

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391121** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.21

(22) Дата подачи заявки
2021.10.13

(51) Int. Cl. *C12N 9/14* (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) **СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ СУЛЬФОГЛЮКОЗАМИН-ГИДРОЛАЗЫ, И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ**

(31) **63/091,800**

(32) **2020.10.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/054860**

(87) **WO 2022/081765 2022.04.21**

(71) Заявитель:

ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Гизе Тина, Каннан Гунасекаран,
Кариолис Михалис, Махон Катал (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предложены белки, которые способны транспортироваться через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), и включают слитые полипептиды фермента сульфоглюкозамин-сульфогидролазы (SGSH) и Fc. В определенных вариантах осуществления также предложены способы применения таких белков для лечения синдрома Санфилиппо типа А.

A1

202391121

202391121

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577823EA/055

СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ СУЛЬФОГЛЮКОЗАМИН-ГИДРОЛАЗЫ, И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США с серийным номером 63/091800, поданной 14 октября 2020 г. Полное содержание упомянутой выше заявки включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Синдром Санфилиппо, или МПС III, представляет собой редкое нейродегенеративное заболевание, возникающее в результате определенных дефектов лизосомальной функции. Наиболее распространенным типом синдрома Санфилиппо является тип А, который вызывается генетическими мутациями в гене *SGSH*. Недостаточная активность N-сульфоглюкозамин-сульфогидролазы (SGSH) приводит к накоплению олигосахаридов, производных гепарансульфата, и лизосомальной дисфункции во многих органах и тканях, особенно в головном и спинном мозге. Лечение синдрома Санфилиппо остается в основном заместительным; хотя дефицитный фермент можно вводить внутривенно, он мало влияет на мозг из-за трудностей доставки рекомбинантного фермента через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Соответственно, существует потребность в более эффективных терапиях для лечения симптомов синдрома Санфилиппо типа А как периферической, так и центральной нервной системы (ЦНС).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в данном документе предложена специфическая заместительная ферментная терапия, которая способна преодолевать ГЭБ и лечить проявления синдрома Санфилиппо типа А как в периферической, так и в центральной нервной системы. В частности, в некоторых вариантах осуществления предложен белок, содержащий: (a) первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью N-сульфоглюкозамин-сульфогидролазы (SGSH), аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом; и (b) второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом, где второй полипептид Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 37 и имеющую Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tug в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В определенных вариантах осуществления второй

полипептид Fc специфически связывается с рецептором трансферрина (TfR) или способен специфически связываться с TfR. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc связывается с апикальным доменом TfR. В определенных вариантах осуществления связывание белка с TfR существенно не ингибирует связывание трансферрина с TfR. В определенных вариантах осуществления белок связывается с TfR с аффинностью от около 100 нМ до около 500 нМ или необязательно от около 150 нМ до около 400 нМ. В определенных вариантах осуществления белок способен транспортироваться через гематоэнцефалический барьер субъекта.

В определенных вариантах осуществления первая аминокислотная последовательность SGSN содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:58-60. В определенных вариантах осуществления первая аминокислотная последовательность SGSN содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:58-60.

В определенных вариантах осуществления вторая аминокислотная последовательность SGSN содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:58-60. В определенных вариантах осуществления вторая аминокислотная последовательность SGSN содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:58-60.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом посредством пептидной связи или полипептидного линкера. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом посредством пептидной связи или полипептидного линкера. В определенных вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер. В определенных вариантах осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой богатый глицином линкер. В определенных вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой GS (SEQ ID NO:7), G₄S (SEQ ID NO:8) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:9).

В определенных вариантах осуществления N-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления C-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления N-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления C-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN,

аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления N-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом; и N-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления C-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом; и C-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

В определенных вариантах осуществления каждый из первого полипептида Fc и второго полипептида Fc содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации. В определенных вариантах осуществления один из полипептидов Fc имеет замену T366W, а другой полипептид Fc имеет замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc содержит замену T366W. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 12-19 и 28-31; и второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 34-41 и 54-57.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 24-27; и второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 48-53.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержат нативный сайт связывания FcRn.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и второй полипептид Fc не обладают эффекторной функцией. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержат модификацию, снижающую эффекторную функцию. В определенных вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию, представляет собой замены Ala в положении 234 и Ala в положении 235 в соответствии с нумерацией EU.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-19 и 26-31. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14, 15, 28 и 29. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 18, 19, 30 и 31. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 61-88 и 117-118. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 61-68, 73-76, 81-84 и 117-118.

В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 36-41 и 50-57. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 36, 37, 54 и 55. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 40, 41, 56 и 57. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 89-116 и 119-120. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112, и 119-120.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержит аминокислотные замены по сравнению с нативной последовательностью Fc, которые удлиняют время полужизни в сыворотке. В определенных вариантах осуществления аминокислотные замены включают замены Thr в положении 252, Thr в положении 254 и Glu в положении 256 в соответствии с нумерацией EU. В определенных вариантах осуществления аминокислотные замены включают замены Leu в положении 428 и Ser в положении 434 в соответствии с нумерацией EU. В определенных вариантах осуществления аминокислотные замены включают замену Ser или Ala в положении 434 в соответствии с нумерацией EU.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную

последовательность любой из SEQ ID NO: 61-68, 73-76 и 81-84; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104 и 109-112.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 61-64; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 89-92. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или 64; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или 92.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 или 76; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103 или 104.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 или 84; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111 или 112.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 65-68; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 93-96. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или 68; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 или 96.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

В определенных вариантах осуществления поглощение аминокислотной последовательности SGSH головным мозгом по меньшей мере в десять раз больше по сравнению с поглощением аминокислотной последовательности SGSH в отсутствие первого полипептида Fc и второго полипептида Fc или по сравнению с поглощением

фермента SGSN без модификаций во втором полипептиде Fc, которые приводят к связыванию TfR.

В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc не модифицирован для связывания с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а второй полипептид Fc модифицирован для специфического связывания с TfR.

В определенных вариантах осуществления белок не включает последовательность варибельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающую часть.

Некоторые варианты осуществления также обеспечивают полипептид, содержащий полипептид Fc, связанный с аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом, где полипептид Fc i) содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 37; ii) имеет одну или более модификаций, которые способствуют его гетеродимеризации с другим полипептидом Fc; и iii) имеет Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В определенных вариантах осуществления полипептид Fc специфически связывается с рецептором трансферрина (TfR) или способен специфически связываться с TfR. В определенных вариантах осуществления полипептид Fc связан с аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом посредством пептидной связи или полипептидного линкера. В определенных вариантах осуществления полипептид представляет собой слитый полипептид, содержащий от N- к C-концу: аминокислотную последовательность SGSN, аминокислотную последовательность варианта SGSN или каталитически активный фрагмент; полипептидный линкер; и полипептид Fc. В определенных вариантах осуществления полипептид представляет собой слитый полипептид, содержащий от N- к C-концу: полипептид Fc; полипептидный линкер; и аминокислотную последовательность SGSN, аминокислотную последовательность варианта SGSN или каталитически активный фрагмент.

В определенных вариантах осуществления полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO:97-100, 105-108 и 113-116.

В определенных вариантах осуществления полипептид Fc содержит замену T366W.

В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112, и 119-120.

В определенных вариантах осуществления белок содержит полипептид Fc, где полипептид Fc димеризован с другим полипептидом Fc. Таким образом, в определенных вариантах осуществления предложен белок, содержащий полипептид Fc, описанный в данном документе, и другой полипептид Fc.

В определенных вариантах осуществления предложен полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, описанный в данном документе. В определенных вариантах осуществления также предложен вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в данном документе. Определенные варианты осуществления относятся к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид, описанный в данном документе, или вектор, описанный в данном документе. В определенных вариантах осуществления такая клетка-хозяин дополнительно содержит полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую другой полипептид Fc.

В данном документе предложен способ получения белка или полипептида, описанный в данном документе.

В определенных вариантах осуществления предложен способ получения полипептида, содержащего полипептид Fc, который связан с аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью варианта SGSH или каталитически активным фрагментом, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется полипептид, кодируемый полинуклеотидом, описанным в данном документе.

В определенных вариантах осуществления предложена пара полинуклеотидов, содержащих первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом; и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления также предложен один или более векторов, содержащих пару полинуклеотидов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая пару полинуклеотидов, описанных в данном документе, или один или более векторов, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления также предложен способ получения белка, содержащего первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом, и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью

варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется пара полинуклеотидов, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок или полипептид, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

В определенных вариантах осуществления предложен способ лечения синдрома Санфилиппо типа А, включающий введение белка, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе, пациенту, нуждающемуся в этом.

В определенных вариантах осуществления предложен белок, описанный в данном документе, или полипептид, описанный в данном документе, для применения при лечении синдрома Санфилиппо типа А у пациента, нуждающегося в этом.

В определенных вариантах осуществления предложено применение белка, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе, в приготовлении лекарственного препарата для лечения синдрома Санфилиппо типа А у пациента, нуждающегося в этом.

В определенных вариантах осуществления предложен способ уменьшения накопления токсического продукта метаболизма у пациента с синдромом Санфилиппо типа А, включающий введение пациенту белка, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе.

В определенных вариантах осуществления предложен белок, описанный в данном документе, или полипептид, описанный в данном документе, для применения для уменьшения накопления токсического продукта метаболизма у пациента с синдромом Санфилиппо типа А.

В определенных вариантах осуществления предложено применение белка, описанного в данном документе, или полипептида, описанного в данном документе, в приготовлении лекарственного препарата для снижения накопления токсического продукта метаболизма у пациента с синдромом Санфилиппо типа А.

В ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТАХ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКИЙ ПРОДУКТ МЕТАБОЛИЗМА СОДЕРЖИТ ОЛИГОСАХАРИДЫ, ПРОИЗВОДНЫЕ ГЕПАРАНСУЛЬФАТА.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А-1С. Изображение иллюстративных слитых белков ETV:SGSN, имеющих линкер различной длины между ферментом SGSN и шарнирной областью полипептида Fc.

Фиг. 2. Содержание fGly в слитых белках SGSN-Fc и ETV:SGSN, определенное посредством ЖХ-МС.

Фиг. 3. *In vitro* оценка ферментативной активности SGSN-Fc и слитых белков ETV:SGSN.

Фиг. 4. Оценка клеточной активности слитых белков SGSN-Fc на фибробластах пациентов с МПСША и здоровых контролей с использованием анализа с вытеснением ³⁵S-

метки.

Фиг. 5. Концентрация слитых белков SGSH-Fc и ETV:SGSH в сыворотке.

Фиг. 6А-6В. Концентрация слитых белков SGSH-Fc и ETV:SGSH в печени через 2 часа (Фиг. 6А) и 8 часов (Фиг. 6В).

Фиг. 7. Концентрация слитых белков SGSH-Fc и ETV:SGSH в головном мозге.

Фиг. 8. Общие уровни гепарансульфата в печени.

Фиг. 9. Общие уровни гепарансульфата в головном мозге.

Фиг. 10. Общие уровни гепарансульфата в спинномозговой жидкости.

Фиг. 11. Общие уровни гепарансульфата в головном мозге после введения двух разных слитых белков ETV:SGSH.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее время существует потребность в новых терапевтических средствах для лечения синдрома Санфилиппо типа А, особенно в терапевтических средствах для лечения нейрокогнитивного фенотипа. В данном документе описана специфическая заместительная ферментная терапия, называемая ETV:SGSH, которая способна проникать через ГЭБ и лечить как периферические, так и центральные проявления синдрома Санфилиппо типа А. В контексте данного документа термин «ETV:SGSH» относится к димерному белку, который способен транспортироваться через ГЭБ и содержит первый полипептид Fc и второй полипептид Fc, каждый из которых связан (например, слит) с ферментом SGSH, вариантом фермента SGSH или их каталитически активным фрагментом. Как обсуждалось в примерах, мышинная модель синдрома Санфилиппо типа А показала более чем 50% снижение гликозаминогликанов головного мозга (ГАГ) и более чем 80% снижение ГАГ в СМЖ после однократного внутривенного введения дозы ETV:SGSH.

БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ СЛИТЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФЕРМЕНТ SGSH-Fc

Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления предложена белковая молекула, содержащая слитый полипептид фермента SGSH-Fc. Фермент SGSH, входящий в состав белка, является каталитически активным, т. е. сохраняет ферментативную активность. В некоторых аспектах белок, описанный в данном документе, содержит: (i) полипептид Fc, который может содержать модификации (например, одну или более модификаций, способствующих гетеродимеризации) или может представлять собой полипептид Fc дикого типа; и фермент SGSH; и (ii) полипептид Fc, который содержит модификации, приводящие к связыванию с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), например, рецептором трансферрина (TfR), и необязательно одну или более дополнительных модификаций (например, одну или более модификаций, которые способствуют гетеродимеризации); и фермент SGSH.

В некоторых вариантах осуществления белок, описанный в данном документе, содержит каталитически активный фрагмент или вариант SGSH дикого типа. В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH представляет собой вариант или каталитически активный фрагмент белка SGSH, который содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 58, 59 и 60. В некоторых вариантах осуществления каталитически

активный вариант или фрагмент фермента SGSH имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более активности фермента SGSH дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH или его каталитически активный вариант или фрагмент, который присутствует в белке, описанном в данном документе, сохраняет по меньшей мере 25% своей активности по сравнению с его активностью, когда он не присоединен к полипептиду Fc или TfR-связывающему полипептиду Fc. В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH или его каталитически активный вариант или фрагмент 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% его активности по сравнению с его активностью, когда он не присоединен к полипептиду Fc или TfR-связывающему полипептиду Fc. В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH или его каталитически активный вариант или фрагмент сохраняет по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% своей активности по сравнению с его активностью, когда он не присоединен к полипептиду Fc или TfR-связывающему полипептиду Fc. В некоторых вариантах осуществления слияние с полипептидом Fc не снижает активность фермента SGSH или его каталитически активного варианта или фрагмента. В некоторых вариантах осуществления слияние с TfR-связывающим полипептидом Fc не снижает активность фермента SGSH.

Модификации полипептида Fc

Полипептид Fc, включенный в описанный в данный документ слитый белок, может содержать определенные модификации. Например, полипептид Fc может содержать модификации, которые приводят к связыванию с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), например, рецептором трансферрина (TfR). Кроме того, полипептид Fc может содержать другие модификации, такие как модификации, которые способствуют гетеродимеризации, повышают стабильность в сыворотке или время полужизни в сыворотке, модулируют эффекторную функцию, влияют на гликозилирование и/или снижают иммуногенность у человека. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном документе, содержит два полипептида Fc, где один Fc представляет собой полипептид Fc дикого типа, например, полипептид Fc IgG1 человека; и другой Fc модифицирован для связывания с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), например, рецептором трансферрина (TfR), и необязательно дополнительно содержит одну или более дополнительных модификаций. В определенных других вариантах осуществления каждый из обоих полипептидов Fc содержит независимо выбранные модификации (например, модификацию, описанную в данном документе).

Аминокислотные остатки, обозначенные в различных модификациях Fc, включая те, которые введены в модифицированный полипептид Fc, который связывается с рецептором ГЭБ, например, TfR, пронумерованы в данном документе с использованием нумерации по

индексу EU. Любой полипептид Fc, например, полипептид Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, может иметь модификации, например замены аминокислот в одном или более положениях, как описано в данном документе.

Модифицированный (например, усиливающий гетеродимеризацию и/или связывание рецептора ГЭБ) полипептид Fc, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, может иметь по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с нативной последовательностью области Fc или ее фрагментом, например, фрагментом длиной по меньшей мере 50 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот или более. В некоторых вариантах осуществления нативная аминокислотная последовательность Fc представляет собой последовательность области Fc SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 1-110 SEQ ID NO:1 или аминокислотами 111-217 SEQ ID NO:1, или их фрагментом, например, фрагментом длиной по меньшей мере 50 аминокислот или по меньшей мере 100 аминокислот или более.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный (например, усиливающий гетеродимеризацию и/или связывание рецептора ГЭБ) полипептид Fc содержит по меньшей мере 50 аминокислот или по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более, или по меньшей мере 100 аминокислот или более, которые соответствуют аминокислотной последовательности нативной области Fc. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит по меньшей мере 25 смежных аминокислот или по меньшей мере 30, 35, 40 или 45 смежных аминокислот, или 50 смежных аминокислот, или по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или более смежных аминокислот, или 100 или более смежных аминокислот, которые соответствуют аминокислотной последовательности нативной области Fc, такой как SEQ ID NO:1.

Модификации связывания рецепторов гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)

В некоторых аспектах в данном документе предложены слитые белки, которые способны переноситься через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Такой белок содержит модифицированный полипептид Fc, который связывается с рецептором ГЭБ. Рецепторы ГЭБ экспрессируются на эндотелии ГЭБ, а также в других типах клеток и тканей. В некоторых вариантах осуществления рецептор ГЭБ представляет собой рецептор трансферрина (TfR).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном

документе, специфически связывается с TfR. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном документе, специфически связывается с TfR с аффинностью от около 50 нМ до около 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается (например, специфически связывается) с TfR с аффинностью около 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 или 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TFR с аффинностью от около 100 до 500 нм. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TFR с аффинностью от около 100 нм до около 300 нм или от 150 нм до около 250 нм или от около 200 нм до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TFR с аффинностью около 230 нм. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TFR с аффинностью от 150 до около 400 нм или от около 200 до около 400 нм или от около 250 нм до около 350 нм или от около 300 до около 350 нм.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, который специфически связывается с TfR, содержит замены в домене CH3. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит домен CH3 Ig человека, такой как домен CH3 IgG, который модифицирован для TfR-связывающей активности. Домен CH3 может относиться к любому подтипу IgG, то есть IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG домен CH3 относится к сегменту аминокислот от примерно положения 341 до примерно положения 447, как пронумеровано в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, который специфически связывается с TfR, связывается с апикальным доменом TfR и может связываться с TfR, не блокируя или иным образом не ингибируя связывание трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR существенно не ингибируется. 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 связывание трансферрина с TFR ингибируется менее чем на около 20% (например, менее чем на около 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный (например, связывающий рецептор ГЭБ) полипептид Fc, присутствующий в слитом белке, описанный в данном документе, включает замены в аминокислотных положениях 384, 386, 387, 388, 389, 413, 415, 416 и 421, в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, который специфически связывается с TFR, содержит Ala в положении 389, в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, который специфически связывается с TFR, содержит в следующих положениях, в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в

положении 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, который специфически связывается с TFR, содержит в следующих положениях, в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421.

В дополнительных вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc дополнительно содержит одну, две или три замены в положениях, включающих 414, 424 и 426, в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления положение 414 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; положение 424 представляет собой Ser, Thr, Glu или Lys; и/или положение 426 представляет собой Ser, Trp или Gly.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 111-217 из SEQ ID NO: 32; и включает аминокислоты в положениях в соответствии с нумерацией EU 380, 384-390 и/или 413-421 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 111-216 из SEQ ID NO: 33; и включает аминокислоты в положениях в соответствии с нумерацией EU 380, 384-390 и/или 413-421 из SEQ ID NO: 32 или 33. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO:32 или 33; и включает аминокислоты в положениях в соответствии с нумерацией EU 380, 384-390 и/или 413-421 из SEQ ID NO:32 или 33.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32 или 33, и имеет Ala на положении 389, в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей

мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32 или 33 и включает в следующие положения, согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 32 или 33 и включает в следующие положения, согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или 33.

Дополнительные мутации полипептида Fc

В некоторых аспектах, описанный в данном документе слитый белок, содержит два полипептида Fc, в которых один или оба полипептида Fc составляют независимо выбранные модификации (например, модификацию, описанную в данном документе). Неограничивающие примеры других мутаций, которые могут быть введены в один или оба полипептида Fc, включают, *например*, мутации для повышения стабильности или периода полужизни в сыворотке, для модуляции эффекторной функции, для воздействия на гликозилирование, для снижения иммуногенности у людей и/или для обеспечения гетеродимеризации типов «выступ» и «впадин» полипептидов Fc.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды Fc, присутствующие в слитом белке, независимо имеют идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с соответствующим полипептидом Fc дикого типа (например, полипептидом Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека).

