

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391472 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.15

(22) Дата подачи заявки
2021.11.19

(51) Int. Cl. C07K 14/48 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ ФАКТОРА РОСТА НЕРВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/CN2020/129925

(32) 2020.11.19

(33) CN

(86) PCT/CN2021/131614

(87) WO 2022/105847 2022.05.27

(71) Заявитель:

СТЕЙДСОН (БЕЙДЖИН)
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,
ЛТД. (CN)

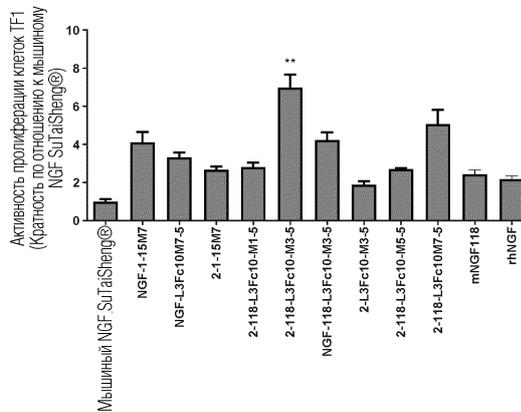
(72) Изобретатель:

Ли Пин, Чжан Лэй (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены полипептиды фактора роста нервов длительного действия (NGF), содержащие от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, способы их получения и применения.



A1

202391472

202391472

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578080EA/23

ПОЛИПЕПТИДЫ ФАКТОРА РОСТА НЕРВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет международной патентной заявки № PCT/CN2020/129925, поданной 19 ноября 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Содержание следующего представления в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 202009094982_SEQLIST.txt, дата записи: 9 сентября 2020 г., размер : 169 КБ).

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к полипептидам фактора роста нервов длительного действия (NGF), содержащим от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, способам их получения и к их применению.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Нейротрофины представляют собой высоко гомологичное семейство факторов роста, которые имеют решающее значение для выживания и поддержания нейронов на стадиях развития и взрослой нервной системы позвоночных. Ограниченное производство нейротрофинов может привести к дегенерации или гибели нейронов либо в периферической нервной системе (ПНС), либо в центральной нервной системе (ЦНС).

[0005] Фактор роста нервов (NGF) является первым открытым членом семейства нейротрофинов, обнаруженным в клетках саркомы мышцы итальянским ученым Леви-Мончини в 1953 году. NGF представляет собой регулятор роста нейронов, выполняющий двойную биологическую функцию питания нейронов и стимулирования нейритов. рост, играющий важную регуляторную роль в развитии, дифференцировке, росте, регенерации и выражении функциональных свойств центральных и периферических нейронов. NGF включает три субъединицы α , β и γ . Субъединица β представляет собой активную область, которая образуется путем объединения двух одинарных цепей посредством нековалентной связи.

[0006] NGF изучали в течение десятилетий. Однако на рынке представлено очень мало продуктов NGF, большинство из них в основном используются для лечения офтальмологических заболеваний, включая язву роговицы, контузию зрительного нерва и повреждения зрительного нерва. Основные причины лежат в ограничениях и проблемах при реальном использовании.

[0007] Подобно другим белкам, биологическая активность NGF зависит от его вторичной и третичной структур, и поэтому особенно важно поддерживать его биологическую активность в процессе получения, очистки, хранения и введения.

[0008] Кроме того, NGF может вызывать боль, которую некоторые пациенты не переносят во время применения, тем самым частично ограничивая его применение. В соответствии с ее нейрофизиологическим механизмом боль можно разделить на два типа: сенсорная боль и невропатическая боль. Первая вызвана непосредственно вредной стимуляцией, связана с повреждением тканей или воспалительной реакцией и также известна как воспалительная боль. Последняя представляет собой хроническую боль, непосредственно обусловленную повреждением или заболеванием соматосенсорной нервной системы. NGF участвует в патофизиологическом процессе боли, влияя на высвобождение медиаторов воспаления, открытие ионных каналов и стимулируя рост нервных волокон, вызывающих боль; а также участвует в развитии боли посредством регуляции ионных каналов и молекулярных сигналов. Некоторые ученые предполагают, что NGF может также вызывать боль, способствуя экспрессии веществ, вызывающих боль, и может изменять почкование и регенерацию нейронов после повреждения организма. Исследования показывают, что максимальная доза, не вызывающая гипералгезии у людей, составляет примерно 0,03 мкг/кг (Petty *et al.*, *Ann Neurol.* 1994; 36(2):244-246). Однако такая низкая доза ограничивает применение NGF, а также ограничивает расширение его показаний, таких как применение для центральной нервной системы.

[0009] В качестве белкового лекарственного средства активная часть NGF в стимулировании роста нервов находится в основном в β -NGF. β -NGF имеет коэффициент седиментации 2,5S, молекулярную массу 13,5 кДа и легко фильтруется клубочками во время метаболизма, что приводит к короткому периоду полувыведения *in vivo*. Исследования показали, что у мышей, которым внутримышечно вводили препарат β -NGF, $T_{1/2}(\beta)=2,2$ ч, $T_{max}=0,5$ ч, и частота введения составляла один раз в сутки. Из-за неблагоприятных болевых реакций в месте инъекции или в нижней конечности на стороне инъекции во время инъекции NGF было бы предпочтительным уменьшение общего количества и частоты введения.

[0010] Все публикации, патенты, заявки на патенты и опубликованные заявки на патенты, упомянутые в настоящем документе, настоящим полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В одном аспекте настоящая заявка относится к полипептиду фактора роста нервов длительного действия (NGF), содержащему от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (такой как любая из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения согласно любому из полипептидов NGF длительного действия, описанных выше, фрагмент NGF соединяется с

Fc-фрагментом с помощью пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72 или SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), где n обозначает любое число из 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения согласно любому из полипептидов NGF длительного действия, описанных выше, фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких E233, L234, L235, G236, G237, N297, A327, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких E233P, L234V, L234A, L235A, L235E, G236del, G237A, N297A, A327G, A330S и P331S, относящихся к SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутации L234A, L235A и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-64. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутации E233P, L234V, L235A, G236del, A327G, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутацию N297A, относящуюся к SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

[0014] В некоторых вариантах осуществления изобретения согласно любому из полипептидов NGF длительного действия, описанных выше, фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких S228, F234 и L235, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких S228P, F234A и L235A, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения согласно любому из полипептидов NGF длительного действия, описанных выше, при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов).

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения согласно любому из полипептидов NGF длительного действия, описанных выше, полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с полипептидом NGF, содержащим фрагмент NGF с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

[0017] Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева (например, клетки CHO, клетки НЕК 293, клетки Hela или клетки COS), содержащие такие нуклеиновые кислоты или векторы, композиции (например, фармацевтические композиции), наборы и изделия, содержащие любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе. Также предложены способы лечения связанного с NGF заболевания (например, неврологического заболевания или не неврологического заболевания) у индивидуума (например, человека) с использованием любого из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, или их фармацевтических композиций.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

[0018] На ФИГ. 1A-1F показано выравнивание последовательностей Fc IgG1 человека дикого типа IGHG1*05 и природного варианта IGHG1*03 (ФИГ. 1A), модифицированного Fc IgG1 M1-5 и IGHG1*03 (ФИГ. 1B), модифицированного Fc IgG1 M3-5 и IGHG1*03 (ФИГ. 1C), модифицированного Fc IgG1 M5-5 и IGHG1*03 (ФИГ. 1D), модифицированный Fc IgG1 M7 и IGHG1*03 (ФИГ. 1E), и модифицированного Fc IgG4 и человеческого Fc IgG4 дикого типа (ФИГ. 1F).

[0019] На ФИГ. 2 представлена структура proNGF, содержащего сигнальный пептид (SP), пропептид и зрелый NGF. Расщепление фурином в основном сайте расщепления отвечает за процессинг proNGF в зрелом NGF.

[0020] На ФИГ. 3А-3М показано измерение с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) % агрегатов, % фрагментов и % мономеров различных зрелых слитых белков NGF-Fc в ускоренном тесте на стабильность при температуре 40°C в различные моменты времени.

[0021] На ФИГ. 4А-4М показано измерение с помощью капиллярного электрофореза и додецилсульфата натрия (CE-SDS) различных зрелых слитых белков NGF-Fc в ускоренном тесте на стабильность при температуре 40°C в различные моменты времени.

[0022] На ФИГ. 5А-5В показана активность пролиферации клеток TF-1, обработанных различными слитыми белками NGF-Fc. Контролем служили мышинный NGF SuTaiSheng®, мутантный NGF 118aa (mNGF118) и рекомбинантный человеческий NGF (rhNGF).

[0023] На ФИГ. 6А-6D показана биологическая активность различных слитых белков NGF-Fc в отношении роста верхнего шейного ганглия (SCG) *in vivo* у крыс. Мышиный NGF SuTaiSheng® и mNGF118 служили в качестве контролей. PBS служил отрицательным контролем.

[0024] На ФИГ. 7А показаны фармакокинетические (ПК) профили 2-118-L3Fc10-M3-5, 2-118-L3G4-BM и контроля mNGF118 (мутантный β -NGF 118aa без слияния Fc) в плазме крови. На ФИГ. 7В показан их период полувыведения *in vivo* при внутримышечном введении в дозе 235 мкг/кг.

[0025] На ФИГ. 8 показана скорость закрытия ран у мышей с диабетом, получавших NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM). Обработка PBS служила отрицательным контролем.

[0026] На ФИГ. 9А-9В показаны скорость пролиферации и концентрация секретируемого эстрогена линии клеток гранулезоподобной опухоли яичников человека (KGN), обработанных NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитым белком NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM). На ФИГ. 9С показано количество фолликулов в крысиной модели преждевременной недостаточности яичников, обработанных NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитым белком NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM).

