дикого типа является белком поверхности клетки, имеющим N-концевой внеклеточный домен и короткий трансмембранный и цитоплазматический домены. Внеклеточный домен связывается с рецепторами-мишенями, такими как рецептор CD200. В одном из вариантов осуществления белок CD200 представляет собой внеклеточный домен CD200 или любую его часть, связывающуюся с рецептором CD200. В дополнительном варианте осуществления белок CD200 представляет собой внеклеточный до-

мен (SEQ ID NO: 2) CD200 дикого типа, который в полноразмерном белке, включающем сигнальную последовательность, начинается с глутамина в положении +31 и заканчивается лизином в положении +231 (SEQ ID NO: 1).

В рамках изобретения термин "положение" относится к номеру остатка в аминокислотной последовательности, где 1 является первой транслируемой аминокислотой.

В рамках изобретения термин "мутантный" или "мутация" относится к белкам, пептидам, аминокислотным и нуклеотидным последовательностям, подвергнувшимся изменению по своей форме с эквивалента дикого типа в мутантный. Например, мутантный белок может подвергаться изменению в аминокислотной и/или нуклеотидной последовательности по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, такое изменение также можно обозначать как мутацию.

Распространенные мутации включают замены, делеции, добавления, укорочения, транслокации и инверсии. Таким образом, в одном из вариантов осуществления мутация является заменой, транслокацией или инверсией. В дополнительном варианте осуществления мутация является заменой. В дополнительном варианте осуществления указанная замена представляет собой K130Y и/или I131Y.

Специалисту в этой области будет понятно, что мутацию в нуклеотидной последовательности, не изменяющую аминокислотную последовательность, все равно будут рассматривать как мутацию. Таким образом, мутацию в нуклеотидной последовательности, не изменяющую аминокислотную последовательность, все равно будут рассматривать как мутацию.

В рамках изобретения термин "мутантный белок CD200", относится к полноразмерному белку CD200 или любым его частям, связывающимся с рецептором CD200, содержащему мутантный аминокислотный остаток или множество мутантных аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности таким образом, что он является схожим, но уже не идентичным белку CD200 дикого типа.

В одном из вариантов осуществления мутантный белок CD200 можно получать синтетически или рекомбинантно. В дополнительном варианте осуществления мутантный белок CD200 можно получать синтетически. В альтернативном варианте осуществления мутантный белок CD200 можно получать рекомбинантно.

В одном из вариантов осуществления мутантный белок CD200 связывается с рецептором CD200 с более высокой аффинностью, чем CD200 дикого типа.

В одном из вариантов осуществления мутантный белок CD200 может содержать биологически или химически активный не-CD200 компонент или может быть присоединенным к нему.

В одном из вариантов осуществления мутантный белок CD200 может являться растворимым (т.е. циркулирующим) или связанным с поверхностью. В дополнительном варианте осуществления мутантный белок CD200 является растворимым. В альтернативном варианте осуществления мутантный белок CD200 связан с поверхностью.

В одном из вариантов осуществления мутантный белок CD200 может включать целый внеклеточный домен CD200 или его части.

В рамках изобретения термин "часть" со ссылкой на белки, пептиды и аминокислотные и нуклеотидные последовательности относится к фрагментам и производным, являющимся функциональными, т.е. связывающимся со своей мишенью.

В рамках изобретения термин "фрагмент" относится к части белка, пептида, аминокислотной или нуклеотидной последовательности, распознающей и связывающейся со своей мишенью, такой как рецептор.

В рамках изобретения термин "производное" и "мутант" относится к белку, пептиду, аминокислотной или нуклеотидной последовательности, имеющей по меньшей мере 70% (например, 75, 80, 85, 90, 95 или 99%) сходства последовательности с эквивалентом дикого типа и функционирующей подобно ему. Таким образом, мутант может являться производным эквивалента дикого типа. В дополнительном варианте осуществления мутантный белок CD200 является частью внеклеточного домена CD200 дикого типа, начинающейся с глутамина в положении +31 и заканчивающейся лизином в положении +231.

В рамках изобретения термин "аминокислотный остаток" относится к мономерной единицей в полимерной цепи, т.е. одной аминокислотой в белке.

В одном из вариантов осуществления белок дополнительно содержит одну или более мутаций, присутствующих в аминокислотной последовательности, например, 1-15 мутаций.

В дополнительном варианте осуществления указанный мутантный белок содержит одну или более дополнительных мутаций, таких как мутации, выбранные из G129I, F128R и/или N81K.

В одном из вариантов осуществления белок, как определено в настоящем описании, содержит внеклеточный домен (ECD) указанного белка. В дополнительном варианте осуществления белок, как определено в настоящем описании, содержит последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов осуществления белок, как определено в настоящем описании, содержит полноразмерную последовательность CD200. В дополнительном варианте осуществления белок, как определено в настоящем описании, содержит последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

Как показано на фиг. 5 и в табл. 2, мутантные белки CD200, представленные в настоящем описании, сильнее связываются с рецептором CD200 и демонстрируют большее время удержания на рецепторе, чем

белок CD200 дикого типа.

Слитый белок.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему белок, как определено в настоящем описании, слитый с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части.

В рамках изобретения термин "слитый белок" относится к одной или более аминокислотным последовательностям, пептидам и/или белкам, соединенным способами, хорошо известными в этой области и описанными, например, в патентах США № 5434131 и 5637481. Соединенные аминокислотные последовательности, пептиды или белки, таким образом, образуют один слитый белок.

В одном из вариантов осуществления белок по настоящему изобретению подвергают слиянию на N- или C-конце с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части. В дополнительном варианте осуществления белок по настоящему изобретению подвергают слиянию на N-конце с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части. В альтернативном варианте осуществления белок по настоящему изобретению подвергают слиянию на C-конце с не-CD200 белок-кодирующей частью посредством необязательной линкерной части.