В некоторых вариантах осуществления полипептиды Fc, присутствующие в слитом белке, содержат мутации типа «выступ» и «впадин», что способствует образованию гетеродимера и препятствует образованию гомодимера. Как правило, модификации вводят выпуклость («выступ») на поверхности взаимодействия первого полипептида и соответствующую полость («впадину») на поверхности взаимодействия второго полипептида, так что выступ можно расположить в полости таким образом, чтобы способствовать образованию гетеродимера и, таким образом, препятствовать образованию гомодимера. Выступы конструируются путем замены небольших боковых цепей аминокислот с поверхности взаимодействия первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозина или триптофана). На поверхности взаимодействия

второго полипептида создаются компенсирующие полости идентичного или подобного размера выступам путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). В некоторых вариантах осуществления такие дополнительные мутации находятся в положении полипептида Fc, которое не оказывает отрицательного влияния на связывание полипептида с рецептором ГЭБ, например, TfR.

В одном иллюстративном варианте осуществления подхода «выступ-во-впадину» для димеризации в положении 366 (пронумерованная в соответствии со схемой нумерации EU) одного из полипептидов Fc, присутствующих в слитом белке, содержит триптофан вместо нативного треонина. Другой полипептид Fc в димере имеет валин в положении 407 (нумерация согласно схеме нумерации EU) вместо нативного тирозина. Другой полипептид Fc может дополнительно содержать замену, в которой нативный треонин в положении 366 (нумерация согласно схеме нумерации EU) заменен серином, а нативный лейцин в положении 368 (нумерация согласно схеме нумерации EU) заменен аланином. Таким образом, один из полипептидов Fc слитого белка, описанного в данном документе, имеет мутацию типа «выступ» T366W, а другой полипептид Fc имеет мутацию Y407V, которая обычно сопровождается мутациями типа «впадина» T366S и L368A. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc содержит замену T366W. В некоторых других вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V.

В некоторых вариантах осуществления могут быть введены модификации для увеличения периода полужизни в сыворотке. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, могут содержать тирозин в положении 252, треонин в положении 254 и глутаминовую кислоту в положении 256, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M252Y, S254T и T256E. В качестве альтернативы, один или оба полипептида Fc могут иметь замены M428L и N434S, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU. В альтернативном варианте один или оба полипептида Fc могут содержать замену N434S или N434A.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, 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 ими, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание с Fc-рецептором, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ), снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-

клеток. Эффекторные функции могут различаться в зависимости от класса антител. Например, нативные антитела IgG1 и IgG3 человека могут вызывать активность АЗКЦ и КЗЦ при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим в клетке иммунной системы; и нативные человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 могут вызывать функции АЗКФ при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на иммунной клетке.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, которые содержатся в слитом белке, также могут быть сконструированы так, чтобы они содержали другие модификации для гетеродимеризации, например, модификацию электростатических взаимодействий контактных остатков на поверхности взаимодействия СН3-СН3, которые представляют собой модификации естественно заряженных или гидрофобных участков.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, могут включать дополнительные модификации, которые модулируют эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc, которые содержатся в слитом белке, описанном в данном документе, могут содержать модификации, снижающие или устраняющие эффекторную функцию. Иллюстративные мутации полипептида Fc, которые снижают эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются ими, замены в домене СН2, например, в положениях 234 и 235, в соответствии со схемой нумерации EU. Например, в некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут содержать остатки аланина в положениях 234 и 235. Таким образом, один или оба полипептида Fc могут иметь замены L234A и L235A (LALA).

Дополнительные мутации полипептида Fc, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются ими, следующее: положение 329 может иметь мутацию, в которой пролин замещен 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 области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329G области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и P329S области Fc IgG1 человека; S228P и L235E области Fc IgG4 человека; L234A и G237A области Fc IgG1 человека; L234A, L235A и G237A области Fc IgG1 человека; V234A и G237A области Fc IgG2 человека; L235A, G237A и E318A области Fc IgG4 человека; и S228P и L236E области Fc IgG4 человека в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc могут иметь одну или более аминокислотных замен, которые модулируют АЗКЦ, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления С-концевой остаток Lys удален в полипептиде Fc, описанном в данном документе (т. е. остаток Lys в положении 447 в

соответствии со схемой нумерации EU).

Иллюстративные полипептиды Fc, содержащие дополнительные мутации

Как описано в данном документе и в качестве неограничивающего примера, один или оба полипептида Fc, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, могут содержать дополнительные мутации, включая мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии со схемой нумерации EU), мутации типа «впадина» (например, T366S, L368A и Y407V, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, модулирующие эффекторную функцию (например, L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S)), пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU), и/или мутации, которые повышают стабильность в сыворотке или время полужизни в сыворотке (например, (i) M252Y, S254T и T256E, пронумерованные со ссылкой на нумерация EU, или (ii) N434S с M428L или без нее в соответствии с нумерацией EU). В качестве иллюстрации SEQ ID NO:12-19, 24-31, 34-41 и 48-57 представляют собой неограничивающие примеры модифицированных полипептидов Fc, содержащих одну или более из этих дополнительных мутаций.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc может иметь мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии со схемой нумерации EU) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO:1, 2, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32 и 33, может быть модифицирован для получения мутации типа «выступ».

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии с нумерацией EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 24 и 25. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 24 и 25.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии с нумерацией EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 34 и 35, и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей

мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 35 и содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 34 или 35 и содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tug в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 34 и 35.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc может иметь мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S)) согласно нумерации в соответствии со схемой нумерации EU), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32, и 33. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32 и 33, может быть модифицирован, чтобы иметь мутацию типа «выступ» и мутации, которые модулируют эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии с нумерацией EU) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S)), пронумерованные в соответствии с нумерацией EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 26 и 27. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 26 и 27.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутацию типа «выступ» (например, T366W, пронумерованную в соответствии с нумерацией EU) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например,

L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S), пронумерованные в соответствии с нумерацией EU), имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 36-41 и 54-57, и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 36-41 и 54-57 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 36-41 и 54-57 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Thr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 36-41 и 54-57.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc может иметь мутации типа «впадина» (например, T366S, L368A и Y407V, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32, и 33. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32 и 33, может быть модифицирован, чтобы иметь мутации типа «впадина».

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутации типа «впадина» (например, T366S, L368A и Y407V, пронумерованные согласно нумерации EU) и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 12 и 13.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc

содержит мутации типа «впадина» (например, T366S, L368A и Y407V, пронумерованные согласно нумерации EU), имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48 и 49, и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48 и 49 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48 и 49 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 48 и 49.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc может иметь мутации типа «выступ» (например, T366S, L368A, и Y407V, пронумерованные в соответствии со схемой нумерации EU), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S)) согласно нумерации в соответствии со схемой нумерации EU), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32 и 33. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 2, 32 и 33, может быть модифицирован таким образом, чтобы иметь мутации типа «выступ» и мутации, которые модулируют эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутации типа «впадина» (например, T366S, L368A, и Y407V, пронумерованную в соответствии с нумерацией EU) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S)), пронумерованные в соответствии с нумерацией EU), и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90%

идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 14-19 и 28-31. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 14-19 и 28-31.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутации типа «впадина» (например, T366S, L368A и Y407V, пронумерованные в соответствии с нумерацией EU) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L234A, L235A и/или P329G или P329S (например, L234A и L235A; L234A, L235A и P329G; или L234A, L235A и P329S)) в соответствии с нумерацией EU), имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 50-53 и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 50-53 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 50-53 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tug в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 50-53.

Сайты связывания FcRn

В некоторых аспектах модифицированные (например, связывающиеся с рецептором ГЭБ) полипептиды Fc или полипептиды Fc, присутствующие в слитом белке, описанном в данном документе, которые специфически не связываются с рецептором ГЭБ, могут содержать сайт связывания FcRn. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn находится внутри полипептида Fc или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn содержит нативный сайт связывания FcRn. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn не содержит аминокислотные изменения относительно аминокислотной последовательности

нативного сайта связывания FcRn. В некоторых вариантах осуществления нативный сайт связывания FcRn представляет собой сайт связывания IgG, *например*, сайт связывания IgG человека. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn содержит модификацию, которая изменяет связывание FcRn.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn имеет один или более аминокислотных остатков, которые являются мутированными, *например*, замещенными, причем мутация(и) увеличивают период полужизни в сыворотке или существенно не уменьшают период полужизни в сыворотке (*т.е.* уменьшают период полужизни в сыворотке не более чем на 25% по сравнению с аналогичным модифицированным полипептидом Fc, имеющим остатки дикого типа в мутированных положениях при анализе в тех же условиях). В некоторых вариантах осуществления сайт связывания FcRn имеет один или более аминокислотных остатков, которые замещены в положениях 250-256, 307, 380, 428 и 433-436 в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более остатков в сайте связывания FcRn или вблизи него мутируют относительно нативной последовательности человеческого IgG для увеличения периода полужизни модифицированного полипептида в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в одно, два или три положения 252, 254 и 256. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой M252Y, S254T и T256E. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc дополнительно содержит мутации M252Y, S254T и T256E. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит замену в одном, двух или всех трех положениях T307, E380 и N434 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления мутации представляют собой T307Q и N434A. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутации T307A, E380A и N434A. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит замены в положениях T250 и M428 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутации T250Q и/или M428L. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит замены в положениях M428 и N434 в соответствии со схемой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутации M428L и N434S. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc содержит мутацию N434S или N434A.

Ферменты SGSH, связанные с полипептидами Fc

В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном документе, содержит два полипептида Fc, как описано в данном документе, и один или оба полипептида Fc могут дополнительно содержать частичную или полную шарнирную область. 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:5) или ее часть (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область находится в N-концевой области полипептида Fc.

В определенных вариантах осуществления N-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления C-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления N-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом. В определенных вариантах осуществления C-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

В определенных вариантах осуществления N-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом; и N-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

В определенных вариантах осуществления C-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом; и C-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc соединен с ферментом SGSN линкером, например, пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc соединен с ферментом SGSN пептидной связью или пептидным линкером, например, представляет собой слитый полипептид. Пептидный линкер может иметь такую конфигурацию, чтобы обеспечивать вращение фермента SGSN относительно полипептида Fc, к которому он присоединен; и/или устойчивость к расщеплению протеазами. Пептидные линкеры могут содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может представлять собой гибкий линкер, например, содержащий аминокислоты, такие как Gly, Asn, Ser, Thr, Ala и т.п. (например, богатый глицином линкер). 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, такие как два, три, четыре,

пять или более повторов Gly₄-Ser (SEQ ID NO:8) или один Gly₄-Ser (SEQ ID NO:8). В других аспектах линкер может представлять собой Gly-Ser (SEQ ID NO:7). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может содержать сайт расщепления протеазой, например, расщепляемый ферментом, присутствующим в центральной нервной системе.

В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH присоединен к N-концу полипептида Fc, например, посредством линкера Gly-Ser (SEQ ID NO:7), линкера Gly₄-Ser (SEQ ID NO:8) или линкера (Gly₄-Ser)₂ (SEQ ID NO:9). В некоторых вариантах осуществления полипептид Fc может содержать шарнирную последовательность или частичную шарнирную последовательность на N-конце, которая присоединена к линкеру или непосредственно присоединена к ферменту SGSH.

В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH присоединен к C-концу полипептида Fc, например, посредством линкера Gly-Ser (SEQ ID NO:7), линкера Gly₄-Ser (SEQ ID NO:8) или линкера (Gly₄-Ser)₂ (SEQ ID NO:9). В некоторых вариантах осуществления C-конец полипептида Fc непосредственно соединен с ферментом SGSH.

В некоторых вариантах осуществления фермент SGSH соединен с полипептидом Fc посредством химического сшивающего агента. 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 сочетания 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-а-метил-а-(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 белковые молекулы, содержащие слитые полипептиды фермент SGSH-Fc

В некоторых аспектах слитый белок, описанный в данном документе, содержит первый полипептид Fc, который связан с первым ферментом SGSH, вариантом фермента SGSH или их каталитически активным фрагментом; и второй полипептид Fc, который связан со вторым ферментом SGSH, вариантом фермента SGSH или их каталитически активным фрагментом, при этом второй полипептид Fc содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU; и при этом второй полипептид Fc образует димер Fc с первым полипептидом Fc. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит в следующих положениях в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc специфически связывается с TfR. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc не включает последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc представляет собой модифицированный полипептид Fc. В определенных вариантах осуществления второй полипептид Fc (т.е. модифицированный полипептид Fc) содержит одну или более дополнительных модификаций. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, описанный в данном документе, содержит одну или более модификаций, которые способствуют его гетеродимеризации с другим полипептидом Fc. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, описанный в данном документе, содержит одну или более модификаций, снижающих эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид Fc, как описано в данном документе, содержит одну или более модификаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном документе, содержит первую полипептидную цепь, которая содержит первый полипептид Fc, содержащий замены T366S, L368A и Y407V (типа «впадина»); и вторую полипептидную цепь, которая содержит второй полипептид Fc, который связывается с TfR и содержит

замену T366W (типа «выступ»). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит замены L234A и L235A (LALA). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит замены L234A, L235A и P329G (LALAPG) или содержит замены L234A, L235A и P329S (LALAPS). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит: 1) замены L234A и L235A (LALA); замены L234A, L235A и P329G (LALAPG); или замены L234A, L235A и P329S (LALAPS); и 2) замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержит остатки человеческого IgG1 дикого типа в положениях 234, 235, 252, 254, 256 и 366.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит мутацию типа «выступ»; LALA/LALAPG/LALAPS и/или мутации YTE, имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:34-41 и содержит Ala в положении 389 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 34-41 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 34-41 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421; содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 34-41. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит мутацию типа «впадина», мутации LALA/LALAPG/LALAPS и/или YTE и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:12-19; или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 12-19. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит любую из SEQ ID NO:34-41, а первый

полипептид Fc содержит любую из SEQ ID NO:12-19. В некоторых вариантах осуществления N-конец первого полипептида Fc и/или второго полипептида Fc включает часть шарнирной области IgG1 (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 54-57, и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 54-57 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 54-57 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 54-57. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 28-31, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:28-31.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном документе, содержит первую полипептидную цепь, которая содержит первый полипептид Fc, содержащий замену T366W (типа «выступ»); и вторую полипептидную цепь, которая содержит второй полипептид Fc, который связывается с TfR и содержит замены T366S, L368A и Y407V (типа «впадина»). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит замены L234A и L235A (LALA). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит замены L234A, L235A и P329G (LALAPG) или содержит замены L234A, L235A и P329S (LALAPS). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит: 1) замены L234A и L235A (LALA); замены L234A, L235A и P329G (LALAPG); или замены L234A, L235A и P329S

(LALAPS); и 2) замены M252Y, S254T и T256E (YTE). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержит остатки человеческого IgG1 дикого типа в положениях 234, 235, 252, 254, 256 и 366.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит мутацию типа «впадина», LALA/LALAPG/LALAPS и/или мутации YTE, имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:48-53 и содержит Ala в положении 389 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48-53, и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48-53, и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tug в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Tgr в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421; содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 48-53. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc содержит мутацию типа «выступ», мутации LALA/LALAPG/LALAPS и/или YTE и имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:24-27; или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 24-27. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc содержит любую из SEQ ID NO: 48-53, и первый полипептид Fc содержит любую из SEQ ID NO:24-27. В некоторых вариантах осуществления N-конец модифицированного полипептида Fc и/или полипептида Fc включает часть шарнирной области IgG1 (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

В некоторых вариантах осуществления первый фермент SGSH, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, связан с первой полипептидной цепью, которая содержит первый полипептид Fc, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 12-19, или содержит последовательность

любой из SEQ ID NO: 12-19 (*например*, как слитый полипептид). В некоторых вариантах осуществления первый фермент SGSN связан с первым полипептидом Fc линкером, например, гибким линкером, и/или шарнирной областью или ее частью (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления N-конец первого полипептида Fc включает часть шарнирной области IgG1 (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:28-31 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:28-31. В некоторых вариантах осуществления первый фермент SGSN содержит последовательность SGSN, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 58-60 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 58-60. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность SGSN, связанная с полипептидом Fc, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:61-68, 73-76, 81-84 и 117-118, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO:61-68, 73-76, 81-84 и 117-118. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит второй полипептид Fc, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 34-41, и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 34-41 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 34-41 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 34-41. В

некоторых вариантах осуществления второй фермент SGSH связан с первым полипептидом Fc линкером, например, гибким линкером, и/или шарнирной областью или ее частью (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления N-конец второго полипептида Fc включает часть шарнирной области IgG1 (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:54-57 и содержит Ala в положении 389 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 54-57 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 54-57 и включает следующие положения согласно нумерации EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 54-57. В некоторых вариантах осуществления второй фермент SGSH содержит последовательность SGSH, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 58-60 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 58-60. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность SGSH, связанная со вторым полипептидом Fc, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112 и 119-120 и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112, и 119-120, и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в

положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112, и 119-120, и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112, и 119-120.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:61-64, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:89-92.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:65-68, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:93-96.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:73-76, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:101-104.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:81-84, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:109-112.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:117-118, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность любой из SEQ ID NO:119-120.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:61 или 62, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:89 или 90.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65 или 66, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93 или 94.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 63 или 64, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 91 или 92.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:64, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:92.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 67 или 68, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 95 или 96.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:68, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:96.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 73 или 74, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 101 или 102.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 75 или 76, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 103 или 104.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:76, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:104.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 81 или 82, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 109 или 110.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 83 или 84, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 111 или 112.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:84, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:112.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:117, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:119.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:118, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO:120.

В некоторых вариантах осуществления первый фермент SGSH, присутствующий в слитом белке, описанном в данном документе, связан с первой полипептидной цепью, которая содержит первый полипептид Fc, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 24-27, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 24-27 (*например*, как слитый полипептид). В некоторых вариантах осуществления первый фермент SGSH связан с первым полипептидом Fc линкером, например, гибким линкером, и/или шарнирной областью или ее частью (*например*, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления N-конец первого

полипептида Fc включает часть шарнирной области IgG1 (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления первый фермент SGSN содержит последовательность SGSN, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичность любой из SEQ ID NO: 58-60 или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 58-60. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность SGSN, связанная с полипептидом Fc, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO:69-72, 77-80 и 85-88, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 69-72, 77-80, и 85-88. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит второй полипептид Fc, имеющий по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 48-53 и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48-53, и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48-53, и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 48-53. В некоторых вариантах осуществления второй фермент SGSN связан с первым полипептидом Fc линкером, например, гибким линкером, и/или шарнирной областью или ее частью (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления N-конец второго полипептида Fc включает часть шарнирной области IgG1 (например, DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления второй фермент SGSN содержит последовательность SGSN, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичность любой из SEQ ID NO: 58-60 или содержит

последовательность любой из SEQ ID NO: 58-60. В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность SGSH, связанная со вторым полипептидом Fc, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 97-100, 105-108 и 113-116 и содержит Ala в положении 389 согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 97-100, 105-108 и 113-116 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Ala в положении 389; и Asn в положении 390. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc имеет по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 97-100, 105-108 и 113-116 и включает следующие положения в соответствии с нумерацией EU: Glu в положении 380; Tyr в положении 384; Thr в положении 386; Glu в положении 387; Trp в положении 388; Ala в положении 389; Asn в положении 390; Thr в положении 413; Glu в положении 415; Glu в положении 416; и Phe в положении 421, или содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 97-100, 105-108, и 113-116.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 69 или 70, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 97 или 98.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 71 или 72, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 99 или 100.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 77 или 78, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 105 или 106.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 79 или 80, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 107 или 108.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 85 или 86, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 113-114.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит первый слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 87 или 88, и второй полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность SEQ ID NO: 115-116.

Слитые белки и другие композиции, описанные в данном документе, могут иметь

ряд аффинностей связывания. Например, в некоторых вариантах осуществления белок имеет аффинность с рецептором трансферрина (TfR) в пределах от 1 пМ до 10 мкМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от 1 нМ до 5 мкМ или от 10 нМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от около 50 нМ до около 500 нМ или от около 100 нМ до около 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от около 50 нМ до около 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от около 100 нМ до около 350 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от около 150 нМ до около 400 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от около 200 нМ до около 450 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR является моновалентной аффинностью.

ОЦЕНКА БЕЛКОВОЙ АКТИВНОСТИ

Активность слитых белков, описанных в данном документе, которые содержат ферменты SGSH, можно оценить с помощью различных анализов, включая анализы, которые измеряют активность *in vitro* с использованием искусственного субстрата, такого как описанные в разделе «Примеры». Другие иллюстративные протоколы для измерения активности SGSH *in vitro* представлены, например, в WO 2019/070577.