[0027] На ФИГ. 10А и 10В показаны оценка окрашивания роговицы флуоресцеином натрия (ФИГ. 10А) и средняя длина нерва роговицы (ФИГ. 10В) моделей нейротрофического кератита у крыс, получавших NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118), слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) или 0,9% раствор хлорида натрия в качестве отрицательного контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0028] Настоящее изобретение относится к полипептидам NGF длительного действия, содержащим от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc. Термины «полипептид NGF длительного действия», «слитый белок NGF-Fc длительного действия» и «конструкция NGF длительного действия» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0029] NGF играет важную регулирующую роль в развитии, дифференцировке, росте, регенерации и выражении функциональных свойств центральных и периферических нейронов. Он использовался для лечения дисплазии нервной системы, в том числе амблиопии, невромы, различных повреждений нервов и заболеваний нервной системы. Однако его побочные эффекты, такие как боль, короткий период полувыведения *in vivo*, низкий предел дозы во избежание гипералгезии и режим частого введения, ограничивают широкое применение NGF. Слияние белкового лекарственного средства с фрагментом, имеющим более длительный период полувыведения и/или большую молекулярную массу, является стратегией, обеспечивающей пролонгированную активность некоторых белковых лекарственных средств. Однако по-прежнему остается клинически сложной проблемой увеличение или поддержание биологической активности белкового лекарственного средства при продлении его периода полувыведения.

[0030] Полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, обладают одним или несколькими из следующих превосходных эффектов: 1) они обладают высокой биологической активностью (например, способствуют росту верхнего шейного ганглия) как *in vitro*, так и *in vivo*, даже лучше, чем доступные слитые белки NGF-Fc или лекарственные средства NGF; 2) они имеют очень длительный период полувыведения *in vivo*, не только намного больше, чем белки NGF без слитой части, но также значительно дольше, чем доступные слитые белки NGF-Fc, тем самым снижая частоту введения и общее количество введений, а также обеспечивая удобство и снижение стоимости для пациентов; 3) они могут облегчать такие побочные эффекты, как боль, или даже быть безболезненными, тем самым повышая дозировку, переносимую пациентами, и обеспечивая возможность расширить показания и воздействовать на центральную нервную систему; 4) они обладают сниженной или минимальной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC), что позволяет избежать нежелательных иммунных ответов во время лечения; 5) они обладают отличной термической стабильностью (например, высокой температурой плавления (T_m) и/или высокой температурой начала агрегации (T_{agg})); 6) они обладают превосходной стабильностью при ускоренном стрессе (например, при нагревании), такой как меньшая фрагментация или отсутствие фрагментации, образование агрегатов и/или приращение агрегатов, тем самым сохраняя свойства лекарственного средства; и 7) они очень эффективны при лечении связанных с NGF заболеваний *in vivo*, например, неврологических заболеваний, таких как диабетическая невропатия, болезнь Альцгеймера и нейротрофический кератит, не неврологических заболеваний, таких как преждевременная недостаточность яичников и нарушение сперматогенеза (например, олигозооспермия, астеноспермия, олигоастеноспермия), со сравнимой или даже лучшей терапевтической эффективностью по сравнению с фрагментом NGF, не слитым с Fc.

[0031] Соответственно, в одном аспекте настоящая заявка относится к полипептиду NGF длительного действия, содержащему от N-конца до C-конца фрагмент NGF и

фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4, и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4.

[0032] Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды NGF длительного действия, векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты или векторы, способы получения таких полипептидов NGF длительного действия, фармацевтические композиции и промышленные изделия, содержащие такие полипептиды NGF длительного действия, и способы лечения заболеваний (например, неврологических заболеваний, связанных с дегенерацией или повреждением нейронов, таких как диабетическая невропатия, болезнь Альцгеймера и нейротрофический кератит, не неврологических заболеваний, таких как преждевременная недостаточность яичников и нарушение сперматогенеза) такими полипептидами NGF длительного действия или их фармацевтическими композициями.

I. Определения

[0033] При практическом осуществлении настоящего изобретения используются, если специально не указано иное, обычные методы вирусологии, иммунологии, микробиологии, молекулярной биологии и методы рекомбинантной ДНК в рамках уровня техники, многие из которых описаны ниже с целью иллюстрации. Такие методы полностью описаны в литературе. См., например, *Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., John Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition)*, 2001; Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I&II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984), и другие подобные ссылки.

[0034] Как используется в настоящем документе, «лечение» или «излечение» представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, одно или несколько из следующего: облегчение одного или нескольких симптомов, возникающих в результате заболевания, уменьшение распространенности заболевания, стабилизация заболевания (например, предотвращение или отсрочка ухудшения заболевания), предотвращение или отсрочка распространения заболевания, предотвращение или отсрочка рецидива заболевания, задержка или замедление прогрессирования заболевания, облегчение болезненного состояния, обеспечение ремиссии (частичной или полной) заболевания, снижение дозы одного или нескольких других лекарств, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания, повышение качества жизни и/или продление выживаемости. Под «лечением» также подразумевается уменьшение патологических последствий заболевания. Способы изобретения предусматривают любой

один или несколько из этих аспектов лечения. Например, человек успешно «лечится», если один или несколько симптомов, связанных с заболеванием, смягчаются или устраняются, включая, но этим не ограничиваясь, уменьшение симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни тех, кто страдает заболеванием, снижение дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, и/или увеличение продолжительности жизни людей.

[0035] Термин «предотвращать» и подобные слова, такие как «предотвращенный», «предотвращая» и т. д., указывают на подход к предотвращению, подавлению или уменьшению вероятности рецидива заболевания или состояния. Это также относится к отсрочке рецидива заболевания или состояния или отсрочке рецидива симптомов заболевания или состояния. Как используется в настоящем документе, «предотвращение» и подобные слова также включают снижение интенсивности, эффекта, симптомов и/или бремени заболевания или состояния до рецидива заболевания или состояния.

[0036] Как используется в настоящем документе, «задержка» развития заболевания означает отсрочку, препятствие, замедление, задержку, стабилизацию и/или отсрочку развития заболевания. Эта задержка может быть разной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, проходящего лечение. Способ, который «задерживает» развитие заболевания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития заболевания в заданный период времени и/или уменьшает степень заболевания в заданный период времени по сравнению с не использованием способа. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с участием статистически значимого числа лиц.

[0037] Термин «эффективное количество», используемый в настоящем документе, относится к количеству агента или комбинации агентов, достаточному для лечения конкретного расстройства, состояния или заболевания, такого как улучшение, смягчения, облегчения состояния и/или отсрочка одного или нескольких из его симптомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива заболевания. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) поддерживать выживание нейронов; (ii) способствовать росту нейритов; (iii) усиливать нейрохимическую дифференцировку; (iv) способствовать пролиферации β -клеток поджелудочной железы; (v) индуцировать врожденный и/или приобретенный иммунитет; (vi) предотвратить или отсрочить возникновение и/или рецидив заболевания; и/или (vii) облегчить до некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с заболеванием.

[0038] Как используется в настоящем документе, термин «индивидуум» или «субъект» относится к млекопитающему, включая, помимо прочего, человека, крупный

рогатый скот, лошадь, кошку, собаку, грызуна или примата. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек.

[0039] Термин «константный домен» относится к части молекулы иммуноглобулина, имеющей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, варибельным доменом, который содержит антигенсвязывающий сайт. Константный домен содержит домены C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} (в совокупности C_H) тяжелой цепи и домен C_{HL} (или C_L) легкой цепи. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей (C_H) иммуноглобулина могут быть отнесены к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α далее делятся на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции C_H , например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

[0040] Термин «область Fc», «область, способная кристаллизоваться фрагментом», «домен Fc» или «фрагмент Fc» в настоящем документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая области Fc с нативной последовательностью и варианты Fc-области. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как простирающуюся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксиконца. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации ЕС) области Fc может быть удален, например, в процессе получения или очистки белка или путем рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. Подходящие участки Fc с нативной последовательностью для использования в конструкциях, описанных в настоящем документе, включают IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4 человека.

[0041] Термин «изотип» или «подкласс» IgG, как используется в настоящем документе, означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определяемых химическими и антигенными характеристиками их константных областей. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , γ , ϵ , γ и μ , соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в основном описаны, например, Abbas *et al.* Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000).

[0042] Термин «Fc-рецептор» или «FcR» описывает рецептор, который связывает Fc-участок Fc-содержащей конструкции (например, антитела). Предпочтительный FcR представляет собой человеческий FcR с нативной последовательностью. Более того, предпочтительным FcR является тот, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и

формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов, рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA («активирующий рецептор») и Fc γ RIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, различающиеся, прежде всего, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA в своем цитоплазматическом домене содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) (см. M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). FcR рассмотрены Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); и de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, в том числе те, которые будут определены в будущем, охватываются в настоящем документе термином «FcR».

[0043] Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду. Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976), и Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994). Способы измерения связывания с FcRn известны (см., например, Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279 (8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*). Связывание с FcRn *in vivo* и время полувыведения в сыворотке высокоаффинно связывающих полипептидов FcRn человека можно анализировать, например, на трансгенных мышах или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, или на приматах, которым вводят полипептиды, имеющие вариант Fc-области. В WO 2004/42072 (Presta) описываются варианты антител, которые улучшают или уменьшают связывание с FcRs. См. также, например, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

[0044] Термин «эффекторные функции антитела» касается той биологической активности, которая относится к области Fc (области Fc с нативной последовательностью или области Fc варианта аминокислотной последовательности) Fc-содержащей конструкции (например, антитела) и варьируется в зависимости от изотипа Fc. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и зависимость от комплемента цитотоксичность (CDC); связывание рецептора Fc; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток); и активация В-клеток. «Сниженная или сведенная к минимуму» эффекторная функция антитела означает, что она снижена по меньшей мере на 50% (альтернативно, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) по сравнению с конструкцией дикого типа или немодифицированной Fc-содержащей конструкцией (например, антителом). Определение эффекторной функции антитела может быть легко определено и измерено специалистом в данной области. В предпочтительном варианте осуществления затрагиваются эффекторные функции антитела по связыванию комплемента, комплементзависимой цитотоксичности и антителозависимой цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторная функция устраняется посредством мутации в константной области,

устраняющей гликозилирование, например, «безэффекторная мутация». В некоторых вариантах осуществления неэффекторная мутация представляет собой мутацию N297A или DANA (D265A+N297A) в области C_H2. Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-6604 (2001). Альтернативно, дополнительные мутации, приводящие к снижению или устранению эффекторной функции, включают: K322A и L234A/L235A (LALA). Альтернативно, эффекторная функция может быть уменьшена или устранена с помощью методов производства, таких как экспрессия в клетках-хозяевах, которые не гликозилируют (например, *E. coli.*) или приводят к измененному характеру гликозилирования, который неэффективен или менее эффективен для стимулирования эффекторной функции (например, Shinkawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278(5): 3466-3473 (2003).