В одном из вариантов осуществления указанная линкерная часть является пептидом, содержащим от 1 до 15 аминокислот. В дополнительном варианте осуществления линкер является линкером из 10 аминокислот, начинающимся с глицина и заканчивающимся серином. В дополнительном варианте осуществления изобретения линкер является пептидом, содержащим последовательность GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11).

В рамках изобретения термин "не-CD200 белок-кодирующая часть" относится к любому пептиду или белку, не связывающемуся с рецептором CD200 и не мешающим связыванию CD200 с его мишенью. Неограничивающие примеры включают константную область иммуноглобулина (Ig) или ее часть.

В дополнительном варианте осуществления указанная не-CD200 белок-кодирующая часть является антителом или его фрагментом. В дополнительном варианте осуществления указанная не-CD200 белок-кодирующая часть является Fc-фрагментом. Таким образом, мутантный слитый белок CD200, как представлено в настоящем описании, также можно обозначать как мутант CD200-Fc. В дополнительном варианте осуществления Fc-фрагмент получают из млекопитающего, такого как человек или обезьяна, например, C(гамма)1 человека, включающий шарнирную области, области CH2 и CH3. Считают, что Fc-фрагмент обеспечивает преимущество, состоящее в повышении времени полужизни (т.е. занятости рецептора) мутантных белков CD200 по изобретению. Специалисту в этой области будет понятно, что Fc-область можно подвергать мутагенезу для снижения ее эффекторных функций (см., например, патенты США № 5637481 и 6132992).

Так как мутантные белки CD200 имеют более высокую аффинность для рецептора CD200 по сравнению с белками CD200 дикого типа или немутантными белками CD200, как представлено в настоящем описании на фиг. 5 и в табл. 2, любая слитая не-CD200 белок-кодирующая часть также получит преимущества благодаря этому признаку. Это приносит значительную пользу в отношении фармацевтических композиций и терапевтических средств, как представлено в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления слитый белок, как определено в настоящем описании, содержит последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

Белки по настоящему изобретению, предпочтительно, получают способами рекомбинантной ДНК посредством встраивания последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный белок CD200 или любую его часть, в рекомбинантный экспрессирующий вектор и экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты в рекомбинантной системе экспрессии в условиях, способствующих экспрессии. Таким образом, в одном из вариантов осуществления полинуклеотид, кодирующий слитый белок, дополнительно содержит вектор, такой как pcDNA 3.4. В одном из вариантов осуществления слитый белок фланкирован одним или более участками распознавания ферментов рестрикции, таких как Hind III и/или Xho I. В дополнительном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий слитый белок, фланкирован участками рестрикции Hind III и Xho I.

В одном из вариантов осуществления слитый белок содержит один или более участков распознавания ферментов рестрикции, таких как Bam HI.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему белок, как определено в настоящем описании. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие белки по настоящему изобретению, можно собирать из фрагментов кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или серии олигонуклеотидов для получения синтетического гена, который можно встраивать в рекомбинантный экспрессирующий вектор и экспрессировать в рекомбинантной транскрипционной единице.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы включают синтетические или полученные из кДНК фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие мутантный CD200, функционально связанные с подходящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, полученными из генов млекопитающего, микроорганизма, вируса или насекомого. Такие регуляторные элементы включают транскрипционный промотор, необязательную последовательность оператора для контроля транскрип-

ции, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосомы на мРНК, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Дополнительно можно включать способность реплицироваться в хозяине, как правило, придаваемую участком начала репликации, и селективный ген для облегчения определения трансформантов.

Терапевтическое применение.

Настоящее изобретение имеет конкретное применение в терапии, так как взаимодействие между белком CD200 и рецептором CD200 отличается высокой скоростью "прямой реакции" и высокой скоростью диссоциации ("обратной реакции"), что, в свою очередь, снижает аффинность CD200 к рецептору CD200. Таким образом, повышение аффинности мутантного белка CD200 к рецептору CD200, как представлено в настоящем описании, можно использовать в производстве фармацевтических композиций с более сильными свойствами.

Кроме того, производственные затраты в случае рекомбинантных белков высоки, и мутантный белок CD200, имеющий более высокую аффинность, можно использовать в фармацевтических композициях в значительно более низких дозах, чем CD200 дикого типа или не-мутантный белок CD200, для достижения терапевтического эффекта. Применение мутантного белка CD200, таким образом, может быть экономически более эффективным, а также клинически более эффективным.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белок, как определено в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления мутантный белок CD200, как определено в настоящем описании, является модулятором рецептора CD200. В рамках изобретения термин "модулятор" относится к веществу, приводящему к кинетическому изменению, например, модулятор белка может приводить к повышению или снижению активности указанного белка. Что касается свойств мутантных белков CD200 по изобретению, считают, что они являются агонистами рецептора CD200 и, таким образом, найдут применение в лечении аутоиммунного заболевания. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления мутантный белок CD200, как определено в настоящем описании, является агонистом рецептора CD200.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к белку, как определено в настоящем описании, или композиции, как определено в настоящем описании, для применения в лечении аутоиммунного заболевания.

Слитые белки, содержащие мутантные белки CD200, определенные в настоящем описании, могут дезактивировать активированные иммунные клетки с более высокой эффективностью, чем слитые белки, содержащие CD200 дикого типа или не-мутантные белки CD200.

В одном из вариантов осуществления аутоиммунное заболевание выбрано из аутоиммунных заболеваний, поражающих нервно-мышечную систему, сосудистую систему, глаз, пищеварительный тракт, легкие, почки, печень, периферическую или центральную нервную систему, кости, хрящи или суставы.