В некоторых вариантах осуществления оценивают тканевый образец. Образец ткани можно оценить с помощью анализа, как описано выше, за исключением того, что несколько циклов замораживания-размораживания, например, 2, 3, 4, 5 или более, обычно включают перед этапом обработки ультразвуком, чтобы гарантировать, что микровезикулы разрушены.

Образцы, которые можно оценить с помощью описанных в данном документе анализов, включают головной мозг, печень, почки, легкие, селезенку, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость (СМЖ) и мочу. В некоторых вариантах осуществления могут быть оценены образцы спинномозговой жидкости от пациента, получающего слитый белок фермент-Fc (например, слитый белок SGSH-Fc), описанный в данном документе.

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 настоящее изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей любую из полипептидных цепей, содержащих полипептиды Fc, как описано в данном документе, и клеткам-хозяевам, в которые введены нуклеиновые кислоты, которые используются для репликации кодирующих полипептиды нуклеиновые кислоты и/или для экспрессии полипептидов. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой человека.

В еще одном аспекте предложены полинуклеотиды, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более полипептидных цепей,

описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует одну из полипептидных последовательностей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует две из полипептидных последовательностей, описанных 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 некоторых вариантах осуществления также предложена пара последовательностей нуклеиновых кислот, где каждая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, описанный в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления предложена пара последовательностей нуклеиновых кислот, где первая последовательность нуклеиновой кислоты в паре кодирует первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или из каталитически активным фрагментом; и вторая последовательность нуклеиновой кислоты в паре кодирует второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид включен в конструкцию нуклеиновой кислоты или пара полинуклеотидов включена в одну или более конструкций 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 pBTac и плазмиды на основе pUC для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*. Векторы на основе pCDNA1/amp, pCDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHyg 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 - Барра (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 являются клетками млекопитающих, такие как клетка яичника китайского хомяка (CHO), клетка почек новорожденного хомяка (BHK), клетка NS0, клетка Y0, клетка HEK293, клетка COS, клетка Vero или клетка HeLa.

Клетка-хозяин, трансфицированная вектором(-ами) экспрессии, кодирующим(-и) одну или более полипептидных цепей Fc, как описано в данном документе, может быть культивирована в подходящих условиях, обеспечивающих экспрессию одного или более полипептидов. Полипептиды могут быть секретированы и выделены из смеси клеток и среды, содержащей полипептиды. Альтернативно, полипептиды можно сохранить в цитоплазме или в мембранной фракции, а клетки можно собирать, лизировать и выделять полипептид, используя необходимый метод.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

Слитый белок, как описано в данном документе, может быть использован в терапевтических целях для лечения синдрома Санфилиппо типа А.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения накопления токсического продукта метаболизма (например, олигосахарида, производного гепарансульфата) у субъекта, имеющего синдром Санфилиппо типа А, причем способ включает введение субъекту белка, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предложен белок, описанный в данном документе, для применения в уменьшении накопления токсического продукта метаболизма (например, олигосахарида, производного гепарансульфата) у субъекта, имеющего синдром

Санфилиппо типа А.

В определенных вариантах осуществления предложено применение белка, как описано в данном документе, в приготовлении лекарственного препарата для уменьшения накопления токсического продукта метаболизма (например, олигосахарида, производного гепарансульфата) у субъекта, имеющего синдром Санфилиппо типа А.

В определенных вариантах осуществления также предложен способ лечения синдрома Санфилиппо типа А, включающий введение белка, как описано в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

В определенных вариантах осуществления предложен описанный в данном документе белок для применения в лечении синдрома Санфилиппо типа А у субъекта, нуждающегося в этом.

В определенных вариантах осуществления предложено применение белка, как описано в данном документе, в приготовлении лекарственного препарата для лечения синдрома Санфилиппо типа А у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления введение белка (например, связанного с ферментами SGSH) улучшает (например, увеличивает) C_{\max} SGSH в головном мозге по сравнению с поглощением SGSH в отсутствие связывания со слитым белком, описанным в данном документе, или по сравнению с поглощением SGSH, связанного с эталонным белком (например, слитым белком, как описано в данном документе, который не имеет модификаций второго полипептида Fc, которые приводят к связыванию TfR).

В некоторых вариантах осуществления C_{\max} SGSH в головном мозге улучшается (например, увеличивается) по меньшей мере приблизительно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3, 4, 5, 6 раз и более по сравнению с поглощением SGSH в отсутствие связывания со слитым белком, описанным в данном документе, или по сравнению с поглощением SGSH, связанного с эталонным белком (например, слитым белком, как описано в данном документе, который не имеет модификаций второго полипептида Fc, которые приводит к связыванию TfR).

Слитый белок, описанный в данном документе, вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве или дозе.

В различных вариантах осуществления слитый белок, описанный в данном документе, вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления белок вводят внутривенно.

В некоторых парентеральных вариантах осуществления слитый белок, как описано в данном документе, вводят внутривенно, подкожно, внутривенно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, как описано в данном документе, вводят внутривенно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, как описано в данном документе, вводят интратекально, например, путем эпидурального введения или интрацеребровентрикулярно.

В других вариантах осуществления слитый белок, как описано в данном документе, можно вводить перорально, путем ингаляционного, интраназального, интраокулярного или

местного введения. Также можно использовать ингаляционное введение, например, с помощью ингалятора или распылителя и состава в виде аэрозольного агента.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ

В других аспектах предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие слитый белок, описанный в данном документе.

Фармацевтические композиции

Руководство по приготовлению составов для применения в настоящем 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 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.

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

Наборы

В некоторых вариантах осуществления предложен набор для применения в лечении синдрома Санфилиппо типа А, содержащий слитый белок, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит слитый белок, как описано в данном документе, и дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтических агентов для применения в лечении неврологических симптомов синдрома Санфилиппо типа А. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит учебные материалы, содержащие указания (т. е. протоколы) для применения способов, описанных в данном документе (например, инструкции по применению набора для введения слитого белка, содержащего фермент SGSH, через гематоэнцефалический барьер). Хотя учебные материалы, как правило, содержат письменные или печатные материалы, это не ограничивается 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.

Некоторые определения

Употребляемые в данном документе 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», когда они используются для изменения количества, указанного в числовом значении или диапазоне, указывают, что числовое значение, а также разумные отклонения от значения, известные специалисту в данной области техники, например $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$, находятся в пределах предполагаемого значения указанного значения.

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. В некоторых вариантах осуществления человек представляет собой пациента, нуждающегося в лечении синдрома Санфилиппо типа А. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется один или более признаков или симптомов синдрома Санфилиппо типа А.

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

Термин «введение» относится к способу доставки агентов (например, терапевтического агента при синдроме Санфилиппо типа А, такого как терапия ETV:SGSH, описанная в данном документе), соединений или композиций (например, фармацевтической композиции) в желаемый участок биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, пероральную, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутривенную доставку, внутримышечную доставку, интратекальную доставку или внутрибрюшинную доставку. В одном варианте осуществления описанные в данном документе полипептиды вводят внутривенно.

Используемый в данном документе термин «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «лечение») относится к клиническому вмешательству, направленному на естественное течение болезни у индивида, проходящего лечение, и может проводиться либо для профилактики, либо во время курса клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния болезни, и ремиссию или улучшенный прогноз, но не ограничиваются ими.

Фраза «эффективное количество» означает количество соединения, описанного в данном документе, которое (i) лечит или предотвращает конкретное заболевание, патологическое состояние или нарушение, (ii) ослабляет, облегчает или устраняет один или

более симптомов конкретного заболевания, патологического состояния, или нарушения, или (iii) предотвращает или задерживает появление одного или более симптомов конкретного заболевания, патологического состояния или нарушения, описанных в данном документе.

«Терапевтически эффективное количество» субстанции/молекулы, описанное в данном документе, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивида, а также способности субстанции/молекулы вызывать желаемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество включает количество, при котором любые токсические или вредные эффекты субстанции/молекулы перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

В контексте данного документа термины «сульфоглюкозамин-сульфогидролаза», «N-сульфоглюкозамин-сульфогидролаза» или «SGSH» относятся к N-сульфоглюкозамин-сульфогидролазе (EC 3.10.1.1), которая представляет собой фермент, участвующий в лизосомальной деградации гепарансульфата. Мутации в этом гене связаны с синдромом Санфилиппо типа А, одним из типов лизосомальной болезни накопления, мукополисахаридоза III, который возникает в результате нарушения деградации гепарансульфата. Термин «SGSH», используемый в данном документе как компонент белка, который содержит полипептид Fc, является каталитически активным и охватывает функциональные варианты, включая аллельные и сплайс-варианты, SGSH дикого типа или его фрагмента. Последовательность SGSH человека доступна под записью UniProt P51688 и кодируется геном SGSH человека, локализованным в 17q25.3. Полноразмерная последовательность представлена как SEQ ID NO:58. «Зрелая» последовательность SGSH, используемая в данном документе, относится к форме полипептидной цепи, в которой отсутствует сигнальная последовательность встречающейся в природе полноразмерной полипептидной цепи. Аминокислотная последовательность зрелого полипептида SGSH человека представлена как SEQ ID NO: 59, что соответствует аминокислотам 21-502 полноразмерной последовательности человека. В контексте данного документа «усеченная» последовательность SGSH относится к каталитически активному фрагменту встречающейся в природе полноразмерной полипептидной цепи. Структура человеческого SGSH хорошо охарактеризована. Иллюстративная структура доступна под кодом доступа PDB 4MHX. Также были описаны последовательности SGSH отличных от человека приматов, включая шимпанзе (запись UniProt K7C218). Последовательность мышинового SGSH доступна под записью Uniprot Q9EQ08. Вариант SGSH имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%

или по меньшей мере 95% активности соответствующего SGSN дикого типа или его фрагмента, например, при анализе в идентичных условиях. Каталитически активный фрагмент SGSN имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% активности соответствующего полноразмерного SGSN или его варианта, например, при анализе в идентичных условиях.

В контексте данного документа термин «рецептор трансферрина» или «TfR» относится к белку 1 рецептора трансферрина. Полипептидная последовательность рецептора человеческого трансферрина 1 представлена в SEQ ID NO:10. Также известны последовательности белка 1 рецептора трансферрина от других видов (например, шимпанзе, номер доступа XP_003310238.1; макака-резус, NP_001244232.1; собака, NP_001003111.1; крупный рогатый скот, NP_001193506.1; мышь, NP_035768.1; крыса, NP_073203.1 и курица, NP_990587.1). Термин «рецептор трансферрина» также включает аллельные варианты иллюстративных эталонных последовательностей, например, человеческих последовательностей, которые кодируются геном в хромосомном локусе рецептора трансферринового белка 1. Полноразмерный белок рецептор трансферрина включает короткую N-концевую внутриклеточную область, трансмембранную область и большой внеклеточный домен. Внеклеточный домен характеризуется тремя доменами: протеазоподобным доменом, спиральным доменом и апикальным доменом. Последовательность апикального домена рецептора трансферрина 1 человека представлена в SEQ ID NO:11.

«Слитый белок» или «слитый белок [фермент SGSN]-Fc», используемый в данном документе, относится к димерному белку, содержащему первый полипептид Fc, который связан (например, слит) с ферментом SGSN, вариантом фермента SGSN или их каталитически активным фрагментом (т.е. «слитый полипептид [SGSN]-Fc»); и второй полипептид Fc, который образует димер Fc с первым полипептидом Fc. Второй полипептид Fc также может быть связан (например, слит) с ферментом SGSN, вариантом фермента SGSN или их каталитически активным фрагментом. Первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc могут быть связаны с ферментом SGSN, вариантом фермента SGSN или их каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. Первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc могут представлять собой модифицированный полипептид Fc, содержащий одну или более модификаций, которые способствуют его гетеродимеризации с другим полипептидом Fc. Первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc могут представлять собой модифицированный полипептид Fc, который содержит одну или более модификаций, обеспечивающих связывание с рецептором трансферрина. Первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc могут представлять собой модифицированный полипептид Fc, который содержит одну или более модификаций, снижающих эффекторную функцию. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и второй полипептид Fc не обладают эффекторной

функцией. Первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc могут представлять собой модифицированный полипептид Fc, который содержит одну или более модификаций, удлиняющих время полужизни в сыворотке. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc не содержит последовательность варибельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающую часть. В определенных вариантах осуществления первый полипептид Fc и второй полипептид Fc не содержат последовательность варибельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее антигенсвязывающую часть.

«Слитый полипептид» или «слитый полипептид [фермент SGSH]-Fc», используемый в данном документе, относится к полипептиду Fc, который связан (например, слит) с ферментом SGSH, вариантом фермента SGSH или их каталитически активным фрагментом. Полипептид Fc может быть связан с ферментом SGSH, вариантом фермента SGSH или их каталитически активным фрагментом пептидной связью или полипептидным линкером. Полипептид Fc может представлять собой модифицированный полипептид Fc, содержащий одну или более модификаций, которые способствуют его гетеродимеризации с другим полипептидом Fc. Полипептид Fc может быть модифицированным полипептидом Fc, который содержит одну или более модификаций, обеспечивающих связывание с рецептором трансферрина. Полипептид Fc может представлять собой модифицированный полипептид Fc, который содержит одну или более модификаций, снижающих эффекторную функцию. Полипептид Fc может представлять собой модифицированный полипептид Fc, который содержит одну или более модификаций, удлиняющих время полужизни в сыворотке.

В контексте данного документа термин «полипептид Fc» относится к C-концевой области встречающегося в природе полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, который характеризуется укладкой Ig в виде структурного домена. Полипептид Fc 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, полипептид Fc не содержит варибельную область.

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

Термин «FcRn» относится к неонатальному Fc-рецептору. Связывание полипептидов Fc с FcRn снижает клиренс и увеличивает время полужизни полипептида Fc в сыворотке. Белок FcRn человека представляет собой гетеродимер, который состоит из белка размером около 50 кДа, который подобен белку главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC), и β 2-микроглобулину размером около 15 кДа.

В контексте данного документа термин «сайт связывания FcRn» относится к области полипептида Fc, которая связывается с FcRn. В IgG человека сайт связывания FcRn, пронумерованный с использованием индекса EU, включает T250, L251, M252, I253, S254,

R255, T256, T307, E380, M428, H433, N434, H435 и Y436. Эти положения соответствуют положениям 20-26, 77, 150, 198 и 203-206 в SEQ ID NO:1.

В контексте данного документа термин «нативный сайт связывания FcRn» относится к области полипептида Fc, которая связывается с FcRn и имеет ту же аминокислотную последовательность, что и область встречающегося в природе полипептида Fc, которая связывается с FcRn.

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 положения 341 приблизительно до положения 447, пронумерованных в соответствии со схемой нумерацией EU, а полипептид домена CH2 относится к сегменту аминокислот приблизительно от положения 231 приблизительно до положения 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 области Fc иммуноглобулина. Область Fc относится к сегменту аминокислот приблизительно до положения 231 приблизительно до положения 447, пронумерованных в соответствии со схемой нумерации EU, но в контексте данного документа может включать по меньшей мере часть шарнирной области антитела. Иллюстративная последовательность шарнирной области представляет собой шарнирную последовательность человеческого IgG1 EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:5).

«Природный», «нативный» или «дикий тип» используется для описания объекта, который можно найти в природе, в отличие от искусственно созданного. Например, нуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирус), которая может быть выделена из природного источника и которая не была преднамеренно модифицирована в лаборатории, является природной. Кроме того, «дикий тип» относится к нормальному гену или организму, встречающемуся в природе без каких-либо известных мутаций.

Например, термины «дикий тип», «нативный» и «природный» по отношению к домену CH3 или CH2 используются в данном документе для обозначения домена, который имеет последовательность, которая встречается в природе.

В контексте данного документа термин «мутант», используемый в отношении мутантного полипептида или мутантного полинуклеотида, используется взаимозаменяемо с «вариантом». Вариант по отношению к заданной эталонной последовательности домена CH3 или CH2 дикого типа может включать встречающиеся в природе аллельные варианты. «Не встречающийся в природе» домен CH3 или CH2 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 аминокислотам природного и искусственного происхождения, а также к аналогам аминокислот и имитаторам аминокислот, которые функционируют подобно аминокислотам природного происхождения.

Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, закодированные генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицированы, 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. Стереизомеры 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.

Аминокислоты могут называться в данном документе либо своими обычно известными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, 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. из двух), или мультимеру (т. е. из трех или более) 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», включающую 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, 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%,

по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более, которые являются идентичными в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием алгоритма сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуальной проверки. В некоторых вариантах осуществления последовательность, которая имеет заданный процент идентичности относительно эталонной последовательности, отличается от эталонной последовательности одной или более консервативными заменами.

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 положению остатка указанной эталонной последовательности, когда заданную аминокислотную последовательность максимально выравнивают и сравнивают с эталонной последовательностью. Таким образом, например, аминокислотный остаток в модифицированном полипептиде Fc «соответствует» аминокислоте в SEQ ID NO:1, когда остаток выравнивается с аминокислотой в SEQ ID NO:1 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO:1. Полипептид, который выровнен по эталонной последовательности, не обязательно должен иметь ту же длину, что и эталонная последовательность.

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» взаимозаменяемо относятся к цепям нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в цепь ДНК- или РНК-полимеразой. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Примеры рассматриваемых в данном документе полинуклеотидов включают одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и гибридные молекулы, содержащие смеси одноцепочечной и двухцепочечной ДНК и РНК.

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 может быть определена количественно путем измерения равновесной константы диссоциации (K_D), которая относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ М⁻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.

В контексте данного документа термин «специфически связывается» или «селективно связывается» с мишенью, например, TfR, когда речь идет о сконструированном TfR-связывающем полипептиде, TfR-связывающем пептиде или TfR-связывающем антителе, как описано в данном документе, относится к реакции связывания, при которой сконструированный TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело связываются с мишенью с большей аффинностью, большей avidностью и/или большей продолжительностью, чем связываются с мишенью, имеющей другую структуру. В типичных вариантах осуществления сконструированный TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело имеют в по меньшей мере 5 раз, 10 раз, 50 раз, 100 раз, 1000 раз, 10000 раз или более большую аффинность к конкретной мишени, например, TfR, по сравнению с неродственной мишенью при проведении 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 сконструированный TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело специфически связывается с эпитопом на TfR, который является консервативным среди видов (например, структурно консервативным среди видов), например, консервативным среди отличных от человека приматов и человека (например, структурно консервативный между отличными от человека приматами и человеком). В некоторых вариантах осуществления сконструированный TfR-связывающий полипептид, TfR-связывающий пептид или TfR-связывающее антитело могут связываться исключительно с человеческим TfR.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену в

тяжелой цепи или легкой цепи антитела, полученному из гена вариабельности (V), гена разнообразия (D) или гена присоединения (J) зародышевой линии (и не происходит из генного сегмента константной области (C μ и C δ)), и это придает антителу его специфичность в отношении связывания с антигеном. Как правило, вариабельная область антитела включает четыре консервативные «каркасные» области, перемежающихся с тремя гипервариабельными «определяющими комплементарность областями».

Термины «антигенсвязывающая часть» и «антигенсвязывающий фрагмент» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном через его вариабельную область. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab (моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1), фрагмент F(ab')₂ (двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области), одноцепочечный Fv (scFv), связанный дисульфидной связью Fv (dsFv), определяющие комплементарность области (CDR), VL (вариабельную область легкой цепи) и VH (вариабельную область тяжелой цепи).

Следующие примеры не являются ограничивающими.

ПРИМЕР 1: Конструирование слитых белков, содержащих N-сульфоглюкозамин-сульфогидролазу (SGSH).