[0045] «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или ADCC относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig (или конструкция Ligand-Fc), связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, естественных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяют этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с клеткой-мишенью, несущей антиген (или несущей рецептор лиганда), и впоследствии уничтожить клетку-мишень цитотоксинами. Антитела (или Fc-содержащие конструкции) «вооружают» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени по этому механизму. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия Fc на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 2 на странице 464 работы Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Чтобы оценить ADCC-активность интересующей молекулы, можно провести анализ ADCC *in vitro*, такой как описанный в патентах США № 5500362 или 5821337. Используемые для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность интересующей молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, описанная Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

[0046] «Комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с Fc-содержащими конструкциями (соответствующего подкласса), которые связаны с их родственным рецептором через лиганд, слитый с Fc. Для оценки активации комплемента можно использовать анализ CDC, например, описанный Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Варианты антител с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны в патенте США № 6194551B1 и WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0047] Как используется в настоящем документе, термин «специфически связывает», «специфически распознает» или «специфичен для» относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между лигандом и рецептором, которое определяет наличие лиганда в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, лиганд, который специфически связывается с рецептором, представляет собой лиганд, который связывает этот рецептор с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем он связывает другие рецепторы. В некоторых вариантах осуществления изобретения степень связывания лиганда с неродственным рецептором составляет менее около 10% от связывания лиганда с целевым рецептором, измеренного, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд, который специфически связывается с рецептором-мишенью, имеет равновесную константу диссоциации (K_d) $\leq 10^{-5}$ М, $\leq 10^{-6}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-9}$ М, $\leq 10^{-10}$ М, $\leq 10^{-11}$ М или $\leq 10^{-12}$ М. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд специфически связывается с рецептором, который консервативен среди рецепторов разных видов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретная привязка может включать, но не требует монополярной привязки. Специфичность связывания лиганда можно определить экспериментальными способами, известными в данной области. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, вестерн-блоты, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-, EIA-, BIACORE™-тесты и сканирование пептидов.

[0048] «Аффинность связывания» обычно относится к силе суммарной силы нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, лигандом) и ее партнером по связыванию (например, рецептором). Если не указано иное, как используется в настоящем документе, «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающей пары. Аффинность связывания может быть обозначена как K_d , K_{off} , K_{on} или K_a . Термин « K_{off} », как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения константы скорости диссоциации лиганда из комплекса лиганд/рецептор, как определено из набора кинетической селекции, выраженной в единицах сек^{-1} . Термин « K_{on} », как используется в настоящем документе, относится к константе скорости связывания лиганда с рецептором с образованием комплекса лиганд/рецептор, выраженной в единицах $\text{М}^{-1}\text{сек}^{-1}$. Термин равновесная константа диссоциации « K_d », как используется в настоящем документе, относится к константе диссоциации конкретного взаимодействия лиганд-рецептор и описывает концентрацию лиганда, необходимую для занятия половины всех рецепторов, присутствующих в растворе рецепторов в состоянии равновесия, и равен K_{off}/K_{on} , выраженному в единицах М. Измерение K_d предполагает, что все связывающие вещества находятся в растворе. В случае, когда рецептор находится на клеточной мембране, соответствующая константа скорости равновесия выражается как EC_{50} , что дает хорошее приближение к K_d . Константа аффинности K_a является обратной величиной константы диссоциации K_d , выраженной в единицах М^{-1} . Константа диссоциации (K_d) используется в

качестве индикатора, показывающего сродство лиганда к рецептору. Значение K_d , которое можно получить с помощью этих методов, выражается в единицах М (моль/л).

[0049] Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) представляет собой меру эффективности вещества (например, лиганда) в ингибировании конкретной биологической или биохимической функции. Она указывает, сколько определенного лекарственного средства или другого вещества (ингибитора, например, лиганда) необходимо для подавления данного биологического процесса наполовину. Значения обычно выражаются в виде молярной концентрации. IC_{50} сравнима с « EC_{50} » для лекарственного средства-агониста или другого вещества (например, лиганда). EC_{50} также представляет собой концентрацию в плазме, необходимую для достижения 50% максимального эффекта *in vivo*. Как используется в настоящем документе, « IC_{50} » используется для обозначения эффективной концентрации лиганда, необходимой для нейтрализации 50% биологической активности рецептора *in vitro*. IC_{50} или EC_{50} можно определить с помощью биологических анализов, таких как ингибирование связывания лиганда с помощью анализа FACS (анализ конкурентного связывания), анализ высвобождения цитокинов на основе клеток или анализ амплифицированной люминесцентной близкой гомогенности (AlphaLISA).

[0050] «Ковалентная связь», как используется в настоящем документе, относится к стабильной связи между двумя атомами, имеющими один или несколько общих электронов. Примеры ковалентных связей включают, но не ограничиваются ими, пептидные связи и дисульфидные связи. Используемый здесь термин «пептидная связь» относится к ковалентной связи, образованной между карбоксильной группой аминокислоты и аминогруппой соседней аминокислоты. «Дисульфидная связь», используемая в настоящем документе, относится к ковалентной связи, образованной между двумя атомами серы, такой как комбинация двух Cys-фрагментов посредством одной или нескольких дисульфидных связей. Одна или несколько дисульфидных связей могут быть образованы между двумя фрагментами путем связывания тиоловых групп в двух фрагментах. В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько дисульфидных связей могут быть образованы между одним или несколькими цистеинами двух Cys-фрагментов. Дисульфидные связи могут образовываться при окислении двух тиоловых групп. В некоторых вариантах осуществления изобретения ковалентное связывание напрямую осуществляется ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления изобретения ковалентное связывание напрямую осуществляется пептидной связью или дисульфидной связью.

[0051] «Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «гомология» применительно к пептидной или полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности

последовательности, и без учета каких-либо консервативных замены как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0052] Как используется в настоящем документе, термин «С-конец» полипептида относится к последнему аминокислотному остатку полипептида, который отдает свою аминогруппу для образования пептидной связи с карбоксильной группой соседнего с ним аминокислотного остатка. Термин «N-конец» полипептида, используемый в настоящем документе, относится к первой аминокислоте полипептида, которая отдает свою карбоксильную группу для образования пептидной связи с аминогруппой соседнего аминокислотного остатка.

[0053] «Выделенный» полипептид представляет собой полипептид, который был идентифицирован, выделен и/или выделен из компонента его производственной среды (например, природного или рекомбинантного). Предпочтительно, чтобы выделенный полипептид не ассоциировался со всеми другими компонентами среды его производства. Загрязняющие компоненты его производственной среды, такие как продукты рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые обычно мешают исследовательскому, диагностическому или терапевтическому применению полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид будет очищен: (1) до более чем 95% по массе полипептидов, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более чем 99% по массе; (2) в степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающейся чашкой; или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Выделенный полипептид включает полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения полипептида не будет присутствовать. Однако обычно выделенный полипептид получают по меньшей мере с помощью одной стадии очистки.

[0054] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию (такую как полипептиды NGF, описанные в настоящем документе), представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в окружающей среде в которой она была создана. Предпочтительно выделенная нуклеиновая

кислота свободна от ассоциации со всеми компонентами, связанными с производственной средой. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие описанные здесь полипептиды, находятся в форме, отличной от формы или условий, в которых они встречаются в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновых кислот отличаются от нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, описанные в настоящем документе, которые естественным образом присутствуют в клетках. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, которое отличается от ее естественного хромосомного местоположения.

[0055] Термин «контрольные последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Регулирующие последовательности, подходящие для прокариот, например, включают промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосомы. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

[0056] Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК препоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде препротейна, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, «функционально связанный» означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера смежными и находятся в фазе чтения. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание осуществляется лигированием в удобных сайтах рестрикции. Если таких сайтов не существует, синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры используют в соответствии с общепринятой практикой.

[0057] Термин «вектор», как используется в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной участвовать в переносе другой нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Термин включает вектор как самовоспроизводящуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии».

[0058] Термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный», используемый в настоящем документе, относится к процессу, с

помощью которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную подлежащую клетку и ее потомство.

[0059] Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку и полученное из нее потомство независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот родительской клетке, но может содержать мутации. Мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, что и скринированные или отобранные в исходно трансформированной клетке, включены в настоящий документ.

[0060] Термин «фармацевтический состав» или «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав. Такие составы стерильны. «Стерильный» состав является асептическим или свободным от всех живых микроорганизмов и их спор.

[0061] Понятно, что варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают варианты осуществления, «состоящие из» и/или «по существу состоящие из».

[0062] Ссылка на значения или параметра «около» в настоящем документе включает (и описывает) варианты, которые направлены на это значение или параметр как таковой. Например, описание, относящееся к «около X», включает в себя описание «X».

[0063] Как используется в настоящем документе, указание «не» в отношении значения или параметра обычно означает и описывает «отличное от» значение или параметр. Например, способ не используется для лечения заболевания типа X означает, что способ используется для лечения заболеваний других типов, кроме X.

[0064] Термин «около X-Y», используемый в настоящем документе, имеет то же значение, что и «от около X до около Y».