В дополнительном варианте осуществления аутоиммунное заболевание является одним или более аутоиммунными заболеваниями, выбранными из: острого диссеминированного энцефаломиелита (ADEM); острого некротизирующего геморрагического лейкоэнцефалита; болезни Аддисона; агаммаглобулинемии; гнездовой алопеции; амилоидоза; анкилозирующего спондилита; нефрита против GBM/против TBM; антифосфолипидного синдрома (APS); аутоиммунного ангионевротического отека; аутоиммунной апластической анемии; аутоиммунной дизавтономии; аутоиммунного гепатита; аутоиммунной гиперлипидемии; аутоиммунного иммунодефицита; аутоиммунного заболевания внутреннего уха (AIED); аутоиммунного миокардита; аутоиммунного оофорита; аутоиммунного панкреатита; аутоиммунной ретинопатии; аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры (ATP); аутоиммунного заболевания щитовидной железы; аутоиммунной крапивницы; аксональной и нейрональной невропатии; болезни Бало; болезни Бехчета; буллезного пемфигоида; кардиомиопатии; болезни Кастлемана; целиакии; болезни Шагаса; хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии (CIPD); хронического рецидивирующего множественного остеомиелита (CRMO); синдрома Чарга-Стросса; рубцующегося пемфигоида/доброкачественного пемфигоида слизистой оболочки; болезни Крона; синдрома Когана; болезни Холодовых агглютининов; врожденной блокады сердца; миокардита Коксаки; CREST-синдрома; первичной криоглобулинемии смешанного типа; демиелинизирующей невропатии; герпетического дерматита; дерматомиозита; болезни Девика (нейромиелита зрительного нерва); дискоидной волчанки; синдрома Дресслера; эндометриоза; эозинофильного эзофагита; эозинофильного фасцита; нодозной эритемы; экспериментального аллергического энцефаломиелита; синдрома Эвана; фиброзирующего альвеолита; гигантоклеточного артериита (височного артериита); гигантоклеточного миокардита; гломеруло-нефрита; синдрома Гудпасчера; гранулематоза с полиангиитом (GPA) (ранее известного как гранулематоз Вегенера); болезни Грейвса; синдрома Гийена-Барре; энцефалита Хашимото; тиреоидита Хашимото; гемолитической анемии; болезни Шенлейн-Геноха; герпеса беременных; гипогаммаглобулинемии; идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ITP); IgA-нефропатии; связанного с IgG4 склероза; иммунорегуляторных липопротеинов; миозита с тельцами включения; интерстициального цистита; ювенильного артрита; ювенильного диабета (диабета 1 типа); ювенильного миозита; синдрома Кавасаки; синдрома Ламберта-Итона; лейкоцитокластического васкулита; красного плоского лишая; склеротиче-

ского лишая; деревянистого конъюнктивита; линейного IgA-зависимого заболевания (LAD); системной красной волчанки (SLE); хронической болезни Лайма; болезни Менъера; микроскопического полиангиита; смешанного заболевания соединительной ткани (MCTD); язвы Мурена; болезни Мухи-Габерманна; рассеянного склероза; миастении; миозита; нарколепсии; нейромиеелита зрительного нерва (болезни Девика); нейтропении; рубцующегося пемфигоида глаза; неврита зрительного нерва; палиндромного ревматизма; PANDAS (педиатрических аутоиммунных психоневрологических расстройств, связанных со Streptococcus); паранеопластической дегенерации мозжечка; пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH); синдрома Парри-Ромберга; синдрома Персонейджа-Тернера; парспланита (периферического увеита); пемфигоида; периферической невропатии; перивенозного энцефаломиелита; пернициозной анемии; ROEMS-синдрома; нодозного полиартериита; аутоиммунных полигландулярных синдромов типа I, II и III; ревматической полимиалгии; полимиозита; постинфарктного синдрома; посткардиотомного синдрома; прогестеронового дерматита; первичного билиарного цирроза; первичного склерозирующего холангита; псориаза; псориазического артрита; идиопатического легочного фиброза; гангренозной пиодермии; истинной эритроцитарной аплазии; феномена Рейно; реактивного артрита; рефлекторной симпатической дистрофии; синдрома Рейтера; рецидивирующего полихондрита; синдрома беспокойных ног; ретроперитонеального фиброза; ревматической лихорадки; ревматоидного артрита; саркоидоза; синдрома Шмидта; склерита; склеродермии; синдрома Шегрена; аутоиммунитета к сперме и тестикулярного аутоиммунитета; синдрома скованного человека; подострого бактериального эндокардита (SBE); синдрома Сусака; симпатической офтальмии; артериита Такаясу; височного артериита/гигантоклеточного артериита; тромбоцитопенической пурпуры (ТТР); синдрома Толоса-Ханта; поперечного миелита; диабета 1 типа; язвенного колита; недифференцированного заболевания соединительной ткани (UCTD); увеита; васкулита; везикулобуллезного дерматоза; витилиго и гранулематоз Вегенера (в настоящее время называемого гранулематозом с полиангиитом (GPA)).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания у индивидуума, включающему введение белка по изобретению индивидууму, имеющему по меньшей мере одно аутоиммунное заболевание.

Следует понимать, что белок по изобретению можно вводить в качестве единственного терапевтического средства или его можно вводить в виде комбинированного лечения с одним или более другими соединениями (или терапевтическими средствами) для лечения аутоиммунного заболевания.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей белок, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами.

В случае лечения аутоиммунного заболевания белок по изобретению, предпочтительно, можно использовать в комбинации с одним или более другими лекарственными средствами, более конкретно, с одним или более иммуносупрессирующими средствами или адъювантами в иммуносупрессивной терапии.