Дизайн и клонирование

Были сконструированы слитые белки SGSH-Fc, которые содержат (i) первый слитый полипептид, в котором зрелый фермент SGSH человека слит с фрагментом IgG1 человека, который включает область Fc («слитый полипептид SGSH-Fc»), и (ii) второй слитый полипептид, в котором зрелый фермент SGSH человека слит с модифицированным фрагментом IgG1 человека, который содержит мутации в области Fc, которые обеспечивают связывание с рецептором трансферрина (TfR) («модифицированный полипептид Fc»). В частности, были созданы слитые полипептиды SGSH-Fc, в которых фрагменты SGSH были слиты с N-концом области Fc IgG1 человека. В некоторых случаях между фрагментами SGSH и IgG1 помещали линкер для устранения любых стерических затруднений между двумя фрагментами. Во всех конструкциях сигнальный пептид MGWSCILFLVATATGAYA (SEQ ID NO: 121) был вставлен перед слиянием для облегчения секреции, а SGSH был усечен и состоял из аминокислот R21-L502 (UniProtKB ID - P51688). Используемый фрагмент области Fc IgG1 человека соответствует аминокислотам D104-K330 последовательности в UniProtKB ID P01857 (положения 221-447, нумерация EU, включая 10 аминокислот шарнира (положения 221-230)). Вторым слитым полипептидом, содержащим SGSH, слитым с модифицированным полипептидом Fc, совместно трансфицировали со слитым полипептидом SGSH-Fc для получения гетеродимерных слитых белков с двумя ферментами SGSH («бифункциональный фермент»). В некоторых конструкциях фрагменты IgG1 содержали дополнительные мутации для облегчения гетеродимеризации двух областей Fc. Соответственно,

используемые в примерах слитые белки SGSH-Fc, содержащие TfR-связывающее вещество, представляют собой димеры, образованные i) слитым полипептидом SGSH-Fc; и ii) слитым полипептидом SGSH-Fc, который связывает TfR, содержащий модифицированный полипептид Fc, слитый со второй молекулой SGSH («бифункциональный фермент»).

Аналогичным образом были разработаны и сконструированы контрольные слитые белки SGSH-Fc, в которых отсутствуют мутации, обеспечивающие связывание TfR. Был создан иллюстративный контрольный слитый белок SGSH-Fc, который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 61 и 63, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NOS: 69 и 71. Слитый белок SGSH-Fc также может подвергаться дополнительному процессингу во время получения клеточной культуры, так что первый слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 62 или 64 и/или второй слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 70 или 72. Таким образом, в контексте данного документа термин слитый белок SGSH-Fc можно использовать для обозначения белковых молекул, имеющих непроцессированные последовательности (т.е. SEQ ID NO: 61, 63, 69 и 71); белковых молекул, содержащих одну или более процессированных последовательностей (т.е. выбранных из SEQ ID NO: 62, 64, 70 и 72); или смеси, включающей процессированные и непроцессированные белковые молекулы.

Слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность зрелого человеческого SGSH, слитую с N-концом полипептидной последовательности IgG1 Fc с мутациями типа «впадина» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:61-64. Фермент SGSH был присоединен к полипептиду Fc с помощью линкера GGGGS (SEQ ID NO:8), и N-конец полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность зрелого человеческого SGSH, слитую с N-концом полипептидной последовательности IgG1 Fc с мутациями типа «впадина» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:73-76. Фермент SGSH был присоединен к полипептиду Fc с помощью линкера GS (SEQ ID NO:7), и N-конец полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность зрелого человеческого SGSH, слитую с N-концом полипептидной последовательности IgG1 Fc с мутациями типа «впадина» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:81-84. Фермент SGSH был присоединен к полипептиду Fc с помощью (GGGGSGGGGS) (SEQ ID NO:9), и N-конец полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSH-Fc, содержащий последовательность зрелого человеческого SGSH, слитую с N-концом полипептидной последовательности IgG1 Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:65-

68. Фермент SGSN был присоединен к полипептиду Fc с помощью линкера GGGGS (SEQ ID NO:8), и N-конец полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид Fc-SGSN, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности полипептида Fc IgG1 с мутациями типа «впадина» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:117-118. Фермент SGSN был присоединен к полипептиду Fc с помощью линкера GGGGS (SEQ ID NO:8), и N-конец полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSN-Fc, который связывает Tfr, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности Tfr-связывающего модифицированного полипептида Fc с мутациями типа «выступ» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:89- 92. Фермент SGSN был присоединен к модифицированному полипептиду Fc с помощью линкера GGGGS (SEQ ID NO:8), и N-конец модифицированного полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSN-Fc, который связывает Tfr, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности Tfr-связывающего модифицированного полипептида Fc с мутациями типа «выступ» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:101-104. Фермент SGSN был соединен с модифицированным полипептидом Fc линкером GS (SEQ ID NO:7), и N-конец модифицированного полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSN-Fc, который связывает Tfr, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности Tfr-связывающего модифицированного полипептида Fc с мутациями типа «выступ» и LALA, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:109- 112. Фермент SGSN был присоединен к модифицированному полипептиду Fc с помощью линкера GGGSGGGGS (SEQ ID NO:9), и N-конец модифицированного полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSN-Fc, который связывает Tfr, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности Tfr-связывающего модифицированного полипептида Fc с мутациями типа «выступ» и LALAPS, имеет последовательность любой из SEQ ID NO:93-96. Фермент SGSN был присоединен к модифицированному полипептиду Fc с помощью линкера GGGGS (SEQ ID NO:8), и N-конец модифицированного полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Слитый полипептид SGSN-Fc, который связывает Tfr, содержащий последовательность зрелого SGSN человека, слитую с N-концом последовательности Tfr-связывающего модифицированного полипептида Fc с мутациями типа «выступ» и LALA,

имеет последовательность любой из SEQ ID NO:119-120. Фермент SGSH был присоединен к модифицированному полипептиду Fc с помощью линкера GGGGS (SEQ ID NO:8), и N-конец модифицированного полипептида Fc включал часть шарнирной области IgG1 (DKTHTCPPCP; SEQ ID NO:6).

Был создан первый слитый белок SGSH-Fc «N-концевой бифункциональный фермент» («структура 1 бифункционального фермента ETV:SGSH»), который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:61 и 63, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 89 и 91. Слитый белок SGSH-Fc также может подвергаться дополнительному процессингу во время получения клеточной культуры, так что первый слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 62 или 64 и/или второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеет последовательность SEQ ID NO: 90 или 92. Таким образом, в контексте данного документа термин «структура 1 бифункционального фермента ETV:SGSH» может использоваться для обозначения белковых молекул, имеющих непроцессированные последовательности (т.е. SEQ ID NO: 61, 63, 89 и 91); белковых молекул, содержащих одну или более процессированных последовательностей (т.е. выбранных из SEQ ID NO: 62, 64, 90 и 92); или смеси, включающей процессированные и непроцессированные белковые молекулы.

Был создан второй слитый белок SGSH-Fc «N-концевой бифункциональный фермент» («структура 2 бифункционального фермента ETV:SGSH»), который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:73 и 75, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 101 и 103. Слитый белок SGSH-Fc также может подвергаться дополнительному процессингу во время получения клеточной культуры, так что первый слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO:74 или 76, и/или второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеет последовательность SEQ ID NO:102 или 104. Таким образом, в контексте данного документа термин «структура 2 бифункционального фермента ETV:SGSH» может использоваться для обозначения белковых молекул, имеющих непроцессированные последовательности (т.е. SEQ ID NO: 73, 75, 101 и 103); белковых молекул, содержащих одну или более процессированных последовательностей (т.е. выбранных из SEQ ID NO: 74, 76, 102 и 104); или смеси, включающей процессированные и непроцессированные белковые молекулы.

Был создан третий слитый белок SGSH-Fc «N-концевой бифункциональный фермент» («структура 3 бифункционального фермента ETV:SGSH»), который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:81 и 83, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 109 и 111. Слитый белок SGSH-Fc также может подвергаться дополнительному процессингу во время получения клеточной культуры, так что первый слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO:82 или 84,

и/или второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеет последовательность SEQ ID NO:110 или 112. Таким образом, в контексте данного документа термин «структура 3 бифункционального фермента ETV:SGSH» может использоваться для обозначения белковых молекул, имеющих непротессированные последовательности (т.е. SEQ ID NO: 81, 83, 109 и 111); белковых молекул, содержащих одну или более протессированных последовательностей (т.е. выбранных из SEQ ID NO: 82, 84, 110 и 112); или смеси, включающей протессированные и непротессированные белковые молекулы.

Был создан четвертый слитый белок SGSH-Fc «N-концевой бифункциональный фермент» («структура 4 бифункционального фермента ETV:SGSH»), который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:65 и 67, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 93 и 95. Слитый белок SGSH-Fc также может подвергаться дополнительному процессингу во время получения клеточной культуры, так что первый слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO:66 или 68, и/или второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеет последовательность SEQ ID NO:94 или 96. Таким образом, в контексте данного документа термин «структура 4 бифункционального фермента ETV:SGSH» может использоваться для обозначения белковых молекул, имеющих непротессированные последовательности (т.е. SEQ ID NO: 65, 67, 93 и 95); белковых молекул, содержащих одну или более протессированных последовательностей (т.е. выбранных из SEQ ID NO: 66, 68, 94 и 96); или смеси, включающей протессированные и непротессированные белковые молекулы.

Был создан слитый белок SGSH-Fc «N-концевой бифункциональный фермент» («структура 5 бифункционального фермента ETV:SGSH»), который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:117 и 118, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 119 и 120. Таким образом, в контексте данного документа термин «структура 5 бифункционального фермента ETV:SGSH» может использоваться для обозначения белковых молекул, содержащих SEQ ID NO:117 и 119; белковых молекул, содержащих SEQ ID NO: 118 и 120; или смеси, содержащей SEQ ID NO: 117 и/или 118 в комбинации с SEQ ID NO: 119 и/или 120.

Композицию, содержащую ETV:SGSH (например, структуру, описанную выше), можно использовать для обозначения композиции, содержащей белковые молекулы, имеющие непротессированные последовательности; белковым молекулам, содержащим одну или более протессированных последовательностей; или смеси, содержащей протессированные и непротессированные белковые молекулы.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка

Для экспрессии рекомбинантного фермента SGSH, слитого с областью Fc, клетки ExpіCHO (Thermo Fisher Scientific) трансфицировали соответствующими конструкциями ДНК с использованием набора для трансфекции Expifectamine™ CHO в соответствии с

инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). Клетки выращивали в среде для экспрессии ExpiCHO™ с добавками, как описано в протоколе производителя, при 37 °С, 5% CO₂ и 125 об/мин на орбитальном шейкере (Infors HT Multitron). Вкратце, логарифмически растущие клетки ExpiCHO™ трансфицировали при плотности 6×10⁶ клеток/мл 0,8 мкг общей ДНК-плазмиды на мл объема культуры. Культуры, экспрессирующие гибриды SGSN, совместно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей кофактор SUMF1, при соотношении плазмид 5:1 (SGSN:SUMF1). Закодированная последовательность SUMF1 описана в Genbank NM_182760. После трансфекции клетки помещали в условия 37°С, а трансфицированные культуры подпитывали, как указано, через 18-22 часа после трансфекции. Супернатанты трансфицированных клеточных культур собирали через 120 часов после трансфекции путем центрифугирования при 3500 об/мин в течение 20 минут. Осветленные супернатанты фильтровали (мембрана с диаметром пор 0,22 мкм) и хранили при 4 °С.

Слитые белки SGSN-Fc со сконструированными областями Fc (или без них), обеспечивающими связывание TfR, очищали из супернатантов клеточных культур с использованием аффинной хроматографии на основе белка А. Супернатанты загружали в аффинную колонку HiTrap MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare Life Sciences с использованием системы Akta Pure). Затем колонку промывали 10 объемами колонки (CV) PBS. Связанные белки элюировали, используя 50 mM буфер цитрата/NaOH, pH 3,6, содержащий 150 mM NaCl. Сразу после элюирования фракции нейтрализовали с помощью 1 M Tris pH8 (в разведении 1:7). Гомогенность слитых молекул SGSN-Fc в элюированных фракциях оценивали с помощью ряда методов, включая ДСН-ПААГ-электрофорез в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и ВЭЖХ-ЭХ.

ПРИМЕР 2: ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИТЫХ БЕЛКОВ SGSN.

Содержание формилглицина и М6Р в слитых белках

Чтобы охарактеризовать определенные свойства слитых белков SGSN-Fc, влияющие на ферментативную активность SGSN и транспорт слитых белков, оценивали содержание формилглицина (fGly) и содержание манноза-6-фосфата (М6Р) в слитых белках SGSN-Fc. Для анализа использовали N-концевой бифункциональный фермент ETV:SGSN (структура 1 бифункционального фермента) и контрольный слитый белок SGSN-Fc (без TfR-связывающего фрагмента), как описано в Примере 1.

Измерение содержания fGly. Идентичность и количество Cys- и FGly-содержащих пептидов одновременно оценивали с помощью ЖХ-МС/МС. Вкратце, ~20 мкг слитых белков SGSN восстанавливали гидрохлоридом трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР·HCl) и алкилировали йодацетамидом, а затем подвергали протеолитическому расщеплению трипсином (70 °С в течение 2 часов). Реакционные смеси, погашенные муравьиной кислотой, анализировали с помощью ЖХ-МС/МС. Количественный анализ пептидов проводили с помощью жидкостной хроматографии на UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, штат Калифорния, США), сопряженном с УФ/Вид и масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, штат Калифорния, США). Для

анализа образцы вводили на колонку CSH C18 (Waters Corporation, Милфорд, штат Массачусетс, США) при 40°C водой с подвижной фазой 0,1% муравьиной кислоты. Затем образцы подвергали линейному 45-минутному градиенту от %1В до 70%B, содержащему воду с 0,1% муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (В), соответственно. Масс-спектрометр работал в режиме полного сканирования масс-спектра в положительном режиме. Программное обеспечение Thermo Scientific Freestyle использовали для интеграции площади пика или так называемой площади под кривой (AUC). Были интегрированы три основных триптических пептида, содержащих цистеин SGSH в положении 70 (мотив CXPXR (SEQ ID NO:126)) следующим образом: (1) свободный Cys, NAFTSVSSCSPSR (SEQ ID NO:127) (2+, m/z 671,806); (2) алкилированный карбамидометил-Cys: NAFTSVSSC(CAM)SPSR (SEQ ID NO:128) (2+, m/z 700.317) и (3) пептид FGly: NAFTSVSS (Fgly) SPSR (SEQ ID NO:129) (2+, m/z 663.810). Рассчитанный % FGly основан на AUC трех пептидов FGly, деленной на сумму AUC FGly и свободных и алкилированных пептидов Cys и умноженной на 100. Было обнаружено, что содержание fGly в SGSH-Fc и ETV:SGSH оказалось сходным (Фиг. 2).

Измерение содержания манноза-6-фосфата (М6Р). Содержание М6Р в слитых белках SGSH-Fc измеряли при помощи анализа на основе метода жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии. Рекомбинантные очищенные белки (20 мкг) заменяли буфером на 50 mM ацетат аммония, pH 7,0. Было взято пять (5) мкг белка и добавлен меченный стабильным изотопом (SIL) ¹³C₆ манноза-6-фосфат (М6Р-IS, Omicronbio Inc, кат. № MAN-05, 125 нг на образец) в качестве внутреннего стандарта. К образцам белка добавляли 120 мкл 6,6 М раствора трифторуксусной кислоты и гидролизовали при 95°C с использованием нагревательного блока в течение 105 минут при встряхивании. Образец, высушенный потоком азота, затем промывали ацетонитрилом (ACN) и снова сушили. Конечные осадки, ресуспендированные в 50 мкл ACN:вода (20:80, об.:об.), анализировали с помощью ЖХ-МС/МС. Анализы М6Р проводили с помощью жидкостной хроматографии на UHPLC Vanquish (Thermo Scientific, штат Калифорния, США), сопряженном с УФ/Вид и масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, штат Калифорния, США). Образцы вводили в колонку VEN Amide (Waters) 1,9 мкм, 2,1x 150 мм при 60°C в режиме отрицательной ионизации в подвижной фазе из воды с 0,1% муравьиной кислоты и элюировали градиентом ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты. Данные были собраны с использованием параллельного мониторинга реакций (PRM) в отрицательном режиме, включая М6Р и внутренний стандарт (IS) М6Р, время включения от 1,6 до 2,2 мин, предшественники 259,0224 (М6Р) и 265,0426 (М6Р-IS). Соотношения AUC М6Р/М6Р-IS использовали для расчета молекулярного количества М6Р, высвобождаемого из белка, и получали моль М6Р на моль белка. Содержание М6Р в SGSH-Fc и ETV:SGSH представлено в таблице 1.

Таблица 1. Содержание манноза-6-фосфата в слитых белках

Молекула	М6Р (моль/моль)
ETV:SGSH	1,4

SGSH-Fc	1,2
---------	-----

Слитые белки SGSH-Fc со сконструированным сайтом связывания TfR связываются с TfR человека

Чтобы определить, влияют ли слитые белки SGSH-Fc со сконструированным TfR-связывающим веществом на способность модифицированного домена Fc взаимодействовать с человеческим TfR, аффинность структуры 1 бифункционального фермента ETV:SGSH (Пример 1) к человеческому TfR оценивали с использованием анализа методом поверхностного плазмонного резонанса Biacore™. Сенсорные чипы Biacore™ серии S CM5 иммобилизовали с помощью античеловеческого Fab (набор для захвата человеческого Fab от GE Healthcare). 5 мкг/мл слитых белков SGSH-Fc захватывали в течение 1 минуты в каждой проточной кювете и вводили серийные 3-кратные разведения человеческого апикального домена TfR со скоростью потока 30 мкл/мин. Каждый образец анализировали с 3-минутной ассоциацией и 3-минутной диссоциацией. После каждой инъекции чип регенерировали, используя 10 мМ глицин-HCl (pH 2,1). Ответ связывания корректировали путем вычитания RU из проточной кюветы, улавливающей нерелевантный IgG с аналогичной плотностью. Аффинность в стационарном состоянии была получена путем сопоставления ответа в равновесии с концентрацией с использованием программного обеспечения для оценки Biacore™ T200 v3.1. В анализе Biacore™ было установлено, что слитые белки SGSH-Fc с сайтом связывания TfR, сконструированным в области Fc, связываются с TfR человека. В частности, определено, что аффинность связывания структуры 1 бифункционального фермента ETV:SGSH с человеческим TfR составляет около 230 нМ.

Слитые белки SGSH-Fc со сконструированным сайтом связывания TfR активны in vitro и в клетках

In vitro и клеточную активность сконструированных TfR-связывающих слитых белков SGSH-Fc оценивали, чтобы продемонстрировать, что SGSH сохраняет свою ферментативную активность при слиянии с фрагментом IgG человека. Активность рекомбинантного SGSH *in vitro* измеряли с помощью двухэтапного флуорометрического ферментативного анализа с использованием искусственного субстрата. В частности, 20 мкл 1 мМ субстрата в виде натриевой соли 4-метилумбеллиферил-2-дезоксид-2-сульфамино-а-D-глюкопиранозида (Carbosynth Limited, #EM06602), разведенного в буфере для анализа (0,03 М ацетат натрия, 0,12 М NaCl, pH 6,5) смешивали с 10-20 мкл 140 нМ SGSH. Первую реакционную смесь инкубировали в течение 17 ч при 37 °С, а затем останавливали 10 мкл 0,2 М фосфатно-цитратного буфера, pH 6,7. Затем вторую реакцию инициировали добавлением 10 мкл (0,5 ЕД) дрожжевой α -глюкозидазы (Sigma, № G0660-750UN), инкубировали в течение 24 часов при 37°C и останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М натрий-карбонатного буфера, pH 10,3. Затем измеряли флуоресценцию реакционного раствора (возбуждение при 365 нм и эмиссия при 450 нм). Стандартную кривую 4-метилумбеллиферона аппроксимировали с помощью линейной регрессии для расчета количества продукта и подтвердили, что она составляет менее 10% от общего расщепления

субстрата. Удельную активность (фмоль продукта/мин/пмоль SGSH) рассчитывали путем деления количества продукта на время реакции и молярное количество SGSH.

Анализ ферментативной активности *in vitro* продемонстрировал, что слитые белки SGSH-Fc были активны и были сходны между Fc-SGSH (контроль; Пример 1) и ETV:SGSH (структура 1 бифункционального фермента; Пример 1) (Фиг. 3).

Клеточная активность слитых белков SGSH-Fc также была исследована в фибробластах пациентов с МПС IIIA и здоровых контролей с использованием анализа с вытеснением ^{35}S импульсного анализа, в котором ^{35}S интегрируется во вновь синтезированные ГАГ, как описано ранее (Boado et al., Mol. Pharm. 11(8): 2928-2934 [2014]). В фибробластах пациентов с МПС IIIA отсутствует активность SGSH, что приводит к повышенному накоплению сигнала ^{35}S . Слитые белки SGSH-Fc, в том числе ETV:SGSH (структура 1 бифункционального фермента), были высокоэффективны в клетках, полученных от пациентов с МПС IIIA, демонстрируя низкую пикомолярную клеточную EC_{50} для снижения накопления S^{35} -меченого материала (Фиг. 4).