[0065] Как используется в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

II. Полипептиды NGF длительного действия

[0066] В одном аспекте настоящая заявка относится к полипептиду NGF длительного действия, содержащему от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF

длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0067] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF соединяется с Fc-фрагментом с помощью пептидного линкера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0068] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, такого как Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой Fc IgG1 дикого типа

(например, Fc IgG1 человека) или его естественный вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких E233, L234, L235, G236, G237, N297, A327, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию, выбранную из одной или нескольких E233P, L234V, L234A, L235A, L235E, G236del, G237A, N297A, A327G, A330S и P331S, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых

вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0069] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях L234, L235 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации L234A, L235A и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ

ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации L234A, L235A и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий из) аминокислотную последовательность одну из SEQ ID NO: 62-64. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0070] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях E233, L234, L235, G236, A327, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения

во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации E233P, L234V, L235A, G236del, A327G, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации E233P, L234V, L235A, G236del, A327G, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,

22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0071] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях L234, L235, G237, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент

Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0072] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию в положении N297, относящемся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где

фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию N297A, относящуюся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию N297A, относящуюся к SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8), и где во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8 (например, SEQ ID NO: 8). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0073] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, таким как humFc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой Fc IgG4 дикого типа (например, humFc IgG4)

или его естественный вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких S228, F234 и L235, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях S228, F234 и L235, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является

производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию, выбранную из S228P, F234A и L235A, относящуюся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), где фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации S228P, F234A и L235A, относящиеся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 17. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF, необязательный пептидный линкер (например, с любой из SEQ ID NO: 68-99, такой как любая из SEQ ID NO: 68-72) и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0074] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий

из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44 и 46. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен полипептид NGF длительного действия, содержащий (или состоящий по существу из, или состоящий из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44 и 46, за исключением последовательности сигнального пептида SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов (например, по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100 часов) при введении индивидууму (например, человеку) внутривенно, внутримышечно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% меньшую боль) по сравнению с фрагментом NGF, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Фрагменты NGF

[0075] При экспрессии NGF изначально находится в составе 7S, 130 кДа комплекса из 3 белков - α -NGF, β -NGF и γ -NGF (соотношение 2:1:2). Субъединица γ этого комплекса действует как сериновая протеаза и расщепляет N-конец субъединицы β , тем самым активируя белок в функциональный NGF. Ген NGF человека расположен на коротком плече хромосомы 1, а полный экзон NGF кодирует 241 аминокислоту, обычно называемую предшественником рреproNGF (SEQ ID NO: 50). Предшественник рреproNGF содержит последовательность сигнального пептида (SEQ ID NO: 6), пропептид (SEQ ID NO: 5) и последовательность зрелого NGF (β -NGF, SEQ ID NO: 4). Сигнальный пептид предшественника рреproNGF расщепляется в эндоплазматическом ретикулуме с образованием предшественника proNGF (223 аминокислоты; SEQ ID NO: 54). Предшественник proNGF существует в форме гомодимера в эндоплазматическом ретикулуме и затем переносится в аппарат Гольджи, в котором димер предшественника proNGF расщепляется фурином по 3 мотивам фурина на пропептиде. Расщепление фурином мотива фурина, расположенного в положениях -1 и -2 по отношению к последовательности зрелого NGF, приводит к образованию зрелого димера β -NGF, каждый мономер которого содержит 118 или 120 аминокислот. Затем зрелый димер β -NGF транспортируется за пределы клетки. Некоторые нерасщепленные предшественники proNGF также секретируются вне клетки. См. ФИГ. 2 для структуры NGF.

[0076] NGF присутствует у различных видов и в избытке содержится в поднижнечелюстной железе самцов мышей, семенной плазме крупного рогатого скота, змеином яде, предстательной железе морской свинки, ткани плаценты человека и т. д. Гомология аминокислотных последовательностей между NGF мыши и NGF человека выше, примерно до 90%.

[0077] NGF связывается с киназой рецептора тропомиозина А (TrkA) и низкоаффинным рецептором NGF (LNGFR/p75NTR), оба связаны с нейродегенеративными расстройствами. Связывание NGF с рецептором TrkA вызывает гомодимеризацию

рецептора, что, в свою очередь, вызывает аутофосфорилирование сегмента тирозинкиназы, что приводит к активации сигнальных путей PI-3-киназы, *gas* и PLC. Рецептор p75NTR также может образовывать гетеродимер с TrkA, обладающим более высокой аффинностью и специфичностью в отношении NGF. С другой стороны, proNGF с высокой аффинностью связывается с p75NTR и сортилином, что приводит к образованию сигнального комплекса, который рекрутирует NRAGE и Ras для активации сигнальных каскадов JNK, которые в первую очередь управляют апоптозом. Связывание ProNGF с p75NTR также может способствовать активации NFκB, вызывая выживание нейронов.

[0078] Как используется в настоящем документе, термин «фрагмент NGF» относится к молекуле NGF, ее видовому варианту, фрагменту, мутанту или производному. Фрагмент NGF может представлять собой укороченные версии, посттрансляционно модифицированные версии, гибридные варианты, пептидные миметики, биологически активные фрагменты, варианты делеции, варианты замены или варианты добавления, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторую степень активности исходного NGF, такую как связывание с рецептором NGF и индукция передачи сигнала через рецептор NGF. «Исходный NGF» или «исходный NGF», описанные в настоящем документе, относятся к эталонной последовательности NGF, из которой сконструирован, модифицирован или получен фрагмент NGF.

[0079] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой NGF дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой естественный вариант NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой аналог NGF, такой как NGF, содержащий не более чем около 6 сайтов мутаций аминокислот (например, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 АК). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой производное NGF. Как используется в настоящем документе, термин «производное NGF» относится к молекуле, имеющей аминокислотную последовательность NGF или аналог NGF, но также имеющий дополнительную химическую модификацию одной или нескольких боковых групп аминокислот, α-атомов углерода, концевых аминогрупп или концевых карбоксильных групп. Химические модификации включают, помимо прочего, добавление химических фрагментов, создание новых связей и удаление химических фрагментов. Модификация боковых групп аминокислот включает, но этим не ограничивается, добавление химических фрагментов, создание новых связей и удаление химических фрагментов. Модификация боковых групп аминокислот включает, но этим не ограничивается, ацилирование ε-аминогруппы лизина, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксила глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты и дезаминирование глутамина или аспарагина. Модификация концевых аминогрупп включает, но этим не ограничивается, дезаминирование, модификации N-нижнего алкила, N-ди-нижнего алкила и N-ацила. Модификация концевых карбоксильных групп включает, но не ограничивается ими, модификации амида, нижнего алкилацила, диалкиламида и сложного эфира нижнего алкила. В некоторых вариантах

осуществления изобретения низшая алкильная группа представляет собой C₁-C₄ алкильную группу. Кроме того, одна или несколько боковых или концевых групп могут быть защищены защитной группой, известной специалисту в области химии. Альфа-углерод аминокислоты может быть моно- или диметилирован. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой модифицированный NGF, такой как пегилированный NGF, или ковалентно модифицированный NGF, такой как гликозилированный NGF.

[0080] Фрагмент NGF может быть получен из любого организма, такого как млекопитающие, включая, но не ограничиваясь ими, сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, коз, кошек, собак, ослов и лошадей), приматов (например, человек и не относящиеся к человеку приматы, такие как обезьяны или шимпанзе), кролики и грызуны (например, мыши, крысы, песчанки и хомяки).

[0081] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой NGF человека (hNGF). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой hNGF дикого типа (WT). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой естественный вариант hNGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой аналог hNGF, такой как hNGF, содержащий не более чем около 6 сайтов мутаций аминокислот (например, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 АК). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой производное hNGF. Многие активные фрагменты, аналоги и производные hNGF хорошо известны в данной области, и любой из этих активных фрагментов, аналогов и производных может представлять собой фрагмент NGF, используемый в настоящей заявке.

[0082] Фрагмент NGF, описанный в настоящем документе, может представлять собой NGF, выделенный из различных источников, таких как ткани человека или другой источник, или полученный рекомбинантными или синтетическими способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой рекомбинантный NGF, такой как рекомбинантный hNGF (rhNGF). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой мышинный NGF, такой как рекомбинантный мышинный NGF.

[0083] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой полноразмерный NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой функциональный фрагмент NGF, который способен проявлять большую часть или полную биологическую активность полноразмерной молекулы NGF, такую как большую часть или полную биологическую активность полноразмерного β -NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой preproNGF (такой как preproNGF человека) или его активный фрагмент, то есть содержащий полную длину или фрагменты всех сигнальных пептидов, пропептидов и β -NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 47-

50. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой proNGF (такой как человеческий proNGF) или его активный фрагмент, то есть содержащий полную длину или его активный фрагмент, то есть содержащий полную длину или фрагменты как пропептида, так и β -NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 51-54. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой зрелый NGF или его активный фрагмент, то есть содержащий полноразмерный или активный фрагмент β -NGF (такой как β -NGF человека). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой человеческий β -NGF дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой человеческий β -NGF дикого типа с укороченными 2 последними аминокислотами (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит сигнальный пептид на N-конце β -NGF, сигнальный пептид либо из другой молекулы, либо из той же молекулы NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит пропептид на N-конце β -NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения пропептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

[0084] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой мутантный или вариантный NGF, такой как мутантный или вариантный NGF, способный проявлять большую или полную биологическую активность NGF дикого типа. Мутантный фрагмент NGF может включать мутацию в одной или нескольких аминокислотах молекулы NGF (например, зрелый β -NGF). В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный фрагмент NGF включает аминокислотную замену в одном или нескольких положениях аминокислот в NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный фрагмент NGF включает делеции или вставки аминокислот в одном или нескольких положениях аминокислот в NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный фрагмент NGF включает модификации одной или нескольких аминокислот в NGF.

[0085] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF имеет одну или несколько консервативных аминокислотных замен. «Консервативная замена» относится к замене другой аминокислотой с таким же суммарным зарядом и приблизительно такого же размера и формы, что и замещаемая аминокислота. Когда общее число атомов углерода и гетероатомов в их боковых цепях отличается не более чем на 4, аминокислоты с алифатическими или замещенными алифатическими боковыми цепями аминокислот имеют примерно одинаковый размер. Когда количество разветвлений на их боковых цепях не отличается более чем на единицу, аминокислоты имеют примерно одинаковую форму. Аминокислоты, имеющие фенильную или замещенную фенильную

группу в боковой цепи, можно считать примерно одинаковыми по размеру и форме. Если не указано иное, природные аминокислоты, предпочтительно, используют для консервативных замен. См. также подраздел «Заместители аминокислот» ниже.

[0086] Термин «аминокислота» используется в настоящем документе в самом широком смысле, включая как природные аминокислоты, так и неприродные аминокислоты, включая аналоги и производные аминокислот. К последним относятся молекулы, содержащие фрагменты аминокислот. Специалистам в данной области будет понятно, что в соответствии с этим широким определением аминокислоты в настоящем документе включают, например, природные L-аминокислоты, которые образуют белки; D-аминокислоты; химически модифицированные аминокислоты, такие как аналоги и производные аминокислот; природные аминокислоты, которые не образуют белок, такие как норлейцин, β -аланин, орнитин, ГАМК и т.д.; и химически синтезированные соединения с аминокислотными характеристиками, известными в данной области техники. Термин «белкообразующий», как используется в настоящем документе относится к аминокислотам, которые могут быть включены в пептиды, полипептиды или белки клеток посредством метаболических путей.