Неограничивающие примеры других терапевтических средств, которые можно вводить вместе (одновременно или с различными временными интервалами) с соединениями по изобретению включают: азатиоприн; метотрексат; циклоспорин; моноклональные антитела (басиликсимаб, даклизумаб и муромонаб) и кортикостероиды.

Каждое из терапевтических средств, присутствующих в комбинациях по изобретению, можно вводить индивидуально по различным схемам введения и разными путями. Кроме того, дозировка каждого из двух или более средств может отличаться: каждое из них можно вводить одновременно или в разное время. Специалисту в этой области будут понятны схемы введения доз и способы комбинированного лечения для применения. Например, белок по изобретению можно использовать в комбинации с одним или более другими средствами, вводимыми в соответствии с существующими комбинированными схемами лечения.

Как правило, белки, представленные в настоящем описании, будут применять в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми эксципиентами или носителями. Как правило, эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и/или забуференные среды. Парентеральные наполнители включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, декстрозу и хлорид натрия и лактат Рингера. Подходящие физиологически приемлемые адъюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, можно выбирать из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может являться любым из путей, известных специалистам в этой области. В случае терапии, включающей, в качестве неограничивающих примеров, иммунотерапию, белки по изобретению можно вводить любому пациенту стандартными способами. Введение можно осуществлять любым способом, в том числе парентерально, внутривенно, внутримышечно, интраперитонеально, трансдермально, легочно или также, соответствующим образом, посредством прямой инфузии с использованием катетера. Доза и частота введения будут зависеть от пола, возраста и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопо-

казаний и других параметров, учитываемых лечащим врачом.

Белки по изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в подходящем носителе перед использованием. Показано, что этот способ эффективен, и можно использовать известные в этой области способы лиофилизации и восстановления. Специалисту в этой области следует понимать, что лиофилизация и восстановление могут приводить к разным степеням утраты активности, что может потребовать коррекции уровней в сторону повышения.

В следующих исследованиях и протоколах проиллюстрированы варианты осуществления способов, представленных в настоящем описании.

Пример 1.

Производство мутантных молекул CD200-FC и молекул CD200-FC дикого типа.

Синтез гена.

Последовательность ДНК, кодирующую остатки 1-231 мутантного CD200 или CD200 дикого типа человека из Uniprot P412178 (OX2G_Human), включающую N-концевую сигнальную последовательность, подвергали слиянию на С-конце с Fc IgG1, остатками 99-330 из P01857 (IHG1_Human) с линкерной последовательностью GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11) между 2 доменами белка. Синтез гена осуществляли в GeneArt для конструкций дикого типа и мутантных конструкций.

Экспрессирующие конструкции получали с использованием экспрессирующего вектора млекопитающего pcDNA3.4 с 5' Hind III и 3' Xho. Внутренний участок Bam HI встраивали для облегчения замены доменов Fc.

Препарат в мици-формате.

После получения лиофилизированные конструкции ДНК для целевых белков CD200-FC (белков CD200-FC дикого типа и мутантных белков CD200-FC) суспендировали в 50 мкл MQ и трансформировали клетки DH5 α . Выбирали одну колонию для каждого целевого белка и инокулировали ее в 5,0 мл LB, содержащего ампициллин. Затем выделяли ДНК из 2,0 мл культуры для подтверждения и анализировали посредством электрофореза в агарозном геле. Конструкции подтверждали посредством расщепления ДНК с использованием Hind III и XhoI. Каждую мутантную конструкцию или конструкцию дикого типа культивировали в 100 мл LB для получения препарата ДНК в мици-формате. ДНК выделяли с использованием набора PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit.

Экспрессия белка.

Целевые белки CD200-Fc получали с использованием системы экспрессии Thermo Fisher Gibco™ ExpiCHO™ по инструкциям производителя для объема культуры 25 мл. Собирали супернатант сред, содержащий экспрессируемый CD200-FC, и хранили его при -80°C перед дальнейшим использованием.

Очистка белка.

Осуществляли замену буфера с использованием обессоливающей колонки HiPrep (ХК26/10), упакованной 53 мл SephadexG25, для кондиционирования сред для очистки на аффинной колонке. Обессоливающие колонки уравнивали буфером А (150 мМ NaCl, содержащего 20 мМ фосфат натрия, pH 7,4) с использованием платформы AKTA Explorer. 30 мл очищенных сред для культивирования наносили на две обессоливающие колонки, соединенные последовательно, со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали со скоростью 2 мл/мин и собирали фракции. Объединяли фракции, демонстрирующие максимальное поглощение и pH 7,4-7,2. Исключали фракции, имеющие более низкий pH. После обессоливания образцы разводили для получения приблизительно 45 мл супернатанта CD200-FC дикого типа или мутантного CD200-FC. Всю очистку осуществляли на льду при 4°C.

Колонку промывали 10 объемами колонки буфера А (10 мл 20 мМ фосфата натрия, pH 7,4, 150 мМ NaCl). Белок CD200-FC элюировали при градиенте pH 7,4-3,5 с использованием 10 объемов колонки с использованием 20 мМ фосфата натрия pH7,4, 150 мМ NaCl и 100 мМ цитратного буфера, pH 3,5, с линейным градиентом. Выделяли фракции CD200-FC, содержащие димерную форму белка массой 140 кДа, учитывая данные электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. Буфер белка заменяли с использованием фильтра Amicon Ultra Centricon с отсечкой по 10 кДа и концентрировали белок до 1 мг/мл.

На фиг. 1 показаны гели SGS для CD200-FC дикого типа, K130Y и I131Y. Перед осуществлением анализа связывания использовали эксклюзионную хроматографию для демонстрации того, что полученные белки CD200-FC не образовывали агрегаты в растворе (фиг. 2).