Слитые белки SGSH-Fc со сконструированным сайтом связывания TfR демонстрируют улучшенную доставку в мозг на мышинной модели МПСIII

Чтобы определить, демонстрируют ли TfR-связывающие слитые белки SGSH-Fc улучшенную доставку в мозг по сравнению с контрольным слитым белком SGSH-Fc, мышам с нокином TfR человека (TfR^{mu/hu} KI) вводили 40 мг/кг TfR-связывающего слитого белка SGSH-Fc ETV:SGSH (структура 1 бифункционального фермента) или контрольный слитый белок SGSH-Fc, в котором отсутствуют мутации, обеспечивающие связывание TfR («SGSH:Fc») (см. Пример 1), а концентрацию слитого белка SGSH-Fc в печени и головном мозге измеряли с помощью сэндвич-анализа на основе ИФА через 2 и 8 часов после введения дозы. Слитые белки SGSH-Fc, которые использовали в анализе, описаны выше и были получены в соответствии с Примером 1 (обозначаемые в данном документе как ETV:SGSH (структура 1 бифункционального фермента) и контрольный SGSH-Fc). На 384-луночный планшет MaxiSorp™ (Thermo Scientific № 464718) наносили поликлональное ослиное захватывающее антитело к IgG человека, специфичное к фрагменту Fc (Jackson ImmunoResearch, № 709-006-098), в течение ночи. Планшет блокировали 5% BSA и затем инкубировали с разбавленными лизатами сыворотки, мозга и печени. Затем для детекции добавляли конъюгированное с HRP поликлональное козье антитело к IgG человека, специфичный к фрагменту Fc (Jackson ImmunoResearch, №109-036-098). Планшеты проявляли с использованием подложки TMB, останавливали серной кислотой, а оптическую плотность при 450 нм измеряли на планшетном ридере BioTek. Стандартные кривые представляли собой отдельные конструкции от 2000 до 2,74 пМ в серии 3-кратных разведений и аппроксимировали с использованием пятипараметрической логистической кривой. Мыши с нокином TfR^{mu/hu} были созданы, как описано в международной патентной публикации № WO 2018/152285, с использованием технологии CRISPR/Cas9 для экспрессии апикального домена *Tfrc* человека в гене мышинного *Tfrc*; полученный химерный TfR экспрессировали *in vivo* под контролем эндогенного промотора. Результаты

проиллюстрированы на Фиг. 5-7.

Введение TfR-связывающего слитого белка SGSH-Fc приводило к примерно 6-кратному увеличению поглощения мозгом по сравнению с контрольным слитым белком SGSH-Fc через 2 часа и примерно к 4-кратному увеличению концентрации в головном мозге через 8 часов после введения дозы (Фиг. 7). Накопление слитых белков в печени было одинаковым как для ETV:SGSH, так и для SGSH:Fc через 2 часа, но значительно уменьшилось (примерно в 30 раз) через 8 часов после введения дозы, при этом ETV:SGSH демонстрировал более низкие уровни по сравнению с SGSH:Fc (Фиг. 6). Концентрацию слитых белков в сыворотке измеряли с использованием сэндвич-анализа на основе ИФА, как описано выше, через 0,5, 1, 2, 4 и 8 часов после введения дозы. ФК в сыворотке был эквивалентен как для ETV:SGSH, так и для SGSH:Fc через 2 часа, но ETV:SGSH демонстрировал более низкие уровни по сравнению с SGSH:Fc между 2 и 8 часами после введения дозы (Фиг. 5). В то время как уровни TfR-связывающих слитых белков SGSH-Fc в головном мозге оставались повышенными в течение 8 часов по сравнению с контрольным слитым белком SGSH:Fc, более быстрый периферический клиренс может объяснять снижение концентраций в головном мозге и печени через 2-8 часов после введения дозы. Вместе эти данные демонстрируют, что взаимодействие TfR-связывающих слитых белков SGSH-Fc с TfR, как правило, поддерживает периферическое распределение, при этом значительно улучшая воздействие на головной мозг.

Внутривенное введение ETV:SGSH снижает уровень ГАГ в головном мозге

Для того чтобы проверить, привело ли улучшение воздействия на головной мозг, наблюдаемое при использовании TfR-связывающих слитых белков SGSH-Fc, описанных выше и приготовленных в соответствии с Примером 1 (упоминаемых в данном документе как ETV:SGSH) к соответствующему уменьшению уровня накопленных субстратов в головном мозге, была создана мышьяная модель, содержащая мутацию сульфамидазы, которая несет в себе апикальный домен TfR человека, который был подвергнут нокину в мышьяном TfR, (упоминаемая в данном документе как мыши *Sgsh^{mps3a}* x TfR^{mu/hu} KI, или альтернативно, как мыши SGSH^{D31N}; TfR^{mu/hu} KI). Мыши *Sgsh^{mps3a}*, имеющие новую мутацию сульфамидазы, D31N, были получены от The Jackson Laboratories (JAX Stock, №003780). Вкратце, самцов мышей TfR^{mu/hu} KI скрещивали с самками мышей, гетерозиготных по *Sgsh^{mps3a}*, для получения мышей, гомозиготных по мутации *Sgsh^{mps3a}* в гомозиготном фоне TfR^{mu/hu} KI. Мыши, которых использовали в этом исследовании, были разного пола и содержались в условиях 12-часового цикла свет-темнота со свободным доступом к пище (LabDiet JL/Irr 6F) и воде.

Мышам *Sgsh^{mps3a}* x TfR^{mu/hu} KI вводили однократную дозу 40 мг/кг массы тела ETV:SGSH (структура 1 бифункционального фермента) или SGSH-Fc посредством внутривенной инъекции и оценивали фармакодинамические ответы (см. Пример 1 в отношении слитых белков). В частности, влияние периферического введения ETV:SGSH на уровни ГС в печени, головном мозге и спинномозговой жидкости у мышей *Sgsh^{mps3a}* x TfR^{mu/hu} KI определяли с использованием 3-месячных мышей *Sgsh^{mps3a}* x TfR^{mu/hu} KI,

которым вводили внутривенно (в/в) солевой раствор, SGSH-Fc (40 мг/кг массы тела) или ETV:SGSH (40 мг/кг массы тела) (n=8/группа). 3-месячных однопометных мышей Tfr^{mu/lu} KI, которым вводили внутривенно солевой раствор, использовали в качестве контроля. Всех животных умерщвляли через 7 дней после однократной дозы, за исключением подгруппы мышей *Sgsh^{mps3a}* x Tfr^{mu/lu} KI, которым вводили ETV:SGSH (n=4) и которых умерщвляли через 3 дня после введения однократной дозы. Сыворотку, спинномозговую жидкость, печень и головной мозг собирали и мгновенно замораживали на сухом льду.

Дисахариды, производные гепарансульфата, измеряли *in vivo* с использованием методов на основе ЖХ-МС/МС, как описано ниже. Вкратце, все ткани и жидкости собирали, а затем немедленно замораживали и хранили при -80 °С. Аликвоты тканей (50 мг) гомогенизировали в воде (750 мкл) с использованием Qiagen TissueLyzer II в течение 3 минут при частоте 30 Гц. Гомогенат переносили в 96-луночный глубокий планшет и обрабатывали 10 импульсами по 1 секунде с помощью ультразвукового аппарата для одновременной обработки 96 образцов (Q Sonica). Обработанные ультразвуком гомогенаты вращали при 2500xg в течение 30 минут при 4°C для осаждения клеточного дебриса. Полученный лизат переносили в чистый 96-луночный глубокий планшет и выполняли ВСА для количественного определения общего белка. Гепарансульфат (ГС) в образцах расщепляли до соответствующих дисахаридов перед анализом ЖХ-МС/МС. 10 мкг общего белкового лизата или 3 мкл СМЖ инкубировали с гепариназами I, II и III в буфере для расщепления [111 mM NH₄OAc, 0,11 mM CaOAc, 2 mM DTT, pH 7,0] в течение 3 часов при встряхивании при 30°C в планшете для ПЦР. Через 3 часа к каждому образцу добавляли ЭДТА и 20 нг внутреннего стандарта D4UA-2S-GlcNCOEt-6S (HD009, Iduron Ltd, Манчестер, Великобритания) и смесь кипятили при 95°C в течение 10 минут для инактивации ферментов. Расщепленные образцы центрифугировали при 3,364xg в течение 5 минут, а супернатанты и переносили на фильтровальный планшет из ацетата целлюлозы (Millipore, MSUN03010) и центрифугировали при 3,364xg в течение 5 минут. Полученный элюент смешивали с равными частями ацетонитрила в стеклянных флаконах и анализировали с помощью масс-спектрометрии, как показано ниже.

Количественное определение дисахаридов, производных ГС, в жидкостях и тканях проводили с помощью жидкостной хроматографии (система Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Колумбия, штат Мэриленд, США) в сочетании с масс-спектрометрией с электрораспылением (Sciex 6500+ QTRAP, Sciex, Фрамингем, штат Массачусетс, США). Для каждого анализа образец вводили в колонку ACQUITY UPLC BEH Amide 1,7 мм, 2,1×150 мм (Waters Corporation, Милфорд, штат Массачусетс, США) со скоростью потока 0,4 мл/мин и температурой колонки 50°C. Подвижная фаза А состояла из воды с 10 mM формиата аммония и 0,1% муравьиной кислоты, а подвижная фаза В состояла из ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты. Градиент программировали следующим образом: 0,0-1,0 мин при 85% В, 1,0-5,0 мин от 85% В до 50% В, 5,0-6,0 мин от 50% В до 85% В, 6-8,0 мин выдержка при 85% В. Ионизацию электрораспылением проводили в режиме отрицательной ионизации при следующих настройках: газовая завеса при 30°C; газ

для соударений в условиях средней температуры; напряжение распыления ионов при -4500; температура 450°C; газ источника ионов 1-50; газ источника ионов 2-60. Сбор данных проводили с помощью Analyst 1.6.3 (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) со следующими настройками: минимальное время измерения 30 мс; энергия соударений -30; потенциал декластеризации -80; входной потенциал -10; напряжение на выходе ячейки соударений -10. Отдельные виды дисахаридов идентифицировали на основе их времени удерживания и переходов MRM с использованием коммерчески доступных эталонных стандартов (Iduron Ltd). Контролировали следующие переходы от одного дисахарида к другому: D0A0 (ГС), m/z 378,1 > 87,0; D0S0 (ГС), m/z 416,1 > 138,0; D4UA-2S-GlcNCOEt-6S (внутренний стандарт) m/z 472,0 > 97,0. Количества дисахаридов нормализовали к уровням общего белка, измеренным с помощью анализа ВСА, или к объему жидкости организма, использованной на образец.

Чтобы определить, снижает ли ETV:SGSH уровни субстрата в головном мозге, у мышей *Sgsh^{mps3a}* x *TfR^{mu/lu}* KI после однократного введения фермента оценивали уровни ГС. SGSH-Fc был неэффективен в снижении уровней ГС в головном мозге после однократной дозы (Фиг. 9). Однако ETV:SGSH снижал уровни ГС в головном мозге примерно на 50% и 57% через 3 дня и 7 дней после одной дозы, соответственно (Фиг. 9). Это привело к сопутствующему снижению уровней ГС в спинномозговой жидкости примерно на 70% и 80% через 3 дня и 7 дней после одной дозы, соответственно (Фиг. 10). Обе молекулы эффективно снижали уровни ГС в печени через одну неделю (Фиг. 8), демонстрируя, что связывание TfR не оказывает негативного влияния на фармакодинамические ответы в этих тканях. Данные на Фиг. 8-10 представлено средним значением +/- стандартная ошибка среднего (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, н.з.=не значимо). В совокупности эти данные демонстрируют, что ETV:SGSH значительно увеличивает воздействие фермента на головной мозг и значительно снижает накопление субстрата как на периферии, так и в ЦНС.

ПРИМЕР 3: Характеристика качества продукции структур бифункциональных ферментов ETV:SGSH.

Различные структуры бифункциональных ферментов в виде слитых белков ETV:SGSH оценивали с точки зрения качества продукта. В этом исследовании структуру 1 бифункционального фермента ETV:SGSH (Пример 1) сравнивали со структурой, имеющей другую TfR-связывающую область Fc (структуру 6 бифункционального фермента ETV:SGSH, описанную ниже). Обе структуры были получены, как описано в Примере 1, с дополнительными стадиями очистки, как описано ниже.

Результаты

Измеренная аффинность человеческого TfR к структуре 1 бифункционального фермента и структуре 6 бифункционального фермента была сопоставимой (K_D около 290 нМ против около 245 нМ, соответственно).

Было определено, что титр экспрессии для структуры 1 бифункционального фермента составляет около 30-40 мг/л, тогда как титр экспрессии для структуры 6

бифункционального фермента был немного меньше (около 12-23 мг/л).

После хроматографической очистки белком А было проведено извлечение структуры 1 бифункционального фермента и структуры 6 бифункционального фермента. Анализ полученных после очистки белком А пулов как структуры 1 бифункционального фермента, так и структуры 6 бифункционального фермента продемонстрировал около 50-60% чистоты (по данным ВЭЖХ-ЭХ) с интактной структурой ETV (сохранение модифицированного димера Fc, состоящего из пары выступов и впадин) по меньшей мере около 80%. Полученные после очистки белком А пулы обеих структур бифункционального фермента подвергали хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) для дальнейшей завершающей очистки (описано ниже). Пулы структуры 1 бифункционального фермента после HIC достигли уровня чистоты > 95% (по данным ВЭЖХ-ЭХ) с интактной структурой ETV > 90%, в то время как пулы структуры 6 бифункционального фермента после HIC достигли уровней чистоты около 85% (по данным измерено с помощью ВЭЖХ-ЭХ) с интактной структурой ETV >90%. Для достижения более высоких уровней чистоты (> 90%) для структуры 6 бифункционального фермента необходимы дополнительные стадии очистки, что может привести к снижению выхода и извлечения белка после очистки.

Соответственно, структура 1 бифункционального фермента и ее вариант P329S (структура 4 бифункционального фермента) были определены как предпочтительные структуры для перехода к крупномасштабному производству.

Экспериментальные методы

Был создан шестой слитый белок SGSH-Fc «N-концевой бифункциональный фермент» («структура 6 бифункционального фермента ETV:SGSH»), который содержал первый слитый полипептид SGSH-Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO:61 и 63, и второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 122 и 124. Слитый белок SGSH-Fc также может подвергаться дополнительному процессингу во время получения клеточной культуры, так что первый слитый полипептид SGSH-Fc имеет последовательность SEQ ID NO:62 или 64, и/или второй слитый полипептид SGSH-Fc, который связывает TfR, имеет последовательность SEQ ID NO:123 или 125. Таким образом, в контексте данного документа термин «структура 6 бифункционального фермента ETV:SGSH» может использоваться для обозначения белковых молекул, имеющих непроцессированные последовательности (т.е. SEQ ID NO: 61, 63, 122 и 124); белковых молекул, содержащих одну или более процессированных последовательностей (т.е. выбранных из SEQ ID NO: 62, 64, 123 и 125); или смеси, включающей процессированные и непроцессированные белковые молекулы.

Структуру 1 бифункционального фермента ETV:SGSH и структуру 6 бифункционального фермента ETV:SGSH экспрессировали и очищали как описано в Примере 1 со следующей модификацией: нейтрализацию объединенных белковых фракций, элюированных с аффинной колонки с белком А, проводили с помощью 1M Tris pH 8,0 до целевого pH 6,0. Затем пул нейтрализованного белка А кондиционировали 1 M

цитратом натрия до конечной концентрации 0,6 М цитрата натрия. Объединенные фракции загружали в колонку для хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) ButylHP, промывали 0,6 М цитратом натрия (рН 6,0) и элюировали с помощью (i) 50% ступенчатого градиента 0,6 М цитрата натрия (рН 6,0) до ВДИ 10 объемами колонки с последующим (ii) 100% ступенчатым градиентом от 0,6 М цитрата натрия (рН 6,0) до ВДИ 5 объемами колонки.

Гомогенность слитых белков ETV:SGSH в элюированных фракциях оценивали с помощью ряда методов, включая ДСН-ПААГ-электрофорез в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и ВЭЖХ-ЭХ. Аффинность к TfR человека измеряли, как описано в Примере 2.

ПРИМЕР 4: Внутривенное введение различных структур бифункционального фермента в виде ETV:SGSH обеспечивает сопоставимое снижение содержания ГАГ в головном мозге.

Различные структуры бифункциональных ферментов в виде слитых белков ETV:SGSH оценивали с точки зрения влияния на уровни ГАГ в головном мозге на мышинной модели МПС III. В этом исследовании структура 1 бифункционального фермента ETV:SGSH сравнивали с соответствующей структурой, которая содержит мутацию Р329S в области Fc (структура 4 бифункционального фермента ETV:SGSH).

Результаты

Структуры бифункциональных ферментов анализировали на содержание формилглицина (fGly), содержание манноза-6-фосфата (М6Р) и аффинности к TfR человека с использованием способов, описанных в Примере 2. В таблице 2 представлены результаты анализа для каждой структуры бифункционального фермента. Объединенные после НІС фракции структуры 1 бифункционального фермента и структуры 4 бифункционального фермента достигли уровней чистоты > 95% (согласно данным ВЭЖХ-ЭХ) с интактной структурой ETV > 90%.

Таблица 2. Характеристики белка ETV:SGSH

Молекула	fGly	М6Р (моль/моль)	Аффинность к TfR (K _D)
Структура 1 бифункционального фермента	98%	4,05	290 нМ
Структура 4 бифункционального фермента	99%	2,93	340 нМ

Для определения того, снижают ли структуры ETV:SGSH уровни субстрата в головном мозге, уровни ГС оценивали у мышей *Sgsh^{mps3a}* x TfR^{mu/hu} KI после введения однократной дозы белка ETV:SGSH. Как структура 1 бифункционального фермента ETV:SGSH, так и структура 4 бифункционального фермента ETV:SGSH снижали уровни

ГС в головном мозге примерно на 63% и 59% через 7 дней после одной дозы, соответственно (Фиг. 11). Данные на Фиг. 11 представлены средним значением +/- стандартная ошибка среднего значения. Эти данные демонстрируют, что обе структуры бифункционального фермента ETV:SGSH надежно снижают накопление субстрата в головном мозге. Поглощение головном мозгом обеих структур бифункционального фермента через 7 дней после введения дозы было обнаружено и количественно определено как превышающее 0,5 нМ в тканях головного мозга, отобранных из каждой когорты.

Экспериментальные методы

Структуру 1 бифункционального фермента ETV:SGSH экспрессировали и очищали, как описано в Примере 3.

Структуру 4 бифункционального фермента ETV:SGSH экспрессировали из стабильных линий клеток CHO, которые трансфицировали соответствующими конструкциями ДНК и отбирали путем оценки титра экспрессии, стабильности и активности экспрессированных и очищенных белков. Вкратце, нокаутную по GS линию клеток CHO-K1 (Horizon Discovery) трансфицировали соответствующими конструкциями ДНК (котрансфекция плазмидами, кодирующими слитый белок и SUMF1), с последующей селекцией для получения стабильной линии клеток, экспрессирующей представляющей интерес ген. Затем линию клеток подпитывали коммерческой средой для периодического культивирования клеток CHO с подпиткой (например, средой BalanCD CHO (Irvine Scientific), необязательно дополненной BalanCD CHO Feed 4 (Irvine Scientific)). Культуру поддерживали при 37°C в течение 5 дней с последующим сдвигом температуры до 32°C. После сбора на 12-й день культуру клеток центрифугировали, а супернатант фильтровали в стерильных условиях через имеющийся в продаже (мембранный фильтр с диаметром пор 0,8 мкм/0,2 мкм) и хранили при 4°C. Слитый белок очищали из супернатантов клеточных культур с использованием аффинной хроматографии на основе белка А и хроматографии гидрофобного взаимодействия. Супернатанты загружали в препаративную, аффинную колонку MabSelect SuRe LX Protein A (GE Healthcare Life Sciences с использованием системы Akta Pure). Затем колонку промывали 2 объемами колонки (CV) PBS, затем 4 CV 0,4 М фосфата калия, pH 7,0, а затем 3 CV PBS. Связанные белки элюировали, используя 50 мМ буфер на основе цитрата/NaOH, pH 3,7. Сразу после элюирования фракции нейтрализовали с помощью 1,5 М Tris pH 11 до целевого pH 6,0. Пулы нейтрализованного белка А доводили 1 М цитратом натрия до pH 6,0 в соотношении 1:1,3 перед хроматографией гидрофобного взаимодействия. Пул белка А после коррекции кислотности загружали в колонку для хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) ButylHP, промывали 0,6 М цитратом натрия, pH 6,0, а затем элюировали градиентом 20-55% от 0,6 М цитрата натрия до ВДИ 25 CV. Гомогенность слитого белка в элюированных фракциях оценивали с помощью ряда методов, включая ДСН-ПААГ-электрофорез в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и ВЭЖХ-ЭХ.