[0087] Вставка неприродных аминокислот, включая синтетические неприродные аминокислоты, замещенные аминокислоты или одну или несколько D-аминокислот, в полипептиды NGF длительного действия (или часть NGF) по настоящему изобретению может иметь множество преимуществ. Пептиды, содержащие D-аминокислоты, и тому подобное проявляют повышенную стабильность *in vitro* или *in vivo* по сравнению с их аналогами, содержащими L-аминокислоту. Поэтому, когда желательна более высокая внутриклеточная стабильность, конструирование пептидов, например, путем включения D-аминокислот, особенно эффективно. В частности, D-пептид и тому подобные устойчивы к эндогенной пептидазной и протеазной активности, тем самым улучшая биодоступность молекулы и при необходимости увеличивая продолжительность жизни *in vivo*. Кроме того, D-пептид и тому подобное не могут быть эффективно процессированы для ограниченной презентации главными комплексами гистосовместимости (МНС) II типа Т-хелперным клеткам, поэтому они менее склонны индуцировать гуморальные иммунные ответы у субъекта.

[0088] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой мутантный или вариантный NGF, который имеет уменьшенный побочный эффект (например, боль) по сравнению с NGF дикого типа или не вызывает боли. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой мутантный или вариантный NGF, который уменьшает боль по меньшей мере на около 5% (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%) по сравнению с NGF дикого типа, например, уменьшает боль по меньшей мере на около 5% в один или более (например, во все) моменты времени после введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой мутантный или вариантный NGF, который повышает болевой порог по меньшей мере на

около 5% (например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%) по сравнению с порогом для NGF дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения болевой порог у индивидуума составляет примерно 8, болевой порог снижается примерно до 6 после введения NGF дикого типа, в то время как болевой порог остается на уровне примерно 8 после введения мутантного или вариантного NGF (или полипептида NGF длительного действия, содержащий его, описанный в настоящем документе), то есть снижение боли на около 25% или повышение порога боли на около 25%. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF представляет собой мутантный или вариантный NGF, описанный в CN107286233A, WO2017157325 и WO2017157326, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит мутацию F12E относительно последовательности человеческого β -NGF дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит мутацию F12E и последние 2 аминокислоты, укороченные по сравнению с последовательностью β -NGF человека дикого типа (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (далее также именуемую «mNGF118»).

[0089] Варианты аминокислотной последовательности фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия. Для получения конечной конструкции может быть использована любая комбинация делеций, вставок и замен при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, сохраненным/улучшенным связыванием лиганд-рецептор, сохраненной/повышенной биологической активностью (например, стимулирующей рост, поддержание, пролиферацию и/или выживание нейронов), сохраненным/увеличенным периодом полувыведения, сохраненным/уменьшенным ADCC/CDC, сохраненной/уменьшенной вызывающей боль активностью и т. д.

[0090] Консервативные замены показаны в таблице А. Более существенные изменения представлены в таблице А под заголовком «типичные замены» и как дополнительно описано ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот. Аминокислоты можно сгруппировать в соответствии с общими свойствами боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на

другой класс. Аминокислотные замены могут быть введены в белковые конструкции, а продукты подвергнуты скринингу на желаемую активность, указанную выше.

Таблица А. Аминокислотные замены

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены	Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val	Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Asp (D)	Glu; Asn	Glu	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Cys (C)	Ser; Ala	Ser	Pro (P)	Ala	Ala
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn	Ser (S)	Thr	Thr
Glu (E)	Asp; Gln	Asp	Thr (T)	Val; Ser	Ser
Gly (G)	Ala	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Фрагменты Fc

[0091] Полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, содержит фрагмент Fc на C-конце.

[0092] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным любого из IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и их подтипов. IgG имеет самое высокое содержание в сыворотке и самый длительный период полувыведения из сыворотки среди всех иммуноглобулинов. В отличие от других иммуноглобулинов IgG эффективно регенерируется после связывания с рецепторами Fc (FcR). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным IgG человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит C_H2 и C_H3. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc

дополнительно включает всю или часть шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным IgG1 человека или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения две субъединицы фрагмента Fc димеризуются через одну или более (например, 1, 2, 3, 4 или более) дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая субъединица фрагмента Fc содержит полноразмерную последовательность Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая субъединица фрагмента Fc содержит укороченную на N-конце последовательность Fc, такую как укороченный домен Fc с меньшим количеством цистеинов на N-конце, чтобы уменьшить неправильное спаривание дисульфидных связей в процессе димеризации. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc укорочен на N-конце, например, отсутствуют первые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот полного Fc-домена иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит одну или несколько мутаций, таких как вставка, делеция и/или замена.

[0093] Желательно провести скрининг фрагментов Fc, которые обеспечивают полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, с высокой биологической активностью, длительным периодом полувыведения и низкой иммунотоксичностью (например, ADCC и/или CDC).

[0094] Через Fc-домен Fc-содержащий белок может активировать комплемент и взаимодействовать с Fc-рецепторами (FcR). Это свойство, присущее иммуноглобулинам, рассматривалось неблагоприятно, поскольку слитые белки NGF-Fc могут быть нацелены на клетки, экспрессирующие рецепторы Fc, а не на клетки, экспрессирующие предпочтительные рецепторы NGF, а также ввиду длительного периода полувыведения слитых белков Fc, что затрудняет их применение в терапевтических целях из-за системной токсичности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc сконструирован (например, содержит одну или несколько аминокислотных мутаций) с измененным связыванием с FcR, специфически измененным связыванием с рецептором Fc γ (отвечающим за ADCC) и/или измененной эффекторной функцией, такой как измененная антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Предпочтительно, такая мутация(и) аминокислоты не снижает связывание с рецепторами FcR_n (отвечающими за время полувыведения).

[0095] Фрагмент Fc (например, Fc IgG1 человека), мутированный для удаления одной или нескольких эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP или CDC, в дальнейшем именуется «безэффекторным» или «почти безэффекторным» фрагментом Fc. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой неэффекторный Fc IgG1 человека, содержащий одну или несколько из следующих мутаций (например, в каждой из субъединиц Fc): L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Комбинации K322A, L234A и L235A в Fc IgG1 достаточны для почти полного устранения связывания Fc γ R и C1q (Hezareh et al. J Virol 75, 12161-12168, 2001). В компании

MedImmune было определено, что набор из трех мутаций L234F/L235E/P331S имеет очень похожий эффект (Oganessian et al., Acta Crystallographica 64, 700-704, 2008). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит модификацию гликозилирования N297 домена Fc IgG1, которая, как известно, необходима для оптимального взаимодействия с FcR. Модификация фрагмента Fc может быть любой подходящей конструкцией Fc IgG, упомянутой в работе Wang et al. («IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions», Protein Cell. 2018 Jan; 9(1): 63-73), содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[0096] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, не имеют ADCC и/или CDC или не обнаруживают ADCC и/или CDC. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, имеют по меньшей мере около 5% (например, по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%) снижения ADCC и/или CDC по сравнению с конструкцией NGF-Fc, содержащей тот же фрагмент NGF, но фрагмент Fc дикого типа или немодифицированный.

Варианты гликозилирования

[0097] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc или полипептид NGF длительного действия изменяется для увеличения или уменьшения степени гликозилирования конструкции. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в фрагменте Fc может быть удобно осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется один или несколько сайтов гликозилирования.

[0098] Нативные Fc-содержащие белки, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный двухантенный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 домена C_H2 Fc-области. См., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стержне» биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации олигосахарида в фрагменте Fc могут быть сделаны для создания определенных улучшенных свойств.

[0099] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc или полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, имеет углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к фрагменту Fc. Например, количество фукозы в таком фрагменте Fc или полипептиде NGF длительного действия может составлять от около 1% до около 80%, от около 1% до около 65%, от около 5% до около 65% или от около 20% до около 40%. Количество фукозы определяют путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи в Asn297 по отношению к сумме всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, сложных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), по

данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc-домене (нумерация ЕС остатков Fc-области); однако Asn297 также может быть расположен на около ± 3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в Fc-доменах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, публикации патентов США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные Fc-содержащие белки, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилированию белков (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8*, нокаутные клетки CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

Варианты эффекторной функции

[0100] В некоторых вариантах осуществления изобретения в настоящей заявке рассматривается фрагмент Fc или полипептид NGF длительного действия, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями Fc, что делает его желательным кандидатом для применений, в которых период полувыведения полипептида NGF длительного действия *in vivo* важен, но некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) не нужны или вредны. Для подтверждения снижения/исчерпания активности CDC и/или ADCC могут быть проведены анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, могут быть проведены анализы связывания Fc-рецептора (FcR), чтобы гарантировать, что фрагмент Fc или полипептид NGF длительного действия не связывается с FcγR (следовательно, вероятно, не имеет ADCC-активности), но сохраняет способность связывания FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, натуральные клетки-киллеры (NK) экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 2 на странице 464 работы Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки ADCC-активности интересующей молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и в работе Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно, можно использовать методы нерадиоактивных

анализов (см., например, анализ нерадиоактивной цитотоксичности АСТІ™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; и анализ нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Используемые эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. Альтернативно или дополнительно, ADCC-активность интересующей молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, описанная Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Для подтверждения того, что полипептид NGF длительного действия не способен связывать C1q и, следовательно, не имеет CDC-активности также можно проводить анализы связывания C1q. См., например, ELISA связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента можно провести анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. и M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Определения связывания FcRn и клиренса/периода полувыведения *in vivo* также можно проводить с использованием методов, известных в данной области (см., например, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

[0101] Фрагменты Fc со сниженной эффекторной функцией включают фрагменты с заменой одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают замены в двух или более положениях аминокислот 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США 7332581). Описаны некоторые варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR (см., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312, и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)). В некоторых вариантах осуществления изобретения в Fc-домен вносятся изменения, которые приводят к изменению (то есть улучшению или уменьшению) связывания C1q и/или CDC, например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642, и Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0102] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают время полувыведения и/или улучшают связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Антитела с увеличенным периодом полувыведения и улучшенным связыванием с неонатальным FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976), и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-домен с одной или несколькими заменами в нем, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или нескольких остатках области Fc, например, замена остатка 434 области Fc (патент США №7371826).