Пример 2.

Анализ связывания молекул CD200-FC дикого типа и мутантных молекул CD200-FC.

Эксперименты с использованием анализа Biacore осуществляли в Syngene International Ltd. (Biocon Park, Plot No 2&3, Bommasandra Industrial Area, Bommasandra-Jigani Link Road, Bangalore - 560099, India).

Принципы анализа.

В устройстве BIAcore используют оптический способ, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), для измерения характеристик связывания двух взаимодействующих молекул; в этом случае, связывания CD200-FC дикого типа или мутантов CD200-FC с рецептором CD200 (CD200R). Этим способом измеряют изменения коэффициента преломления одной из двух взаимодействующих молекул, зафиксированных на чипе (сенсоре), когда вторая молекула протекает в растворе относительно зафиксированного

партнера по связыванию. В этих экспериментах CD200-FC иммобилизовали на поверхности чипа (сенсора) и инъецировали CD200R в водный буфер относительно зафиксированного CD200-FC в условиях непрерывного потока. Изменения коэффициента преломления в случае CD200-FC после связывания CD200R измеряли в реальном времени и строили график результатов в виде единиц ответа (RU) относительно времени для получения сенсограмм (фиг. 5А и 5В).

Устройство и реагенты.

Эксперименты осуществляли с помощью GE Healthcare BIAcore T200. В табл. 1 приведены реагенты, используемые в осуществлении анализа.

Таблица 1
Реагенты, используемые для экспериментов с помощью анализа BIAcore

Sl. No.	Описание продукта	Поставщик	Кат. №
1	Набор для фиксации антитела человека	GE Healthcare	BR1008-39
2	Рекомбинантный CD200R человека с His-меткой	Creative Biomart	CD200R1-320H
3	Рекомбинантный CD200R человека с Fc-меткой	Creative Biomart	CD200-165H
4	Рекомбинантный белок CD200 мыши, Fc-химера	Creative Biomart	CD200-982M
5	Трастузумаб	Roche	N/A

Иммобилизация CD200-FC.

Антитело против Fc человека ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе BIAcore CM5 посредством присоединения по аминогруппе с использованием набора GE Healthcare по инструкциям производителя. За целевую максимальную иммобилизацию принимали 10000-15000 RU. На фиг. 3 показана фиксация антитела против Fc человек на поверхности чипа. Проточную кювету 1 без иммобилизованного лиганда использовали в качестве референса для осуществления вычета неспецифического связывания на поверхности чипа. Fc-лиганды разводили до 0,5 мкг/мл в подвижном буфере BIAcore (HBS-EP+: 10 mM забуференный HEPES физиологический раствор, содержащий 2 mM ЭДТА и 0,05% поверхностно-активного вещества P-20). На конечной стадии иммобилизации CD200-FC дикого типа, мутантным CD200-FC и неродственным контрольным белком (герцептином/трастузумабом) омывали чип (с использованием проточных кювет 2, 3 и 4 соответственно) в течение 120 с в концентрации, приводящей минимум к 250 единицам ответа (RU), с последующей стабилизацией поверхности в подвижном буфере в течение 120 с. Фиксацию CD200-FC повторяли для каждой концентрации CD200R. На фиг. 4 показано, что, как и ожидали, рецептор CD200 не связывался с герцептином, иммобилизованным на поверхности чипа.

Омывание поверхности CD200-Fc-связанного чипа с помощью CD200R.

После фиксации Fc-меченых белков CD200R (в различных концентрациях) омывали фиксированный CD200-FC и контрольные белки в течение 120 с (для анализа ассоциации), а затем омывали подвижным буфером в течение 120 с (для анализа диссоциации). Затем поверхность чипа восстанавливали с использованием 10 mM глицина-HCl (pH 2) в течение 30 с (скорость потока 30 мкл/мин) с последующей стабилизацией поверхности в течение 60 секунд с использованием подвижного буфера BIAcore перед следующим циклом. Все концентрации CD200R анализировали в двух параллелях в следующих концентрациях: 1 мкМ, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6 и 0 нМ.

Анализ данных.

Результаты представлены в виде сенсограммы, построенной в виде зависимости единиц ответа или резонансных единиц (RU) от времени. Экспериментальные сенсограммы анализировали с использованием программного обеспечения BIAevaluation версии 1.0 (GE Healthcare). Аппроксимацию кривой осуществляли с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1. Уравнения скорости со стандартными параметрами (например, концентрации лиганда, времени) использовали для итеративной аппроксимации кривой. Точность аппроксимации определяли с помощью алгоритмов, предоставленных производителем в программном обеспечении BIAevaluation версии 1.0.

Результаты.

На фиг. 4 показано, что, как и ожидали, рецептор CD200 не связывался с герцептином, иммобилизованным на поверхности чипа. На фиг. 5 представлены сенсограммы для связывания рецептора CD200 с CD200-Fc дикого типа (фиг. 5А) и мутантом CD200-FC K130Y (фиг. 5В). Из сравнения сенсограмм на фиг. 5 очевидно, что K130Y связывается с рецептором CD200 с более высокой аффинностью и меньшей скоростью обратной реакции, чем CD200-FC дикого типа. В таблице 2 приведены скорости прямой реакции ($M^{-1}s^{-1}$), скорости обратной реакции (s^{-1}) и значения аффинности связывания (нМ) для молекул

CD200-FC дикого типа и мутантных молекул CD200-Fc: WT, K130Y, I131Y, G129I, F128R, N81K. Время полужизни вычисляли с использованием соотношения $t_{1/2}(M)=0,693/k_{off}(c^{-1})$.