Слитые белки анализировали на содержание формилглицина (fGly), содержание М6Р и аффинность к TfR с использованием методов, описанных в Примере 2.

Мышам *Sgsh^{mps3a}* x *TfR^{mu/hu}* KI (Пример 2) вводили однократную дозу структуры 1 бифункционального фермента ETV:SGSH или ETV:SGSH посредством внутривенной инъекции, после чего оценивали воздействие на головной мозг и фармакодинамические ответы. Влияние периферического введения структур бифункционального фермента ETV:SGSH на уровни ГС в головном мозге у мышей *Sgsh^{mps3a}* x *TfR^{mu/hu}* KI определяли на 9-месячных мышях *Sgsh^{mps3a}* x *TfR^{mu/hu}* KI, которым вводили внутривенно (в/в) солевой раствор, структуру 1 бифункционального фермента ETV:SGSH (15 мг/кг массы тела) или структуру 4 бифункционального фермента ETV:SGSH (15 мг/кг массы тела) (n=4-5/группа). Девятимесячных однопометных мышей *TfR^{mu/hu}* KI (мышам без МПС III), которым внутривенно вводили солевой раствор, использовали в качестве контроля. Всех животных умерщвляли через 7 дней после однократной дозы. Ткань головного мозга собирали и быстро замораживали на сухом льду. Поглощение головным мозгом ETV:SGSH и дисахаридов, производных гепарансульфата, измеряли, как описано в Примере 2.

Неформальный перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Последовательность	Описание
1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	Последовательность Fc человека дикого типа положения 231-447 согласно нумерации по индексу EU
2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	Последовательность Fc человека дикого типа положения 231-446 согласно нумерации по индексу EU
3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAK	Последовательность домена CH2 положения 231-340 согласно нумерации по индексу EU

4	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	Последовательность домена CH3 Положения 341-447 согласно нумерации по индексу EU
5	EPKSCDKTHTCPPCP	Аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1 человека
6	DKTHTCPPCP	Часть шарнирной последовательности IgG1 человека
7	GS	Линкер GS
8	GGGGS	Богатый глицином линкер
9	GGGGSGGGGS	Богатый глицином линкер
10	MMDQARSAFNSLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN HVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICY GTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGT ESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTD FTGTIKLLNENSYVPREAGSQDENLALYVENQFR EFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRL VYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDF EDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGV LIYMDQTKFPIVNAELSFHGHHLGTGDPYTPGFPS FNHTQFPSSRSSLNIPVQTISRAAAEKLFGNMEG DCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKI LNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAASKG VGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSRIFASWSA GDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLG TSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQD SNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDT DYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQ FVIKLTHTDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRAD	Белок 1 трансферринового рецептора человека (TFR1)

	IKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKT DRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRRHVF WGS GSHTLPALLENLKLKQNNGAFNETLFRNQL ALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF	
11	NSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKL VHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKV ANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLG TGDPYTPGPFPSFNHTQFPSSRSSLNIPVQTISRAA AEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKL TVS	Апикальный домен TfR человека
12	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина»
13	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина»
14	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALA
15	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALA

	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	
16	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPG
17	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPG
18	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS
19	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS
24	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV	Последовательность Fc с мутацией типа «выступ»

	KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
25	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	Последовательность Fc с мутацией типа «выступ»
26	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «выступ» и LALA
27	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	Последовательность Fc с мутациями типа «выступ» и LALA
28	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALA и частью шарнирной последовательности IgG1 человека
29	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALA и частью шарнирной

	KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	последовательности IgG1 человека
30	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS и частью шарнирной последовательности IgG1 человека
31	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	Последовательность Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS и частью шарнирной последовательности IgG1 человека
32	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSDGSF LYSKLTVTKKEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2
33	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSDGSF LYSKLTVTKKEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2
34	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV	Клон CH3C.35.23.2 с мутацией типа «выступ»

	KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
35	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутацией типа «выступ»
36	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA
37	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA
38	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPG
39	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPG

	KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	
40	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS
41	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS
48	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина»
49	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина»
50	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA

	GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
51	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA
52	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
53	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALAPG
54	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQK SLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA, и частью шарнирной последовательности IgG1 человека
55	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA, и частью шарнирной

	KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	последовательности IgG1 человека
56	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS и частью шарнирной последовательности IgG1 человека
57	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS и частью шарнирной последовательности IgG1 человека
58	MSCPVPACCALLLVLGLCRARPRNALLLADDGGF ESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCS PSRASLLTGLPQHQNGLMYGLHQDVHHFNSFDKVR SLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPDFAYTEE NGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFYVAF HDPHRCGHSQPQYGTFCFKGNGESGMGRIPDWTP QAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRM DQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPSGR TNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYVSLLD LTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALEAE PLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHN LNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWY KDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLATDPRFA QLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKL SPQCQPLHNEL	Полноразмерная полипептидная последовательность сульфоглюкозамин- сульфогидролазы человека
59	RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR RSLLFRNAFTSVSSCSRASLLTGLPQHQNGLMYGL HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV	Полипептидная последовательность зрелой

	<p>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN DTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH PKRWGQVSEAYVSLDDLPTILDWFSIPYPSYAIFG SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF QDLLNRRTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDR SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNEL</p>	<p>сульфоглюкозамин- сульфогидролазы человека</p>
60	<p>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR RSLLFNAFTSVSS <u>fG</u>SPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV AFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKFGNGESGMGRIPD WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV GRMDQGVGLVLQELRDAGVLN DTLVIFTSDNGIPF PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV SLDDLPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRRTAGQP TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV LEEKLSPOCQPLHNEL</p>	<p>Полипептидная последовательность зрелой сульфоглюкозамин- сульфогидролазы человека (остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием)</p>
61	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFNAFTSVSS</u><u>CS</u><u>SPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDDLPTILDWFSIPYPSYAIFG</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа</p>

	<u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV</u> <u>LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u>	«впадина» и LALA
62	<u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFDAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFK</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV</u> <u>LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPG</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA
63	<u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой

	<p><u>fGSPSRASLLTGLPQHQN</u><u>GM</u><u>YGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVY</u><u>PFDFAYT</u> <u>EENG</u><u>SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGT</u><u>FCEKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGR</u><u>TNLYWPGTAEPLL</u><u>VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNR</u><u>TTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYR</u><u>ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGS</u><u>DKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV</u> <u>SLT</u><u>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL</u> <u>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS</u> <u>PGK</u></p>	<p>последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALA</p>
64	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHQN</u><u>GM</u><u>YGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVY</u><u>PFDFAYT</u> <u>EENG</u><u>SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGT</u><u>FCEKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGR</u><u>TNLYWPGTAEPLL</u><u>VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNR</u><u>TTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYR</u><u>ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGS</u><u>DKTHTCPPCPAPEA</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALA</p>

	<p>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PG</p>	
65	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKE</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV</u> <u>LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS</p>
66	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKE</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G4S, слитым с N-концом</p>

	<p><u>DTLVIFTS DNGIPFPSGR TNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDL TPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNR TTAGOPTGWYKDLRHYYR ARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGGGSDK</u> THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALAPS</p>
67	<p><u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVYPFDFAYT</u> <u>EENG SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTS DNGIPE</u> <u>PSGR TNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDL TPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNR TTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYR ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALAPS</p>

	PGK	
68	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIAIAPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVYDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSQCQPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL</u> <u>TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLS</u> <u>PG</u>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALAPS</p>
69	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIAIAPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYVYDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTDQDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKF</u> <u>NGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPEPSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHP</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA</p>

	<u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDK</u> THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
70	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>NGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDK</u> THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA
71	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто);

	<p><u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL</u> <u>TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS</u> <u>PGK</u></p>	<p>остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «выступ» и LALA</p>
72	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIAIAPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDORPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G4S, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «выступ» и LALA</p>

	<p>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG</p>	
73	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGSDKTHT</u> CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA</p>
74	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

	<p><u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGSDKTHT</u> <u>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u> <u>SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL</u> <u>DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPG</u></p>	
75	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVTVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCPLHNELGSDKTHTCPPCPAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLVSKLTVDK</u> <u>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALA</p>
76	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность</p>

	<p><u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVY PFDFA YT</u> <u>EENG SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFC EKFNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGR TNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYR ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLS PQCQPLHNELGSDKTHTCPPEAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK</u> <u>SRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALA</p>
77	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSL LFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVH HFN SFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVY PFDFA YTEENG SVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFC EKF</u> <u>NGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFPSGR TNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYV SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFR LVHNLFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYR ARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLS PQCQPLHNELGSDKTHT</u> <u>CPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA</p>

	<p>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>	
78	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFDAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNIGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGSDKTHT</u> CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
79	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPDFDAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNIGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS,</p>

	<u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGSDKTHTCPPCPAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</u>	слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA
80	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGSDKTHTCPPCPAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPG</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA
81	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность

	<p><u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGGGGSGG</u> GGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA</p>
82	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGGGGSGG</u> GGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

	<p>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
83	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYPFDFAIT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFLLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> <u>PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF</u> <u>FLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV MHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALA</p>
84	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYPFDFAIT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFLLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSPEHPKRWGQVSEAYV</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с</p>

	<p><u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> <u>PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFSF</u> <u>FLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPG</u></p>	<p>линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «впадина» и LALA</p>
85	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNDGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFR</u><u>L</u><u>VHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGG</u> <u>GGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE</u> <u>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTTPVLDSGFSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
86	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u></p>	<p>Слитый полипептид</p>

	<p><u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>NGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNIGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGGGGSGG</u> <u>GGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE</u> <u>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</u> <u>KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
87	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u><u>DTLVIFTSDNIGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «выступ» и LALA</p>

	<p>PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>	
88	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYVDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLOELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT QKSLSLSPG</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом последовательности Fc с мутациями «выступ» и LALA</p>
89	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYVDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G₄S,</p>

	<p><u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
90	<p><u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEA</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>

	LHNHYTQKSLSLSPG	
91	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVYDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFLLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSQCQPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESYGTEWANYKTTPLDSDGSFFLYSK</u> <u>LTVTKEEWQQGFVFSVSMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>SPGK</u>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
92	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVYDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFLLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с</p>

	<u>TGWYKDLRHYYYR</u> <u>ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSK</u> <u>LTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>SPG</u>	мутациями типа «выступ» и LALA
93	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKE</u> <u>NGGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNDGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGOPTGWYKDLRHYYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTP</u> <u>VLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPGK</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G ₄ S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS
94	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека

	<p><u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNIGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALSAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPP</u> <u>VLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEA</u> <u>LHNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>(подчеркнуто) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS</p>
95	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVDFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNIGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRL</u> <u>VHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LVTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKA</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS</p>

	<p>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK</p>	
96	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG</p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALAPS</p>
97	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKF</u> <u>NGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа</p>

	<u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPV</u> <u>LDSDGSFFLVSKLTVTKKEWQQGFVFSVMSHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u>	«впадина» и LALA
98	<u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFDAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFK</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGSDK</u> <u>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ</u> <u>VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPV</u> <u>LDSDGSFFLVSKLTVTKKEWQQGFVFSVMSHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPG</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G ₄ S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA
99	<u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой

	<u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVYPFDFAYT</u> <u>EENG SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</u> <u>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA</u> <u>KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP</u> <u>SDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFFLVSK</u> <u>LTVTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>SPGK</u>	<p>последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>
100	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVYPFDFAYT</u> <u>EENG SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

	<p>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSK LTVTKEEWQQGFVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG</p>	
101	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKE</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNDGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGSDKTHT</u> <u>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u> <u>SLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTTPV</u> <u>LDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSVMSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
102	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHNFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKE</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом</p>

	<p><u>DTLVIFTS DNGIPFPSGR TNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDL TPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNR TTAGOPTGWYKDLRHYYR ARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLS PQCQPLHNELGSDKTHT</u> <u>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u> <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u> <u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u> <u>SLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPV</u> <u>LDS DGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
103	<p><u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVYPFDFAYT</u> <u>EENG SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTS DNGIPE</u> <u>PSGR TNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDL TPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNR TTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYR ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLS PQCQPLHNELGSDKTHTCPPCPAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT</u> <u>KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>

104	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCPLHNELGSDKTHTCPPCAPEAAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA</u> <u>VEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT</u> <u>KEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
105	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENG SVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFR LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCPLHNELGSDKTHT</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

	<p> CPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK </p>	
106	<p> <u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKE</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSNNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGSDKTHT</u> CPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG </p>	<p> Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA </p>
107	<p> <u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKEFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> </p>	<p> Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто); остаток формилглицина «fG» </p>

	<p><u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGSDKTHTCPPCAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK</u> <u>EEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>
108	<p><u>RPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVTVYDFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFLLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGSDKTHTCPPCAPEAAGGP</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP</u> <u>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK</u> <u>EEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером GS, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

109	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGG</u> <u>GGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE</u> <u>LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY</u> <u>KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
110	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLL VSSPEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGG</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>

	GGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
111	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYVDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLOELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G ₄ S) ₂ , слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA
112	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYVDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток

	<p><u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> <u>PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGS</u> <u>FFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFCSSVMHEALHNHYT</u> <u>QKSLSLSPG</u></p>	<p>формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
113	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFDAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEH</u> <u>PKRWGQVSEAYVLSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRVLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRTTAGOPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGG</u> <u>GGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE</u> <u>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

	<p>KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
114	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHONGMYGL</u> <u>HQDVHHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHV</u> <u>GPETVYPDFDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKF</u> <u>LQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKF</u> <u>GNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPA</u> <u>ARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNIGIPFSPGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPH</u> <u>PKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFG</u> <u>SKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMS</u> <u>YPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTF</u> <u>QDLLNRRTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDR</u> <u>SRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWOWET</u> <u>HDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGG</u> <u>GGSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE</u> <u>LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY</u> <u>KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA</p>
115	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPDFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCCKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLN</u> <u>DTLVIFTSDNIGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEPHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRRTAGQP</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G₄S)₂, слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с</p>

	<u>TGWYKDLRHYYYR</u> <u>ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> <u>PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLVSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u>	мутациями типа «впадина» и LALA
116	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIA</u> <u>TPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVTVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTDQDRPFLLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYYR</u> <u>ARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGGSGGGGSDKTHTCPPC</u> <u>PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u> <u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAV</u> <u>KGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPPVLDSDGSF</u> <u>FLVSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPG</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером (G ₄ S) ₂ , слитым с N-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «впадина» и LALA
117	<u>DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT</u> <u>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</u>	Слитый полипептид Fc-SGSH со зрелой последовательность

	<p>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSRPRNALLLLADDG <u>GFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSS</u> <u>CSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYVDFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNEL</u></p>	<p>ю SGSH человека (подчеркнуто), слитой с С-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA</p>
118	<p>DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSRPRNALLLLADDG <u>GFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPELVYVDFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u></p>	<p>Слитый полипептид Fc-SGSH со зрелой последовательностью ю SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием), слитой с С-концом последовательности Fc с мутациями типа «впадина» и LALA</p>

	<u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNEL</u>	
119	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSRPRNALLLADD <u>GGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVS</u> <u>SCSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVY PFDFA Y T</u> <u>EENG SVLQVGRNITRIKLLVRKFLQ TQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPE</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNEL</u>	Слитый полипептид Fc-SGSH со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто), слитой с С-концом клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA
120	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSRPRNALLLADD <u>GGFESGAYNNSAIATPHLDALARRSLLFRNAFTSVS</u> <u>SfGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFD</u> <u>KVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPE TVY PFDFA Y</u>	Слитый полипептид Fc-SGSH со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто); остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием), слитой с С-концом

	<u>TEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLY</u> <u>VAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNEL</u>	клона CH3C.35.23.2 с мутациями типа «выступ» и LALA
121	MGWSCILFLVATATGAYA	Сигнальный пептид секреции
122	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSC</u> <u>SPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDKV</u> <u>RSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVDFAYTE</u> <u>ENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVA</u> <u>FHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPDWT</u> <u>PQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGR</u> <u>MDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPS</u> <u>GRNTLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYVSL</u> <u>LDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALE</u> <u>AEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVLHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTG</u> <u>WYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLATDP</u> <u>RFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLE</u> <u>EKLSPOCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</u> <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS</u> <u>DIAVLWESYGTWSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательность ю SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G ₄ S, слитым с N-концом клона CH3C.35.21.17 с мутациями типа «выступ» и LALA

123	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSSC</u> <u>SPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDKV</u> <u>RSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYTE</u> <u>ENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVA</u> <u>FHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPDWT</u> <u>PQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGR</u> <u>MDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPS</u> <u>GRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYVSL</u> <u>LDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALE</u> <u>AEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>HNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGOPTG</u> <u>WYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLATDP</u> <u>RFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLE</u> <u>EKLSPQCQPLHNELGGGGSDKTHTCPPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</u> <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV</u> <u>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK</u> <u>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS</u> <u>DIAVLWESYGTEWSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VTKEEWQQGFVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>G</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.21.17 с мутациями типа «выступ» и LALA</p>
124	<p><u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKFGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRTNLYWPGTAEPLLVSSEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u></p>	<p>Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G₄S, слитым с N-концом клона CH3C.35.21.17 с мутациями типа</p>

	<u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVLWESYGTEWSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVTKEEWQQGFVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	«выступ» и LALA
125	<u>RPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALAR</u> <u>RSLLFRNAFTSVSS</u> <u>fGSPSRASLLTGLPQHONGMYGLHQDVHHFNSFDK</u> <u>VRSLPLLSQAGVRTGIIGKKHVGPETVYPFDFAYT</u> <u>EENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYV</u> <u>AFHDPHRCGHSOPQYGTFCFKGNGESGMGRIPD</u> <u>WTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTV</u> <u>GRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPF</u> <u>PSGRNTLYWPGTAEPLLVSSPEHPKRWGQVSEAYV</u> <u>SLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPA</u> <u>LEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFR</u> <u>LVHNLNFKMPFPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQP</u> <u>TGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPHETQNLAT</u> <u>DPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGV</u> <u>LEEKLSPOCQPLHNELGGGSDKTHTCPPCPAPEA</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVLWESYGTEWSSYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVTKEEWQQGFVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP G	Слитый полипептид SGSH-Fc со зрелой последовательностью SGSH человека (подчеркнуто; остаток формилглицина «fG» с двойным подчеркиванием) с линкером G ₄ S, слитым с N-концом клона CH3C.35.21.17 с мутациями типа «выступ» и LALA
126	CXPXR	Мотив CXPXR, где «X» представляет собой любую аминокислоту

127	NAFTSVSSCSPSR	Вариант осуществления триптического пептида
128	NAFTSVSSC(CAM)SPSR	Вариант осуществления триптического пептида; C(CAM) представляет собой алкилированный карбамидометил-Cys
129	NAFTSVSS(Fgly)SPSR	Вариант осуществления триптического пептида; Fgly представляет собой формилглицин

Все публикации, патенты и патентные документы включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были включены посредством ссылки по отдельности. Настоящее изобретение было описано со ссылкой на различные конкретные и предпочтительные варианты осуществления и технологии. Однако следует понимать, что можно сделать множество вариаций и модификаций, не выходя за пределы сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий:

а. первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью N-сульфоглюкозамин-сульфогидролазы (SGSH), аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом; и

б. второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, аминокислотной последовательностью варианта SGSH или их каталитически активным фрагментом, причем второй полипептид Fc способен специфически связываться с рецептором трансферрина (TfR); и где второй полипептид Fc содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичности с SEQ ID NO: 37, и имеет Ala в положении 389 согласно нумерации EU.

2. Белок по п. 1, где второй полипептид Fc дополнительно содержит Glu в положении 380; и Asn в положении 390 согласно нумерации EU.

3. Белок по п. 2, где второй полипептид Fc дополнительно содержит в следующих положениях согласно нумерацией EU:

Tyr в положении 384;

Thr в положении 386;

Glu в положении 387;

Trp в положении 388;

Thr в положении 413;

Glu в положении 415;

Glu в положении 416; и

Phe в положении 421.

4. Белок по любому из пп. 1-3, где белок способен транспортироваться через гематоэнцефалический барьер субъекта.