[0103] См. также Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988), патент США № 5648260, патент США № 5624821 и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов домена Fc.

Варианты, модифицированные цистеином

[0104] В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть желательным создать фрагменты Fc с модифицированным цистеином или полипептиды NGF длительного действия, в которых один или несколько остатков домена Fc заменены остатками цистеина. В некоторых вариантах осуществления изобретения замещенные остатки встречаются в доступных участках фрагмента Fc или полипептида NGF длительного действия. Замещая эти остатки цистеином, реакционноспособные тиоловые группы, таким образом, располагаются в доступных участках фрагмента Fc или полипептида NGF длительного действия и могут использоваться для конъюгации молекулы с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарство, для создания конъюгата полипептида NGF длительного действия. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой один или несколько из следующих остатков могут быть заменены цистеином: A118 (нумерация ЕС) тяжелой цепи; и S400 (нумерация ЕС) Fc-домена тяжелой цепи. Молекулы, модифицированные цистеином, могут быть получены, как описано, например, в патенте США № 7521541.

[0105] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой Fc IgG1 дикого типа (IGHG1*05). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой естественный вариант IgG1 (например, IGHG1*03, который содержит двойные мутации D239E и L241M относительно IGHG1*05). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc не содержит шарнирную область Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит не более около 5 аминокислот, укороченных с N-конца Fc IgG1, например, укороченных первых, первых двух, первых трех, первых четырех или первых пяти аминокислот с N-конца Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит одну или несколько неэффекторных мутаций и/или мутаций дегликозилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких E233, L234, L235, G236, G237, N297, A327, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких E233P, L234V, L234A, L235A, L235E, G236del, G237A, N297A, A327G, A330S и P331S, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc дополнительно отсутствуют первые (N-конец) 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения

фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию в положении N297, относящуюся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию N297A, относящуюся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях L234, L235 и P331, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации L234A, L235A и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях L234, L235, G237, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях E233, L234, L235, G236, A327, A330 и P331, относящихся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации E233P, L234V, L235A, G236del, A327G, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 16.

[0106] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc является производным от humFc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой Fc IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc представляет собой естественный вариант IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc не содержат шарнирную область Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит не более чем около 5 аминокислот, укороченных с N-конца Fc IgG4, например, укороченных первых, первых двух, первых трех, первых четырех или первых пяти аминокислот с N-конца Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит одну или несколько неэффекторных мутаций и/или мутаций дегликозилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc

содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких S228, F234 и L235, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации в положениях S228, F234 и L235, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутацию, выбранную из одного или нескольких S228P, F234A и L235A, относящихся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) мутации S228P, F234A и L235A, относящиеся к SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения во фрагменте Fc также отсутствуют первые (N-конец) 5 аминокислот SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 20.

Линкеры

[0107] Фрагмент NGF и фрагмент Fc соединены с помощью необязательного линкера (например, пептидный линкер, непептидный линкер). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер является гибким линкером. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой стабильный линкер. Как правило, желаемый линкер не влияет или существенно не влияет на правильную укладку и конформацию, образованные конфигурацией полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе. Предпочтительно, линкер придает гибкость полипептиду NGF длительного действия, сохраняет/улучшает биологическую функцию NGF и/или не оказывает существенного влияния на время полувыведения *in vivo* и/или стабильность полипептида NGF длительного действия. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой стабильный линкер (например, не расщепляемый протеазой, особенно MMP).

[0108] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой пептидный линкер. Пептидный линкер может быть любой длины. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер имеет длину от около 1 до около 10 аминокислот, длину от около 3 до около 18 аминокислот, длину от около 1 до около 20 аминокислот, длину от около 10 до около 20 аминокислот, длину от около 21 до около 30 аминокислот, длину от около 1 до около 30 аминокислот, длину от около 10 до около 30 аминокислот, длину от около 1 до около 50 аминокислот, длину от около 5 до около 40 аминокислот, длину от около 12 до около 18 аминокислот или длину от около 4 до около 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер имеет длину около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер имеет длину около 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления

изобретения пептидный линкер имеет длину около 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Предпочтительно, функция и/или стабильность описанного в настоящем документе полипептида NGF длительного действия *in vivo* оптимизируется путем добавления линкерного пептида для предотвращения потенциальных нежелательных взаимодействий доменов. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина линкера не превышает длину, необходимую для предотвращения нежелательных взаимодействий доменов и/или для оптимизации биологической функции и/или стабильности. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер имеет длину не более чем около 30 аминокислот, например, длину не более чем около 20 аминокислот или длину не более чем около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер имеет длину от около 5 до около 30 аминокислот или длину от около 5 до около 18 аминокислот.

[0109] Пептидный линкер может иметь природную последовательность или неприродную последовательность. Например, в качестве линкера можно использовать последовательность, полученную из шарнирной области антитела, состоящего только из тяжелой цепи. См., например, WO1996/34103. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер представляет собой шарнир IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер представляет собой мутантный шарнир IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой гибкий линкер. Примеры гибких линкеров включают, но не ограничиваются ими, глициновые полимеры (G)_n (SEQ ID NO: 73), глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n (SEQ ID NO: 74), (GGS)_n (SEQ ID NO: 75), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 76), (GGS)_n(GGGS)_n (SEQ ID NO: 77), (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 78), (GGSGS)_n (SEQ ID NO: 79) или (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 70), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глицин и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральным связующим звеном между компонентами. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству фи-пси, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11 173-142 (1992)). Примеры гибких линкеров включают, но не ограничиваются ими, GG (SEQ ID NO: 86), GGSG (SEQ ID NO: 87), GGSGG (SEQ ID NO: 88), GSGSG (SEQ ID NO: 89), GSGGG (SEQ ID NO: 90), GGGSG (SEQ ID NO: 91), GSSSG (SEQ ID NO: 92), GGSGGS (SEQ ID NO: 93), SGGGS (SEQ ID NO: 94), GGGGS (SEQ ID NO: 95), (GA)_n (SEQ ID NO: 96, n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1), GRAGGGGAGGGG (SEQ ID NO: 97), GRAGGG (SEQ ID NO: 98), GSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 80), GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 81), GGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 82), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 83), GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 84), GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 85), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 68), GGGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 69), GSGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID

NO: 71), KTGGGSGGGS (SEQ ID NO: 72) и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит последовательность ASTKGP (SEQ ID NO: 99). Обычному специалисту в данной области известно, что конструкция полипептида NGF длительного действия может включать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкую линкерную часть, а также одну или несколько частей, которые придают менее гибкую структуру, чтобы обеспечить желаемую структуру и функцию полипептида NGF длительного действия. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер обогащен серин-глицином. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 68-72. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 70), где n обозначает целое число 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно, n обозначает целое число от 2 до 6, более предпочтительно, n обозначает целое число 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 или 69.

[0110] Другие аспекты линкера включают влияние на физические или фармакокинетические свойства полученного полипептида NGF длительного действия, такие как растворимость, липофильность, гидрофильность, гидрофобность, стабильность (более или менее стабильная, а также планируемая деградация), жесткость, гибкость, иммуногенность, связывание фрагмента NGF/рецептора NGF, способность включаться в мицеллы или липосомы и тому подобное.

Аффинность связывания

[0111] Аффинность связывания молекулы (например, фрагмента NGF или полипептида NGF, содержащего фрагмент NGF) и ее партнера по связыванию (например, рецептора NGF, такого как TrkA) можно определить экспериментально с помощью любых подходящих анализов связывания лиганда или известных в данной области техники анализов связывания антител/антигенов, например, вестерн-блоты, иммуносорбентный ферментный анализ (ELISA), электрохемилюминесценция Meso Scale Discovery (MSD), мультиплексный иммуноанализ на основе шариков (MIA), RIA, поверхностный плазменный резонанс (SPR), ECL, IRMA, EIA, анализ Biacore, анализ Octet, сканирование пептидов и т. д. Например, простой анализ возможен с использованием фрагмента NGF, полипептида NGF, содержащего фрагмент NGF, или его рецептора (например, TrkA), или его субъединиц, помеченных различными маркерными агентами, а также с помощью BiacoreX (Amersham Biosciences), который представляет собой безрецептурный измерительный набор или аналогичный набор, в соответствии с руководством пользователя и методикой эксперимента, прилагаемой к набору.

[0112] В некоторых вариантах осуществления изобретения белковый микрочип используется для анализа взаимодействия, функции и активности фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, с его

рецептором в больших масштабах. Белковый чип имеет опорную поверхность, связанную с рядом захватывающих белков (например, рецептором NGF или его субъединицами). Затем к матрице добавляют флуоресцентно меченные молекулы зонда (например, фрагмент NGF или полипептид NGF длительного действия, описанные в настоящем документе), и при взаимодействии со связанным захватывающим белком высвобождается флуоресцентный сигнал, который считывается лазерным сканером.

[0113] Аффинность связывания также можно определить с помощью SPR (Biacore T-200). Например, антитело против IgG человека связывают с поверхностью сенсорного чипа CM-5 с помощью химии EDC/NHS. Затем слитый белок TrkA-Fc человека используют в качестве захваченного лиганда на этой поверхности. Серийные разведения фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, позволяют связываться с захваченными лигандами, а связывание и диссоциацию NGF с TrkA можно отслеживать в режиме реального времени. Константу равновесной диссоциации (K_d) и константу скорости диссоциации можно определить путем проведения кинетического анализа с использованием программного обеспечения для оценки BIA.

[0114] В некоторых вариантах осуществления изобретения K_d связывания между фрагментом NGF или полипептидом NGF длительного действия, описанным в настоящем документе, и его рецептором (например, TrkA) или его субъединицами составляет примерно $\leq 10^{-5}$ M, $\leq 10^{-6}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, $\leq 10^{-11}$ M или $\leq 10^{-12}$ M. В некоторых вариантах осуществления изобретения K_d связывания между NGF дикого типа и его рецептора (например, TrkA) или его субъединицы аналогичны (например, равны) или, по меньшей мере, имеет кратность около 1,5 (например, по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500 или 1000) K_d связывания между фрагментом NGF или полипептидом NGF длительного действия, описанным в настоящем документе, и тем же рецептором (например, TrkA) или их субъединиц. В некоторых вариантах осуществления изобретения K_d связывания фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, и его рецептора (например, P75) или его субъединиц аналогичен (например, равен) или по меньшей мере имеет кратность около 2 (например, как минимум около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500 или 1000) K_d связывание между NGF дикого типа и тем же самым рецептором (например, P75) или его субъединицами.