Таблица 2

Скорости прямой реакции ($M^{-1}c^{-1}$), скорости обратной реакции (c^{-1}) и значения аффинности связывания (нМ) для мутантных молекул CD200-FC

SEQ NO:	ID	Мутация	Скорость прямой реакции ($M^{-1}c^{-1}$)	Скорость обратной реакции (c^{-1})	Аффинность (нМ)	$t_{1/2}$ (с)
SEQ NO: 5	ID	WT	2,4E+05	2,7E-02	111,00	25,6
SEQ NO: 6	ID	K130Y	4,0E+05	3,2E-03	8,07	216,6
SEQ NO: 7	ID	I131Y	1,8E+05	9,1E-03	49,00	76,6
SEQ NO: 8	ID	G129I	1,58 E 5	1,7E-02	108,00	40,8
SEQ NO: 9	ID	F128R	1,63E 5	1,8E-02	109	39,2
SEQ NO: 10	ID	N81K	2,07 E 5	2,1E-02	101	32,7

Пример 3.

Анализ с использованием функциональной клеточной модели.

Анализ окислительного взрыва был выполнен GVK Biosciences Private Limited (Campus MLR 1, Survey Nos. 125 & 126, IDA Mallapur, Hyderabad - 500076, India).

Окислительный взрыв измеряли в выделенных нейтрофилах человека с использованием коммерческого набора для проточной цитометрии (CAY601130, Cayman Chemicals, Michigan, 48108, USA) по инструкциям производителя. С помощью анализа количественно определяют окислительный взрыв посредством проточной цитометрии после инициации окислительного взрыва с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA). Окислительную активность измеряли с использованием дигидрородамина 123, проникающего в клетки нефлуоресцентного красителя, преобразующегося во флуоресцентное соединение родамин 123 под действием окислительной активности после стимуляции PMA. Образцы со стимуляцией PMA и без инкубации с CD200-Fc представляли собой положительный контроль. Образцы без стимуляции PMA служили в качестве отрицательного контроля.

Способ анализа.

Нейтрофилы человека выделяли из периферической крови посредством разделения фиколл-паком и осаждения декстраном. Клетки суспендировали в буфере для анализа (500 мл минимальной среды RPMI, 5 г BS и 500 мкл 1М хлорида кальция) в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37°C на водяной бане с референсной молекулой (CD200-FC дикого типа) или мутантами CD200-FC. Затем 10 мкл 10-кратного рабочего стока дигидрородамина 123 добавляли к клеткам, которые инкубировали в течение 15 мин при 37°C на водяной бане. Клетки стимулировали 200 нМ PMA (сток 1 мМ) и инкубировали еще в течение 45 мин при 37°C на водяной бане. После конечной стадии инкубации клетки центрифугировали (500×g) в течение 10 мин при комнатной температуре. Отбирали супернатант и ресуспендировали осадок в 0,5 мл буфера для анализа. Клетки анализировали посредством проточной цитометрии (BD FACSVerse, BD Biosciences, New Jersey, US). Строили график данных с использованием средней интенсивности флуоресценции клеток, обработанных только PMA, и сравнивали с клетками, обработанными PMA и тестируемыми соединениями (CD200-FC дикого типа или мутантом CD200-FC). Для анализа данных использовали GraphPad Prism версии 6.0.

Кластер нейтрофилов гейтировали с помощью программы для анализа с использованием прямого и бокового светорассеяния (FSC vs SSC) для обеспечения сбора данных о соответствующей популяции клеток. В конечном итоге, гистограммы флуоресценции анализировали для количественного определения эффекта белков CD200-FC дикого типа и мутантных белков CD200-FC в отношении окислительного взрыва.

Анализ данных.

CD200-Fc-опосредованное ингибирование окислительного взрыва измеряли с использованием формулы:

$$\text{Процент ингибирования} = 100 - (100 \times (\text{среднее значение для тестируемого соединения} - \text{среднее значение для отрицательного контроля}) / (\text{среднее значение для положительного контроля} - \text{среднее значение для отрицательного контроля})).$$

Значения в указанной выше формуле получают из значений средней интенсивности флуоресценции для гейтированной популяции клеток. Данные анализировали на статистическую значимость посредством

вом одностороннего ANOVA с поправкой Бонферрони для сравнения всех колонок.

Результаты.

В табл. 3 приведены значения средней интенсивности флуоресценции для гейтированной популяции клеток в случае CD200-Fc дикого типа, K130Y и положительные и отрицательные контроли. На фиг. 6 приведено сравнение эффектов CD200-Fc дикого типа и K130Y в анализе окислительного взрыва.

Из фиг. 6 очевидно, что мутант CD200-Fc K130Y ингибирует стимулированный РМА окислительный взрыв в анализе окислительного взрыва более активно и в более низких дозах, чем CD200-Fc дикого типа. Кроме того, это повышение функциональной активности можно приписать мутации K130Y, так как два белка идентичны, за исключением мутации K130Y. Известно, что нейтрофилы в больших количествах обнаруживают в воспаленной ткани (например, в суставах и синовиальной жидкости при ревматических заболеваниях) и, кроме того, они обладают огромным потенциалом в отношении прямого повреждения ткани, кости и хряща в результате секреции протеаз и токсических метаболитов кислорода, а также запуска воспаления посредством презентации антигена и секреции цитокинов, хемокинов, простагландинов и лейкотриенов (Wright, H.L., et al. (2010) 49 Rheumatology 1618-1631). Таким образом, можно ожидать, что средства, ингибирующие активацию нейтрофилов, будут полезными средствами для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, при которых патология полностью или частично опосредована аномальной активацией нейтрофилов.