5. Белок по любому из пп. 1-4, где белок связывается с TfR с аффинностью от около 100 нМ до около 500 нМ или необязательно от около 150 нМ до около 400 нМ.

6. Белок по любому из пп. 1-5, где второй полипептид Fc связывается с апикальным доменом TfR.

7. Белок по любому из пп. 1-6, где связывание белка с TfR существенно не ингибирует связывание трансферрина с TfR.

8. Белок по любому из пп. 1-7, где первая аминокислотная последовательность SGSH содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 58-60.

9. Белок по п. 8, где первая аминокислотная последовательность SGSH содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 58-60.

10. Белок по любому из пп. 1-9, где вторая аминокислотная последовательность SGSH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 58-60.

11. Белок по п. 10, где вторая аминокислотная последовательность SGSH содержит

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 58-60.

12. Белок по любому из пп. 1-11, где первый полипептид Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом посредством пептидной связи или полипептидного линкера.

13. Белок по любому из пп. 1-12, где второй полипептид Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом посредством пептидной связи или полипептидного линкера.

14. Белок по п. 12 или п. 13, где полипептидный линкер представляет собой гибкий полипептидный линкер.

15. Белок по п. 14, где гибкий полипептидный линкер представляет собой богатый глицином линкер.

16. Белок по любому из пп. 12-15, где полипептидный линкер представляет собой GS (SEQ ID NO:7), G₄S (SEQ ID NO:8) или (G₄S)₂ (SEQ ID NO:9).

17. Белок по любому из пп. 1-16, где N-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

18. Белок по любому из пп. 1-16, где C-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

19. Белок по любому из пп. 1-18, где N-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

20. Белок по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, C-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

21. Белок по любому из пп. 1-16, где N-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом; и где N-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

22. Белок по любому из пп. 1-16, где C-конец первого полипептида Fc связан с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом; и где C-конец второго полипептида Fc связан со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом.

23. Белок по любому из пп. 1-22, где каждый из первого полипептида Fc и второго

полипептида Fc содержит модификации, которые способствуют гетеродимеризации.

24. Белок по п. 23, где один из полипептидов Fc имеет замену T366W, а другой полипептид Fc имеет замены T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU.

25. Белок по п. 24, где первый полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а второй полипептид Fc содержит замену T366W.

26. Белок по п. 25, где первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 12-19 и 28-31; и второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 34-41 и 54-57.

27. Белок по п. 24, где первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V.

28. Белок по п. 27, где первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 24-27; и второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 48-53.

29. Белок по любому из пп. 1-28, где первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержит нативный сайт связывания FcRn.

30. Белок по любому из пп. 1-28, где первый полипептид Fc и второй полипептид Fc не обладают эффекторной функцией.

31. Белок по любому из пп. 1-28, где первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержит модификацию, снижающую эффекторную функцию.

32. Белок по п. 31, где модификация, снижающая эффекторную функцию, представляет собой замены Ala в положении 234 и Ala в положении 235 согласно нумерации EU.

33. Белок по п. 32, где первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-19 и 26-31.

34. Белок по п. 33, где первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14, 15, 28 и 29.

35. Белок по п. 33, где первый полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 18, 19, 30 и 31.

36. Белок по п. 32, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 61-88 и 117-118.

37. Белок по п. 36, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной

последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 61-68, 73-76, 81-84 и 117-118.

38. Белок по любому из пп. 32-37, где второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 36-41 и 50-57.

39. Белок по п. 38, где второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 36, 37, 54 и 55.

40. Белок по п. 38, где второй полипептид Fc содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 40, 41, 56 и 57.

41. Белок по любому из пп. 32-37, где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 89-116 и 119-120.

42. Белок по п. 41, где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104, 109-112 и 119-120.

43. Белок по любому из пп. 1-42, где первый полипептид Fc и/или второй полипептид Fc содержат аминокислотные изменения по сравнению с нативной последовательностью Fc, которые удлиняют время полужизни в сыворотке.

44. Белок по п. 43, где аминокислотные замены включают замены Thr в положении 252, Thr в положении 254 и Glu в положении 256 согласно нумерации EU.

45. Белок по п. 43, где аминокислотные замены включают замены Leu в положении 428 и Ser в положении 434 согласно нумерации EU.

46. Белок по п. 43, где аминокислотные замены включают замену Ser или Ala в положении 434 согласно нумерации EU.

47. Белок по п. 23, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 61-68, 73-76 и 81-84; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 89-96, 101-104 и 109-112.

48. Белок по п. 47, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 61-64; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSH, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 89-92.

49. Белок по п. 48, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной

последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или 64; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или 92.

50. Белок по п. 47, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 или 76; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103 или 104.

51. Белок по п. 47, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 или 84; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111 или 112.

52. Белок по п. 47, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 65-68; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 93-96.

53. Белок по п. 52, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или 68; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 или 96.

54. Белок по п. 23, где первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118; и где второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

55. Белок по любому из пп. 1-54, где поглощение аминокислотной последовательности SGSN головным мозгом по меньшей мере в десять раз больше по сравнению с поглощением аминокислотной последовательности SGSN в отсутствие первого полипептида Fc и второго полипептида Fc или по сравнению с поглощением фермента SGSN без модификаций во втором полипептиде Fc, которые приводят к связыванию TfR.

56. Белок по любому из пп. 1-55, где первый полипептид Fc не модифицирован для связывания с рецептором гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), а второй полипептид Fc модифицирован для специфического связывания с TfR.

57. Белок по любому из пп. 1-56, где белок не содержит последовательность варибельной области тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или ее

антигенсвязывающую часть.

58. Полипептид, содержащий полипептид Fc, связанный с аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом, причем полипептид Fc i) способен специфически связываться с рецептором трансферрина (TfR); ii) содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 37; iii) имеет одну или более модификаций, которые способствуют его гетеродимеризации с другим полипептидом Fc; и iv) имеет Ala в положении 389 согласно нумерации EU.

59. Полипептид по п. 58, где полипептид Fc дополнительно содержит Glu в положении 380; и Asn в положении 390 согласно нумерации EU.

60. Полипептид по п. 59, где полипептид Fc дополнительно содержит в следующих положениях согласно нумерации EU:

Tyr в положении 384;

Thr в положении 386;

Glu в положении 387;

Trp в положении 388;

Thr в положении 413;

Glu в положении 415;

Glu в положении 416; и

Phe в положении 421.

61. Полипептид по любому из пп. 58-60, где полипептид Fc связан с аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или их каталитически активным фрагментом посредством пептидной связи или полипептидного линкера.

62. Полипептид по п. 61, который представляет собой слитый полипептид, содержащий от N- к С-концу: аминокислотную последовательность SGSN, аминокислотную последовательность варианта SGSN или каталитически активный фрагмент; полипептидный линкер; и полипептид Fc.

63. Полипептид по п. 61, который представляет собой слитый полипептид, содержащий от N- к С-концу: полипептид Fc; полипептидный линкер; и аминокислотную последовательность SGSN, аминокислотную последовательность варианта SGSN или каталитически активный фрагмент.

64. Полипептид по любому из пп. 58-63, где полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V согласно нумерации EU.

65. Полипептид по п. 64, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO:97-100, 105-108 и 113-116.

66. Полипептид по любому из пп. 58-63, где полипептид Fc содержит замену T366W.

67. Полипептид по п. 66, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100%

идентичности с любой из SEQ ID NO:89-96, 101-104, 109-112 и 119-120.

68. Белок, содержащий полипептид по любому из пп. 58-67 и другой полипептид Fc.

69. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептид по любому из пп. 58-67 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

70. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид по любому из пп. 58-67.

71. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 70.

72. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 70 или вектор по п. 71.

73. Клетка-хозяин по п. 72, дополнительно содержащая полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую другой полипептид Fc.

74. Способ получения полипептида, содержащего полипептид Fc который связан с аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или каталитически активным фрагментом, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется полипептид, кодируемый полинуклеотидом по п. 70.

75. Пара полинуклеотидов, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или каталитически активным фрагментом; и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или каталитически активным фрагментом, как указано в любом из пп. 1-57.

76. Один или более векторов, содержащие пару полинуклеотидов по п. 75.

77. Клетка-хозяин, содержащая пару полинуклеотидов по п. 75 или один или более векторов по п. 76.

78. Способ получения белка, содержащего первый полипептид Fc, связанный с первой аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN или каталитически активным фрагментом, и второй полипептид Fc, связанный со второй аминокислотной последовательностью SGSN, аминокислотной последовательностью варианта SGSN, или каталитически активным фрагментом, включающий культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется пара полинуклеотидов по п. 75.

79. Способ лечения синдрома Санфилиппо типа А, включающий введение белка по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептида по любому из пп. 58-67 нуждающемуся в этом пациенту.

80. Белок по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептид по любому из пп. 58-67 для применения в лечении синдрома Санфилиппо типа А у нуждающегося в этом пациента.

81. Применение белка по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептида по любому из пп. 58-67 в приготовлении лекарственного препарата для лечения синдрома Санфилиппо типа А у нуждающегося в этом пациента.

82. Способ уменьшения накопления токсического продукта метаболизма у пациента с синдромом Санфилиппо типа А, включающий введение пациенту белка по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептида по любому из пп. 58-67.

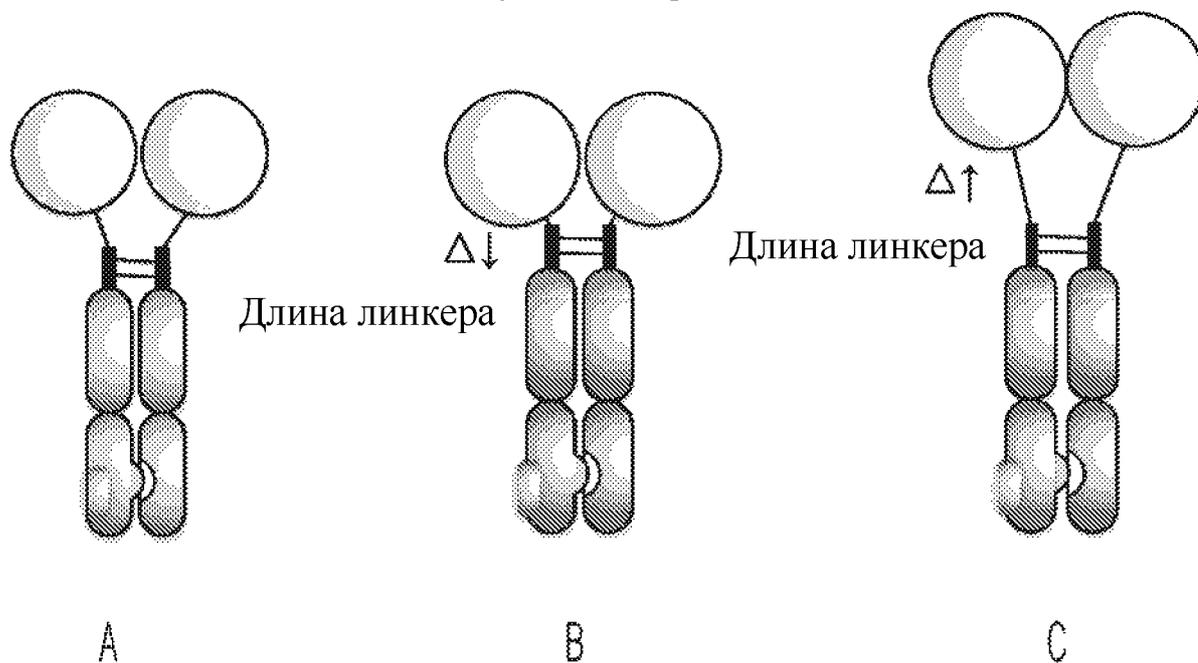
83. Белок по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептид по любому из пп. 58-67 для применения в снижении накопления токсического продукта метаболизма у пациента с синдромом Санфилиппо типа А.

84. Применение белка по любому из пп. 1-57 и п. 68 или полипептида по любому из пп. 58-67 в приготовлении лекарственного препарата для уменьшения накопления токсического продукта метаболизма у пациента с синдромом Санфилиппо типа А.

85. Способ, белок или применение по любому из пп. 82-84, где токсический продукт метаболизма содержит олигосахариды, производные гепарансульфата.