[0115] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит мутацию или модификацию (например, посттрансляционную модификацию) и K_d связывания между мутантным/модифицированным фрагментом NGF (или полипептидом NGF длительного действия) и его рецептором (например, TrkA) или субъединицами равен (например, равны) или имеет кратность по меньшей мере около 2 (например, по меньшей мере, около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500 или 1000) от K_d связывания между NGF дикого типа и тем же рецептором (например, TrkA). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF содержит мутацию или модификацию (например, посттрансляционную модификацию), и K_d связывания между

NGF дикого типа и его рецептором (например, P75) или его субъединицами равен (например, равен до) или имеет кратность по меньшей мере около 2 (например, по меньшей мере около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500 или 1000) K_d связывания между мутантным/модифицированным фрагментом NGF (или полипептидом NGF длительного действия) и одним и тем же рецептором (например, P75).

Биоактивность

[0116] В данной области техники известны различные способы определения биологической активности NGF, фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе. Например, биоактивность можно оценить с помощью анализа пролиферации клеток TF-1, такого как описанный в CN103376248A и CN108727486A, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также пример 4 ниже. Биоактивность также можно определить на основании способности стимулировать рост верхнего шейного ганглия (SCG) у новорожденных крыс (например, см. пример 5 ниже) или стимулировать рост ганглия заднего корешка у куриных эмбрионов (например, см. WO2017157326, содержание которого во всей своей полноте включено в настоящий документ посредством ссылки). Биоактивность также можно определить на основании того, имеет ли место i) улучшение заживления ран, например, на оригинальной модели/пациент с диабетической невропатией (например, см. пример 7); ii) улучшение пространственного мышления, памяти и/или способности к обучению, например, на оригинальной модели/пациент с болезнью Альцгеймера (например, см. пример 8); iii) улучшение пролиферации клеточной линии гранулезоподобной опухоли яичников и/или секреции эстрогена и/или обратное уменьшение числа фолликулов на оригинальной модели/пациент с преждевременной недостаточностью яичников (например, см. пример 9); iv) устранение снижения количества и/или подвижности сперматозоидов и/или терапевтическое воздействие на атрофию семенных канальцев яичка, нарушение сперматогенеза семенных канальцев и/или фрагменты клеток протока придатка яичка на оригинальной модели/пациент с нарушением сперматогенеза (например, см. пример 10); или v) восстановление целостности поврежденной роговицы (например, с помощью анализа окрашивания флуоресцеином натрия) и/или спасение поврежденного роговичного нерва (например, с помощью измерения длины роговичного нерва) на оригинальной модели/пациент с нейротрофическим кератитом (например, см. пример 11) и т.д. Любые применимые анализы, известные в данной области техники, могут быть адаптированы для исследования биологической активности фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе.

[0117] Биоанализ фокусируется на биологической активности NGF и используется для ее считывания. В биологическом анализе активность образца исследуется на чувствительной клеточной линии (например, на первичных клеточных культурах или на адаптированных *in vitro* клеточных линиях, которые зависят от исследуемого образца и/или реагируют на него) или на животной модели/человек с NGF-родственным заболеванием, и

результаты этой активности (например, клеточная пролиферация) сравнивают со стандартным препаратом NGF или контролем (например, мышинным NGF, mNGF118 или известным полипептидом NGF длительного действия). Другие аспекты биологической активности NGF включают: (i) поддержку выживания нейронов; (ii) стимулирование роста нейритов; (iii) усиление нейрохимической дифференцировки; (iv) стимулирование пролиферации β -клеток поджелудочной железы; (v) индуцирование врожденного и/или приобретенного иммунитета; (vi) восстановление поврежденных нервных клеток и/или предотвращение повреждения (например, при нейротрофическом кератите); (vii) стимулирование пролиферации и/или секреции эстрогена клетками фолликулов яичников; (viii) ускорение заживления ран (например, при диабетической невропатии); (ix) улучшение пространственного познания, памяти и/или способности к обучению субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием (например, болезнью Альцгеймера); (x) лечение и/или предотвращение нейродегенерации; (xi) лечение атрофии семенных канальцев яичка, нарушения сперматогенеза в семенных канальцах и/или фрагментах клеток эпидидимального протока; (xii) устранение снижения количества и/или подвижности сперматозоидов или увеличение количества и/или подвижности сперматозоидов (например, при нарушении сперматогенеза); и/или (xiii) реверсия уменьшения количества и/или функции фолликулов яичников или увеличение количества и/или функции фолликулов яичников (например, при преждевременной недостаточности яичников). Доступны анализы *in vitro* и/или *in vivo* для измерения всех этих активностей, такие как анализы выживания нейронов или анализы роста нейритов.

[0118] Например, в анализе пролиферации клеток TF-1 готовят серийные разведения образцов (например, полипептидов NGF длительного действия) и контроля (например, носитель или мышинный NGF Stashing®) в 96-луночном планшете, затем в каждую лунку добавляют клетки TF-1 и инкубируют при температуре 37°C, 5% CO₂ во влажном инкубаторе. Через несколько дней (например, 3 дня) после инкубации в каждую лунку с суспензией клеток добавляют раствор MTS, инкубируют при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 3 часов. Затем можно измерить поглощение при 490 нм и 650 нм на спектрофотометре, чтобы показать, как фрагменты NGF или полипептиды NGF длительного действия способствуют пролиферации клеток TF-1. Данные могут быть нормализованы к контрольному образцу. Также для иллюстрации способа см. пример 4.

[0119] Для исследования биологической активности фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе также можно использовать анализы передачи клеточных сигналов. В продаже имеются различные наборы для анализа клеточных сигналов, например, для обнаружения аналитов, образующихся в процессе ферментативных реакций, участвующих в передаче сигналов, таких как ADP, AMP, UDP, GDP и факторы роста, или анализы фосфатазы для количественного определения как общих, так и фосфорилированных форм сигнальных белков. Например, после инкубации клеток с фрагментами NGF или полипептидами NGF длительного действия, описанными в настоящем документе, для определения активности

конкретной киназы клеточный лизат подвергают воздействию известного в данной области техники субстрата для фермента в присутствии радиоактивного фосфата. Продукты разделяют электрофорезом (с иммунопреципитацией или без нее), затем гель подвергают воздействию рентгеновской пленки, чтобы определить, включены ли в белки изотопы. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивность на клетках фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, определяют с помощью иммуногистохимии для обнаружения сигнальных белков. Например, можно использовать антитела к самим сигнальным белкам или сигнальные белки в их активированном состоянии. Эти антитела имеют распознающие эпитопы, которые включают фосфатную или другую активирующую конформацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения перемещение специфических сигнальных белков (например, ядерную транслокацию сигнальных молекул) можно отслеживать путем включения гена флуоресцентного белка, например, зеленого флуоресцентного белка (GFP), в генетические векторы, кодирующие исследуемый белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивность фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, на клетках исследуют с помощью вестерн-блоттинга. Например, все тирозин-фосфорилированные белки (или другие фосфорилированные аминокислоты, например, серин или треонин) могут быть обнаружены с помощью антитела против фосфотирозина (или антител против других фосфорилированных аминокислот) на вестерн-блоте клеточных лизатов, полученных после стимуляции во временной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивность фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, в отношении клеток можно определить с помощью иммунопреципитации. Например, первичные антитела к определенному сигнальному белку или ко всем тирозин-фосфорилированным белкам перекрестно связывают с гранулами. Клетки после инкубации с фрагментами NGF или полипептидами NGF длительного действия, описанными в настоящем документе, лизируют в буфере, содержащем ингибиторы протеазы, а затем инкубируют с гранулами, покрытыми антителами. Белки разделяют с помощью электрофореза с SDS, а затем белки идентифицируют с помощью методов, описанных для вестерн-блоттинга. В некоторых вариантах осуществления изобретения также можно использовать связывание глутатион-S-трансферазы (GST) или анализ «вытягивания вниз», который определяет прямые взаимодействия белок-белок (например, сигнальный белок).

[0120] Например, можно измерить передачу сигналов RAS/ERK1/2, чтобы отразить биологическую активность NGF в стимулировании роста клеток, например, путем фосфорилирования ERK1/2 с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники. Например, фосфорилирование ERK1/2 можно измерить с использованием антител, специфичных к фосфорилированной версии молекулы (необязательно в сочетании с анализом проточной цитометрии). Например, куриные эмбриональные ганглии задних корешков (DRG) или клетки TF-1 инкубируют при

температуре 37°C с фрагментами NGF или полипептидами NGF длительного действия, описанными в настоящем документе. После инкубации клетки сразу фиксируют для сохранения статуса фосфорилирования и пермеабиллизации. Клетки окрашивают антителами против фосфорилированного ERK1/2, например, Alexa488-конъюгированным анти-ERK1/2 pT202/pY204 (BD Biosciences), и анализируют с помощью проточной цитометрии. Передача сигналов PI 3-киназы может быть измерена с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники, который также отражает биологическую активность NGF. Например, передачу сигналов PI 3-киназы можно измерить с использованием антител, специфичных к рибосомному белку phospho-S6 (необязательно в сочетании с анализом проточной цитометрии).

[0121] Биологическая активность фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, также может быть отражена в экспериментах *in vivo* или *ex vivo*, например, путем измерения пролиферации индикаторных клеток, измерения индукции или ингибирования передачи сигналов, измерения объема ткани и/или массы и т.д.

[0122] Например, в анализе роста SCG *in vivo* образцы (например, полипептиды NGF длительного действия) и контроль (например, PBS или мышинный NGF SuTaiSheng®) можно вводить подкожно в шею новорожденных крыс либо путем однократной инъекции, либо путем многократного введения. Этим крыс умерщвляют для рассечения SCG через несколько дней после инъекции. SCG можно взвесить и зарегистрировать для морфологии для изучения биологической активности фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия в стимулировании роста SCG *in vivo*. Также для иллюстрации способа см. пример 5.