Таблица 3

Значения средней интенсивности флуоресценции для гейтированной популяции клеток в случае CD200-Fc дикого типа, K130Y и положительных и отрицательных контролей. Значения SD для параллельных экспериментов приведены в скобках

	WT-CD200-Fc	K130Y
10 мкг/мл	248,5 (126)	126 (2,8)
1 мкг/мл	1033,5 (19,1)	133,5 (4,9)
0,1 мкг/мл	1304,5 (38,9)	287,5 (2,1)
0,01 мкг/мл	1407 (50,9)	568,5 (17,7)
0,001 мкг/мл	1437 (48,1)	1229,5 (129,4)
Нестимулированные (отрицательный контроль)	68,5 (6,4)	
Стимуляция РМА (положительный контроль)	1480,5 (16,3)	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантный белок CD200, содержащий мутацию в положении аминокислотного остатка 130 и/или 131, соответствующем SEQ ID NO: 1, где указанная мутация является заменой, выбранной из K130Y и/или I131Y.

2. Белок по п.1, содержащий одну или более дополнительных мутаций, таких как мутации, выбранные из G129I, F128R и N81K.

3. Белок по п.1 или 2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13.

4. Белок по любому из пп.1-3, содержащий внеклеточный домен (ECD) указанного белка.

5. Белок по любому из пп.1-4, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

6. Слитый белок, содержащий белок по любому из пп.1-5, слитый с пептидом или белком, не связывающимися с рецептором CD200 и не мешающими связыванию CD200 с его мишенью, посредством необязательной линкерной части.

7. Белок по п.6, где указанная линкерная часть является пептидом, содержащим от 1 до 15 аминокислот.

8. Белок по п.6 или 7, где указанные пептид или белок являются антителом или его фрагментом.

9. Белок по любому из пп.6-8, где указанные пептид или белок являются Fc-фрагментом.

10. Белок по любому из пп.6-9, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

11. Белок по любому из пп.1-10, являющийся модулятором рецептора CD200.

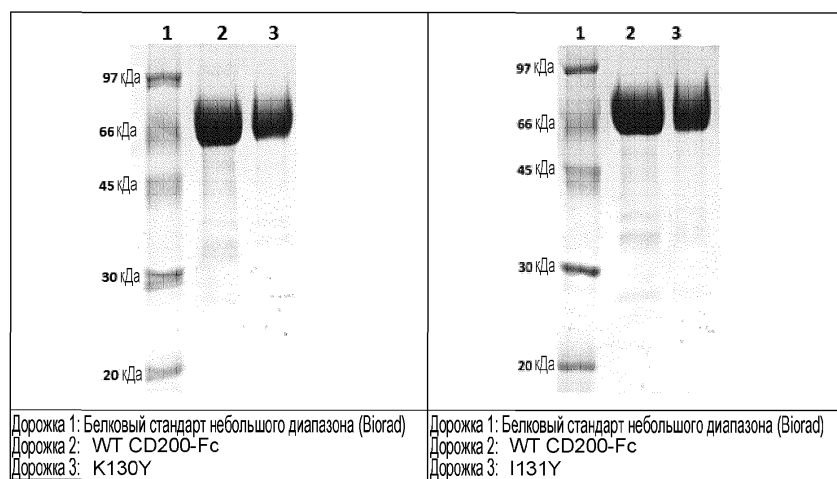
12. Белок по любому из пп.1-10, являющийся агонистом рецептора CD200.

13. Полинуклеотид, кодирующий белок по любому из пп.1-12.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп.1-13.

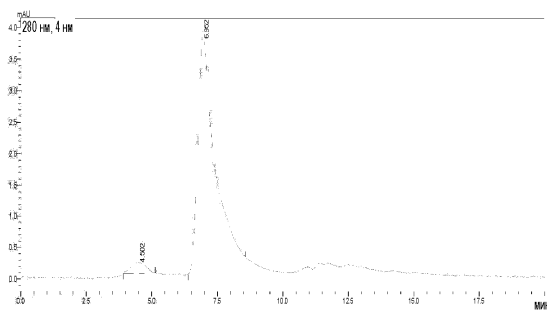
15. Применение белка по любому из пп.1-12 в лечении аутоиммунного заболевания.

16. Применение композиции по п.14 в лечении аутоиммунного заболевания.