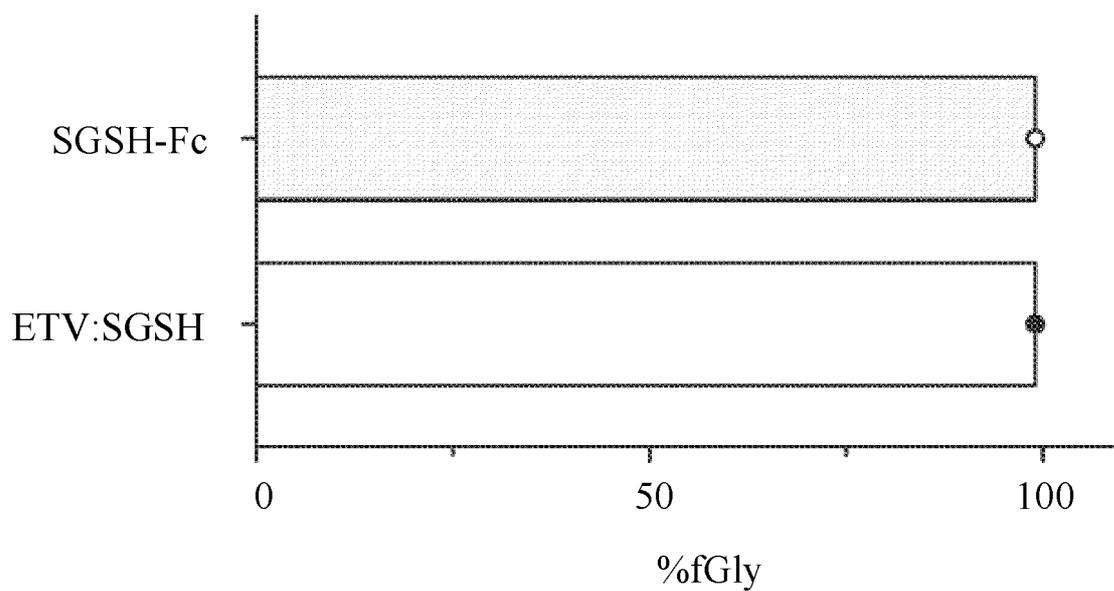
По доверенности

Фиг. 1А-1С



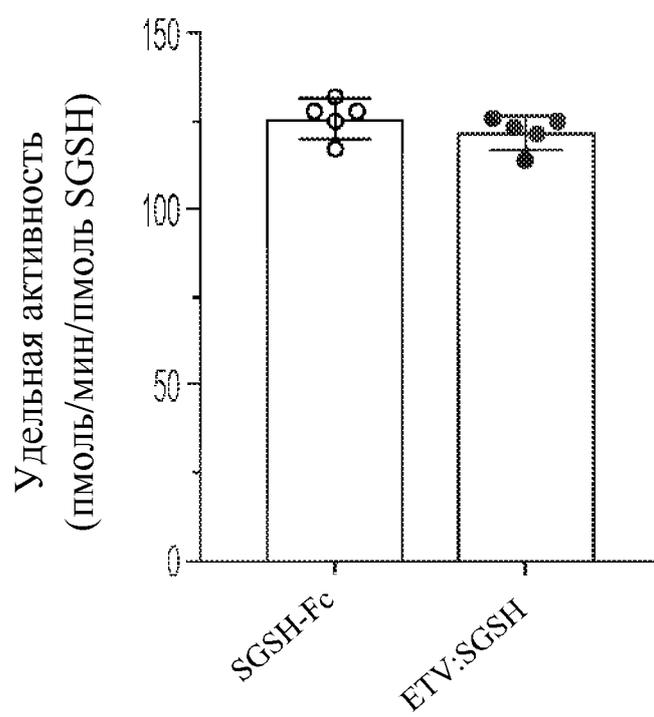
Фиг. 2

ЖХ/МС fGly SGSH

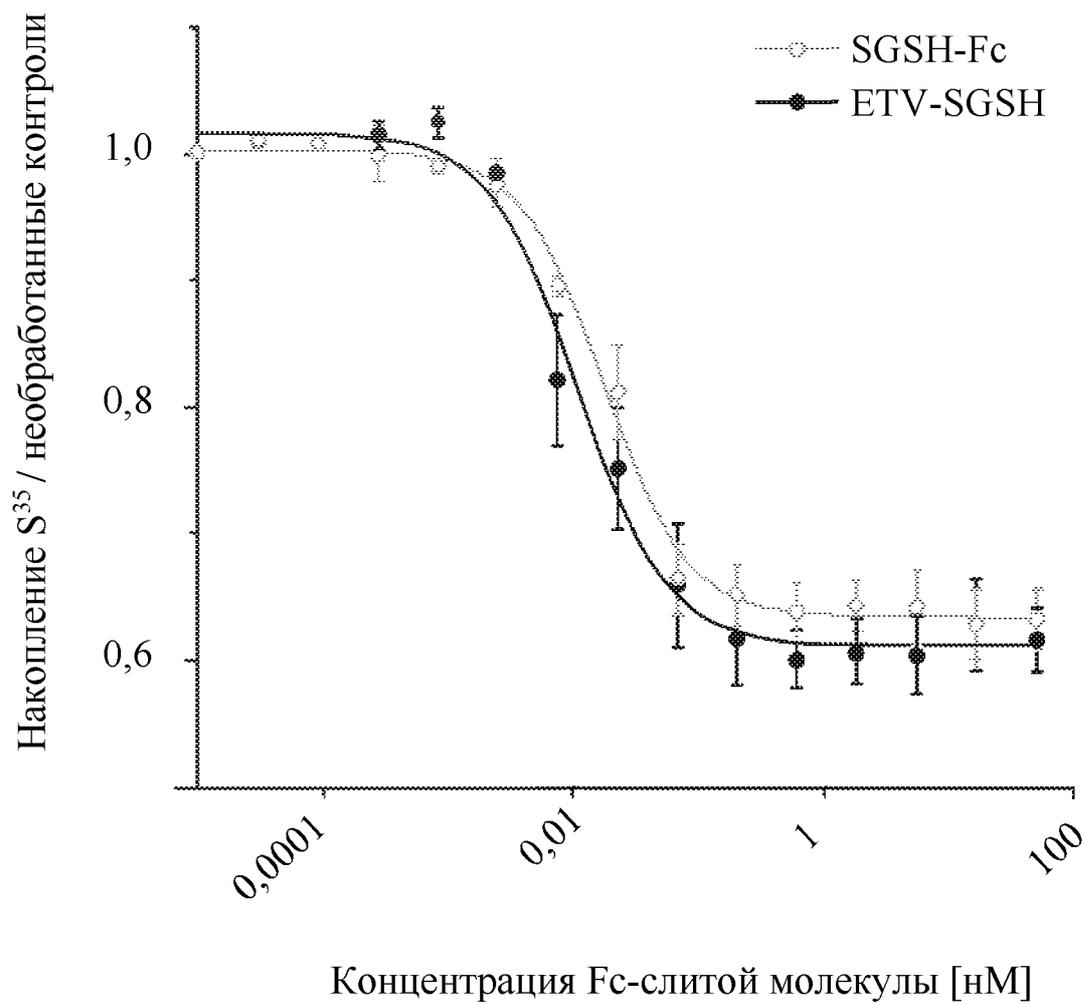


Фиг. 3

Ферментативная активность

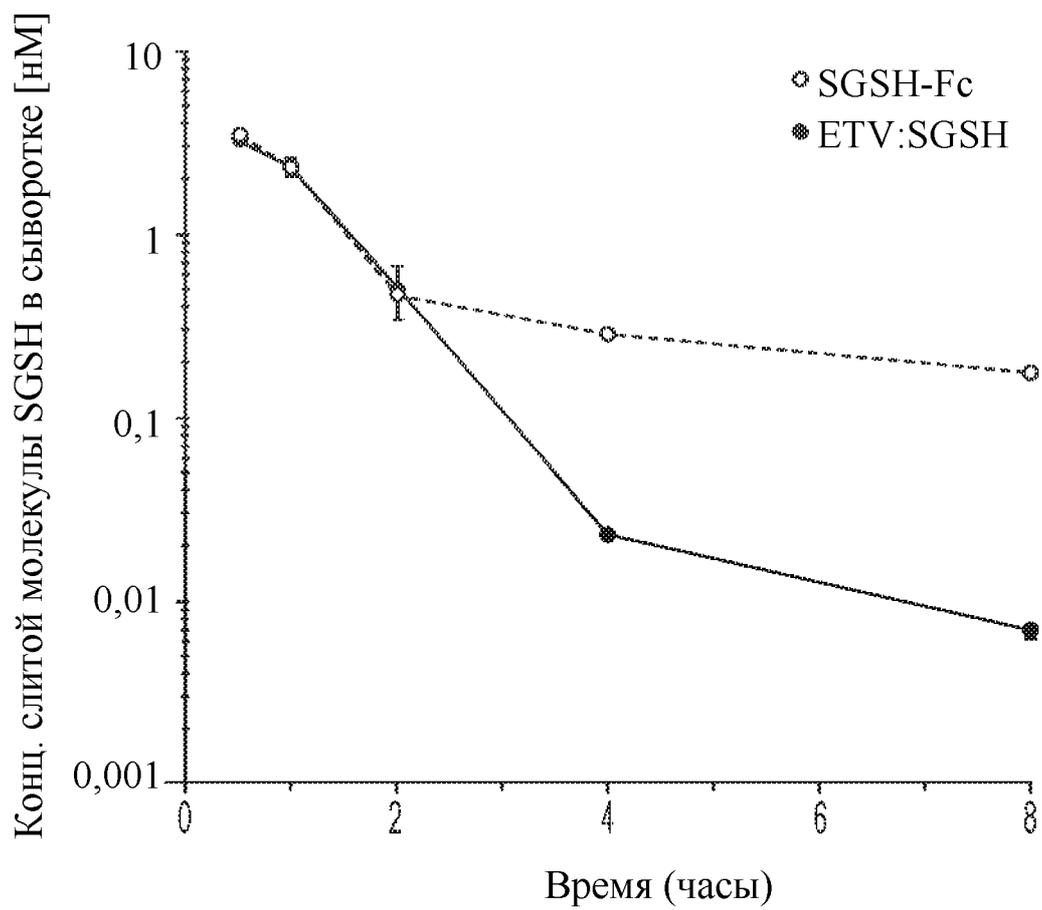


Фиг. 4



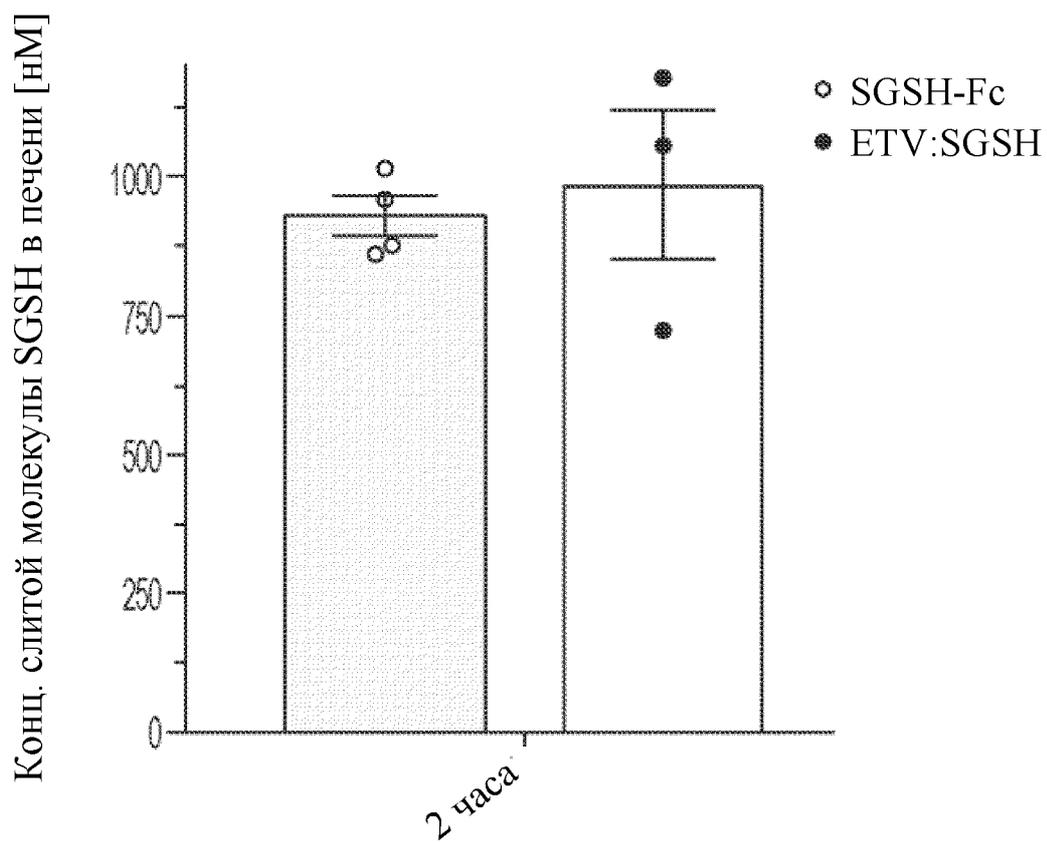
Фиг. 5

ФК в сыворотке

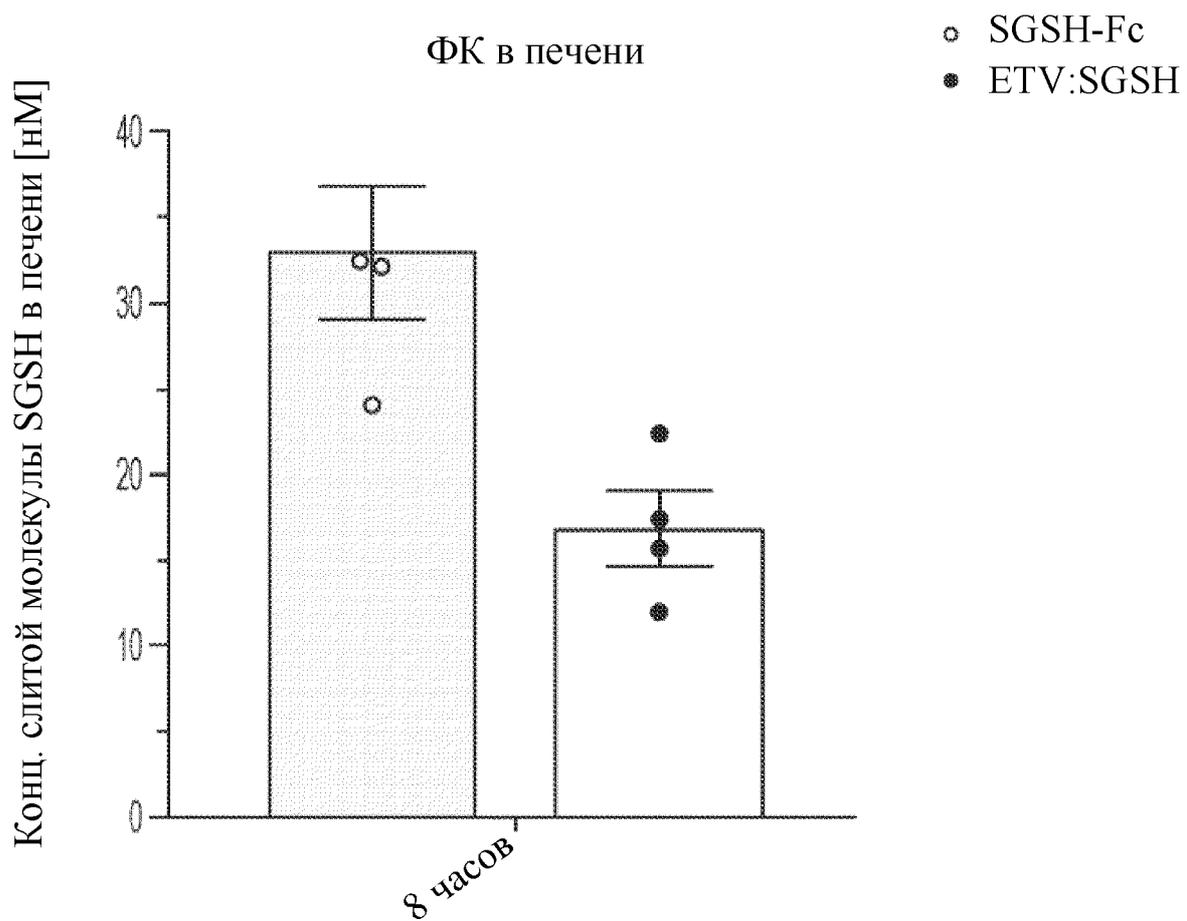


Фиг. 6А

ФК в печени

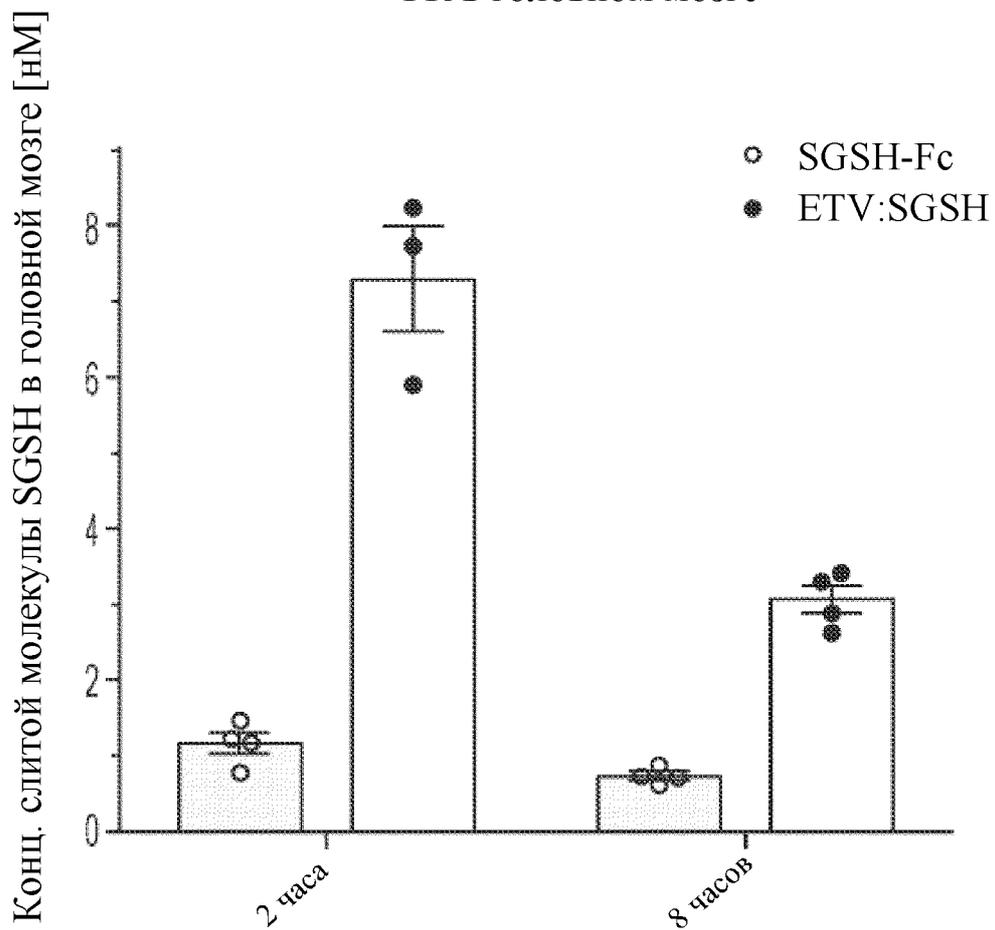


Фиг. 6В

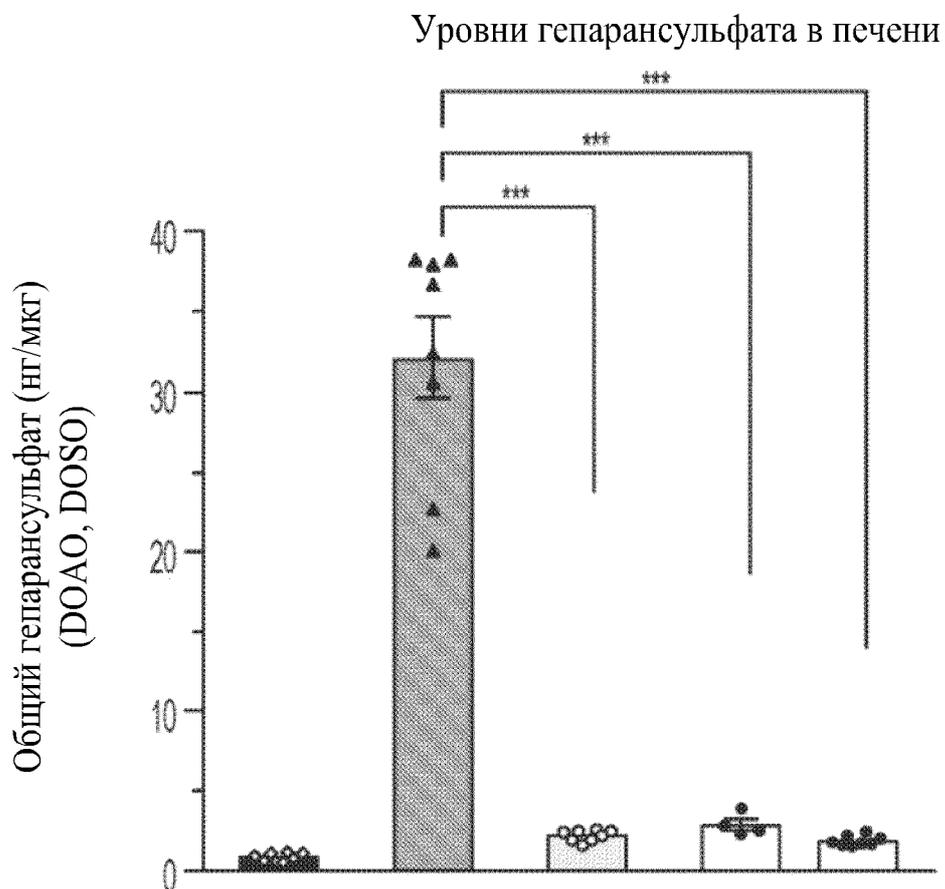


Фиг. 7

ФК в ГОЛОВНОМ МОЗГЕ



Фиг. 8



Кратность относительно TfR ^{mu/hu} KI	37,7x	2,6x	3,4x	2,2x
Эффективность лечения (%)		96	93	97
Снижение от SGSH KO; TfR ^{mu/hu} KI (%)		93	90	94

Доза (мг/кг): . . 40 40 40

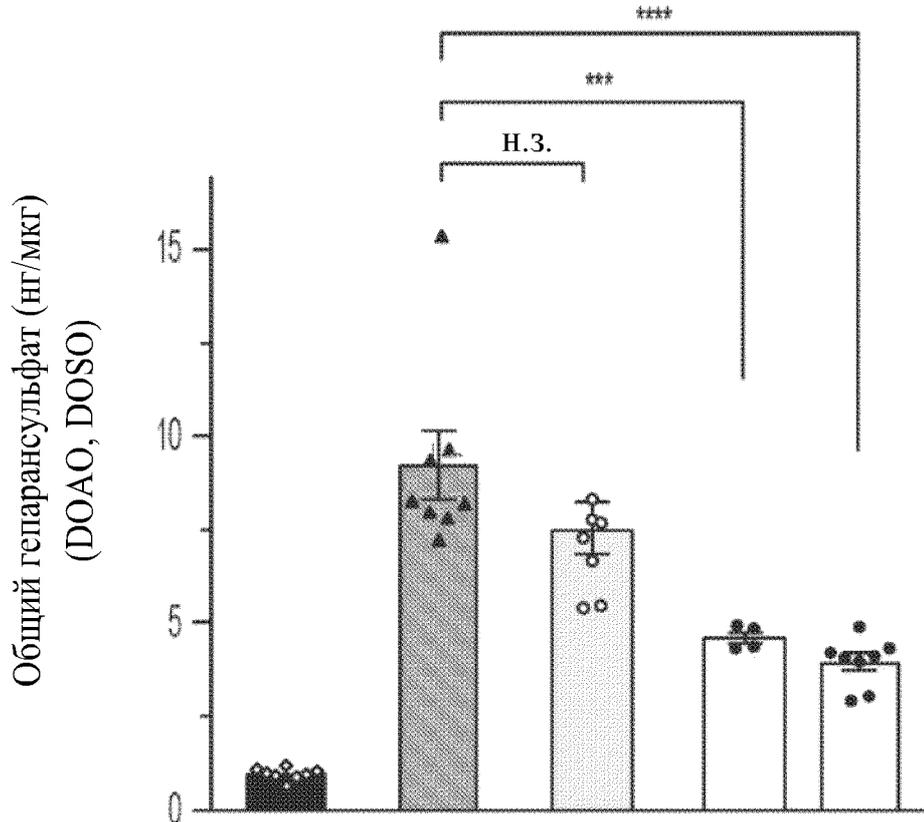
Дни после введения дозы: 7 7 7 3 7

Лечение: Носитель Носитель SGSH-Fc ETV:SGSH

TfR^{mu/hu}KI SGSH^{D31N}; TfR^{mu/hu}KI

Фиг. 9

Уровни гепарансульфата в головной мозге



Кратность относительно TfR ^{mu/hu} KI	9,5x	7,7x	4,8x	4,1x
Эффективность лечения (%)		21	56	64
Снижение от SGSH KO; TfR ^{mu/hu} KI (%)		18	50	57

Доза (мг/кг): - - 40 40 40

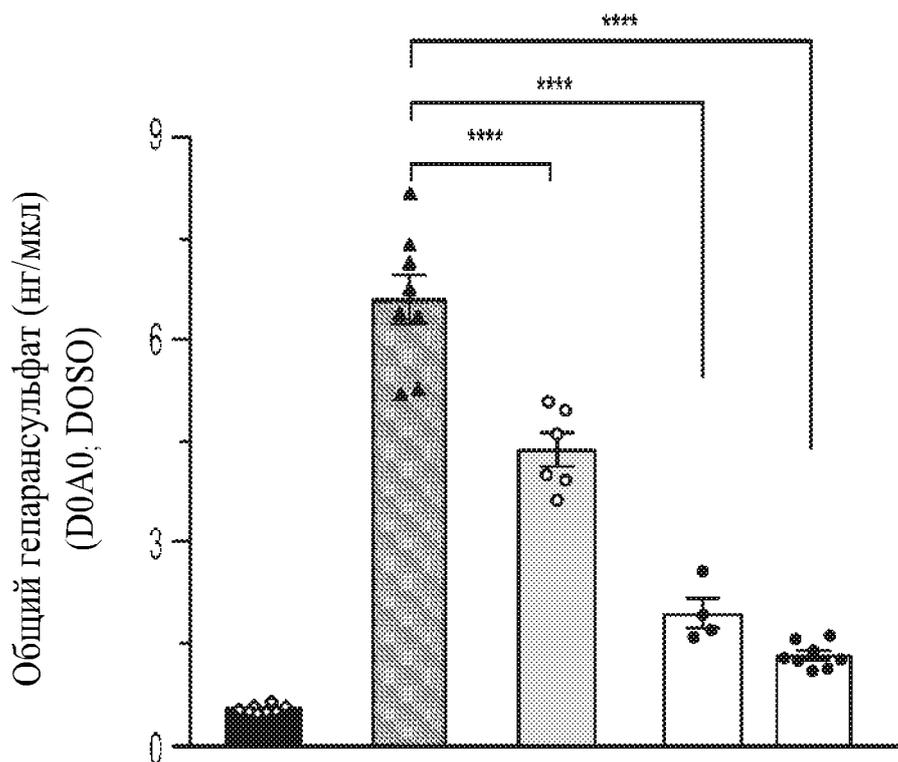
Дни после введения дозы: 7 7 7 3 7

Лечение: Носитель Носитель SGSH-Fc ETV:SGSH

TfR^{mu/hu}KI SGSH^{D31N}; TfR^{mu/hu}KI

Фиг. 10

Уровни гепарансульфата в СМЖ



Кратность относительно TfR ^{mu/huKI}	11,9x	7,9x	3,5x	2,4x
Эффективность лечения (%)		37	77	87
Снижение от SGSH KO; TfR ^{mu/huKI} (%)		33	70	80

Доза (мг/кг):	-	-	40	40	40
Дни после введения дозы:	7	7	7	3	7
Лечение:	Носитель	Носитель	SGSH-Fc	ETV:SGSH	
	TfR ^{mu/huKI}		SGSH ^{D31N} ; TfR ^{mu/huKI}		

Фиг. 11