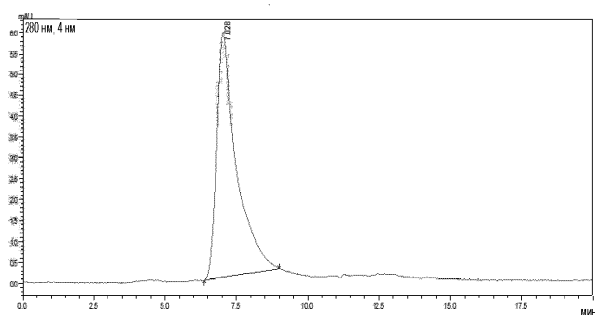


Фиг. 1

А: Эксклюзионная хроматография K130Y

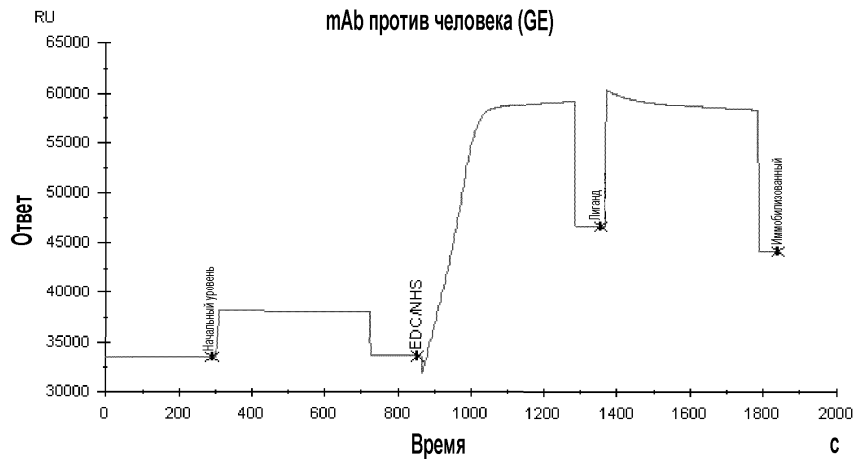


В: Эксклюзионная хроматография I131Y



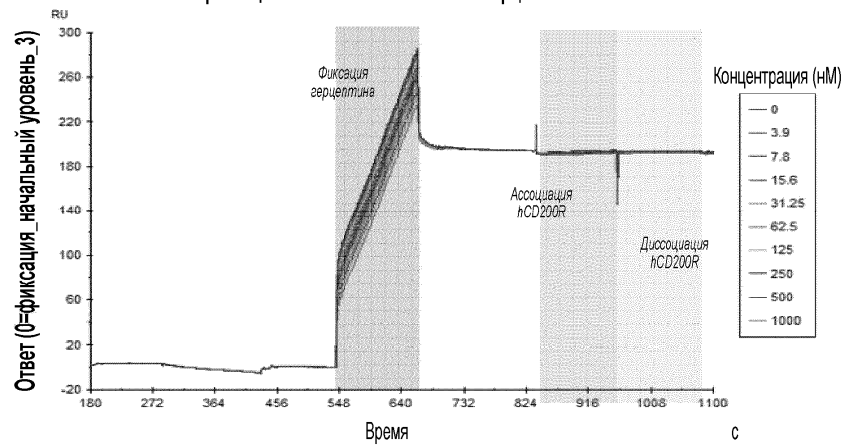
Фиг. 2

Иммобилизация антитела против Fc человека на поверхности сенсорного чипа



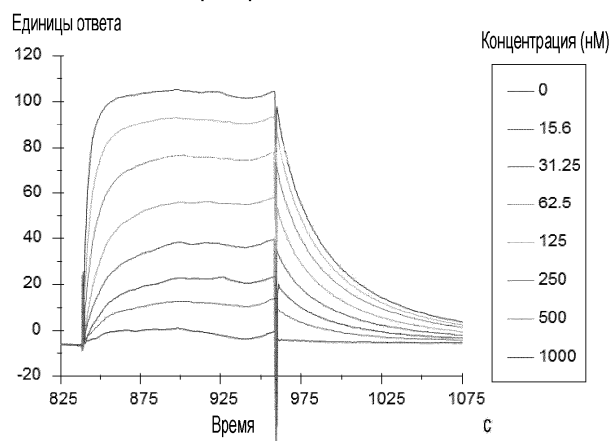
Фиг. 3

Кинетика фиксации связывания hCD200R с герцептином

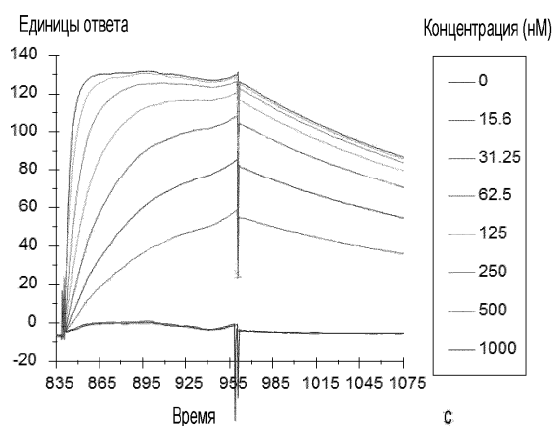


Фиг. 4

Сенсограмма, на которой показаны фазы ассоциации и диссоциации связывания CD200R с зафиксированным CD200 WT

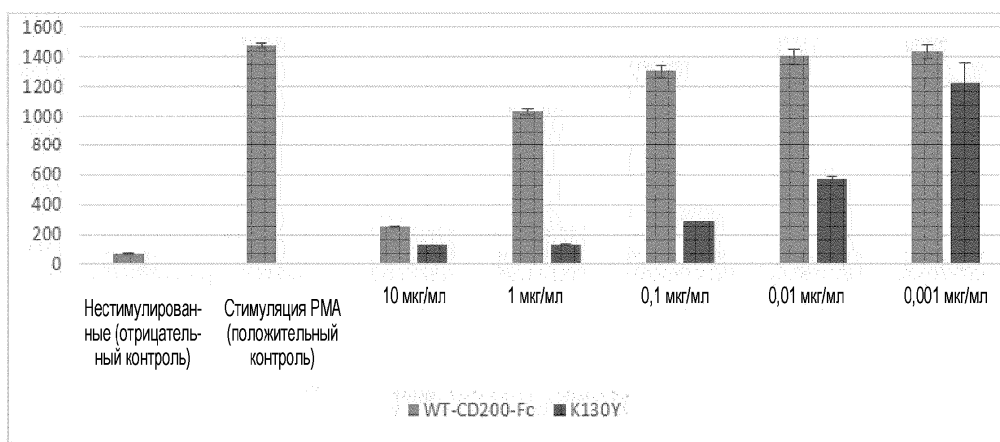


Сенсограмма, на которой показаны фазы ассоциации и диссоциации связывания CD200R с зафиксированным K130Y



Фиг. 5

Результаты исследования зависимости от дозы, в котором сравнивали ингибирование стимулированного РМА окислительного взрыва в выделенных нейтрофилах человека посредством CD200-Fc дикого типа и K130Y



Фиг. 6