[0123] В анализе роста ганглиев дорсальных корешков, ганглии дорсальных корешков куриных эмбрионов (например, 8-дневного возраста) можно добавить в среду, содержащую различные концентрации либо образцов (например, полипептидов NGF длительного действия), либо контроля (например, PBS или мышинный NGF SuTaiSheng®) и культивируют в инкубаторе с насыщенной влажностью при 5% CO₂ и при температуре 37°C при температуре 37°C, например, в течение 24 часов. Отслеживается состояние роста дорсальных корешковых ганглиев, что может отражать биологическую активность фрагментов NGF или полипептидов NGF длительного действия в стимулировании роста дорсальных корешковых ганглиев. Удельную биологическую активность образцов также можно рассчитать, если в анализе участвует стандарт NGF, что отражается в AU/мг. Удельная активность исследуемого образца (AU/мг)=активность эталонного продукта (AU/мл)×[коэффициент предварительного разведения образца×активность соответствующего эталонного продукта в точке разведения (AU/мл)/фактическая активность эталонного продукта (AU/мл)]. Также для иллюстрации способа см. пример 5 из WO2017157326.

[0124] В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент NGF (или полипептид NGF длительного действия), описанный в настоящем документе, содержит

мутацию или модификацию (например, посттрансляционную модификацию), которая сохраняет/усиливает/снижает его биологическую активность по сравнению с NGF дикого типа (или полипептидом, содержащим NGF дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный или модифицированный фрагмент NGF или полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, имеет кратность аналогичную (например, равную) или по меньшей мере около 2 (например, по меньшей мере около 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 или более) биологической активности (например, стимуляция роста клеток) по сравнению с диким типом NGF (или полипептид, содержащий NGF дикого типа). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, имеет кратность аналогичную (например, равную) или по меньшей мере около 1,1 (например, по меньшей мере около 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более) биологической активности (например, стимуляция роста клеток, заживление ран) по сравнению с фрагментом NGF (например, соответствующим фрагментом NGF полипептида NGF длительного действия).

Фармакокинетика (PK)

[0125] Фармакокинетика (PK) относится к абсорбции, распределению, метаболизму и выведению лекарственного средства (например, фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе) после его введения субъекту. Фармакокинетические параметры, которые могут быть использованы при определении клинической полезности, включают, помимо прочего, концентрацию в сыворотке/плазме, концентрацию в сыворотке/плазме с течением времени, максимальную концентрацию в сыворотке/плазме (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), период полувыведения ($t_{1/2}$), площадь под кривой «концентрация-время» в пределах интервала дозирования (AUC_{τ}) и т. д.

[0126] Методы получения фармакокинетической кривой лекарственного средства, такого как фрагмент NGF или полипептид NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, или эталонного лекарственного средства (например, мышинный NGF SuTaiSheng®), известны в данной области. См., например, Heller *et al.*, *Annu Rev Anal Chem*, 11, 2018; и Ghandforoush-Sattari *et al.*, *J Amino Acids*, Article ID 346237, Volume 2010. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармакокинетические кривые фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, для индивидуума получают при анализе образца крови, плазмы или сыворотки индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармакокинетические кривые фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, получали с использованием методики масс-спектрометрии, такой как ЖХ-МС/МС или ELISA. PK анализ на фармакокинетических кривых можно проводить любыми методами, известными в данной области, такими как некомпартментальный анализ, например, с использованием программного обеспечения PKSolver V2 (Zhang Y. *et al.*, «PKSolver: An

add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel», Comput Methods Programs Biomed. 2010; 99(3):306-1). Для иллюстрации метода см. также пример 6.

[0127] «С» обозначает концентрацию лекарственного средства (например, фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия) в плазме крови, сыворотке или в любой соответствующей жидкости или ткани организма субъекта и обычно выражается в виде массы на единицу объема, например, наногаммы на миллилитр. Для удобства концентрация лекарственного средства в сыворотке или плазме упоминается в настоящем документе как «концентрация в сыворотке» или «концентрация в плазме». Концентрация в сыворотке/плазме в любое время после введения лекарственного средства (например, фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия, такого как внутривенное, внутривенное или подкожное введение) обозначается как C_{time} или C_t . Максимальная концентрация лекарственного средства в сыворотке/плазме в течение периода дозирования обозначается как C_{max} , тогда как C_{min} относится к минимальной концентрации лекарственного средства в сыворотке/плазме в конце интервала дозирования; и C_{ave} относится к средней концентрации в течение интервала дозирования.

[0128] Термин «биодоступность» относится к степени, а иногда и к скорости, с которой лекарственное средство (например, часть NGF или полипептид NGF длительного действия) попадает в системный кровоток, тем самым получая доступ к месту воздействия.

[0129] «AUC» представляет собой площадь под кривой «концентрация-время» в сыворотке/плазме и считается наиболее надежной мерой биодоступности, такой как площадь под кривой «концентрация-время» в интервале дозирования (AUC_t), «общее воздействие» или «общее воздействие лекарственного средства во времени» ($AUC_{0-\text{last}}$ или $AUC_{0-\text{inf}}$), площадь под кривой зависимости концентрации от времени во время t после введения (AUC_{0-t}) и т. д.

[0130] Пиковое время концентрации в сыворотке/плазме (T_{max}) представляет собой время, когда достигается пиковая концентрация в сыворотке/плазме (C_{max}) после введения лекарственного средства (например, фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия).

[0131] Период полувыведения ($t_{1/2}$) представляет собой количество времени, необходимое для того, чтобы концентрация лекарственного средства (например, фрагмента NGF или полипептида NGF длительного действия), определенная в плазме или сыворотке (или других биологических матрицах) уменьшилась точно до половины его концентрации или количества в определенный момент времени. Например, после внутривенного введения концентрация препарата в плазме или сыворотке снижается ввиду как распределения, так и элиминации. В профиле концентрации лекарственного средства в плазме или сыворотке с течением времени после внутривенного введения считается, что первая фаза или быстрое снижение в первую очередь связано с распределением, в то время как более поздняя фаза снижения обычно более медленная и считается в основном связанной с элиминацией, хотя оба процесса происходят в обеих фазах. Распределение считается завершенным по

прошествии достаточного времени. Как правило, период полувыведения определяется по терминальной или преобладающей фазе зависимости концентрации плазмы/сыворотки от времени. См., например, Michael Schrag and Kelly Regal, «Chapter 3 - Pharmacokinetics and Toxicokinetics» of «A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development», 2013.

[0132] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, обладает периодом полувыведения (например, при внутривенном, подкожном или внутримышечном введении, например, человеку) по меньшей мере около 5 часов, например, по меньшей мере около 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 часов или дольше. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, обладает периодом полувыведения (например, при внутривенном введении, например, человеку) от около 5 часов до около 300 часов, например, от около 8 часов до около 100 часов, от около 10 часов до около 60 часов, от около 15 часов до около 60 часов или от около 20 часов до около 58 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, вводят в виде однократного введения, такого как однократная внутривенная инъекция или инфузия, однократная внутримышечная инъекция или однократная подкожная инъекция. В некоторых вариантах осуществления изобретения период полувыведения из кровотока полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, составляет около 55 часов.

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения период полувыведения фрагмента NGF представляет собой от около 1 часа до около 2,5 часов, например, от около 1,5 часов до около 2,4 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения период полувыведения из кровотока полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, по меньшей мере примерно в 5 раз превышает период полувыведения соответствующего фрагмента NGF (то есть фрагмента NGF, содержащегося в полипептиде NGF длительного действия, но без слияния с Fc) или NGF дикого типа, например, по меньшей мере примерно в 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз или больше по сравнению с соответствующим фрагментом NGF или NGF дикого типа.

Вызывающая боль активность

[0134] NGF является хорошо подтвержденной мишенью для боли, поскольку он вызывает боль у животных и людей. У взрослых NGF, в частности, способствует здоровью и выживанию подмножества центральных и периферических нейронов (Huang & Reichardt, Ann. Rev. Neurosci. 24:677-736 (2001)). NGF также способствует модуляции функциональных характеристик этих нейронов и осуществляет тонический контроль над чувствительностью или возбудимостью сенсорных болевых рецепторов, называемых ноцицепторами (Priestley et al., Can. J. Physiol. Pharmacol. 80:495-505 (2002); Bennett,

Neuroscientist 7:13-17 (2001)). Ноцицепторы воспринимают и передают в центральную нервную систему различные болевые раздражители, которые вызывают восприятие боли (ноцицепция). Рецепторы NGF расположены на ноцицепторах. Экспрессия NGF увеличивается в поврежденных и воспаленных тканях и активируется при болевых состояниях человека. Ноцицепция/боль, индуцированная NGF, опосредована высокоаффинным рецептором NGF, trkA (тирозинкиназа рецептора A) (Sah, et al., Nat. Rev. Drug Disc. 2:460-72 (2003)).

[0135] В самом широком смысле термин «боль» относится к эмпирическому явлению, которое является в высшей степени субъективным для переживающего его индивидуума и зависит от психического состояния индивидуума, включая окружающую среду и культурный фон. «Физическая» боль обычно может быть связана с воспринимаемым третьим лицом раздражителем, который является причиной фактического или потенциального повреждения тканей. В этом смысле боль можно рассматривать как «сенсорное и эмоциональное переживание, связанное с фактическим или потенциальным повреждением тканей или описываемое с точки зрения такого повреждения», согласно Международной ассоциации изучения боли (IASP). Однако в некоторых случаях боль не имеет видимой причины. Например, психогенная боль, в том числе обострение ранее существовавшей физической боли психогенными факторами или синдромами иногда стойкой, воспринимаемой боли у лиц с психическими расстройствами без каких-либо признаков осязаемой причины боли.

[0136] Боль включает ноцицептивную боль, нейропатическую/нейрогенную боль, прорывную боль, аллодинию, гипералгезию, гиперестезию, дизестезию, парестезию, гиперпатию, фантомную боль в конечностях, психогенную боль, болезненную анестезию, невралгию, неврит. Другие категории включают злокачественную боль, ангинозную боль и/или идиопатическую боль, комплексный регионарный болевой синдром I, комплексный регионарный болевой синдром II. Типы и симптомы боли не обязательно должны быть взаимоисключающими. Эти термины предназначены для использования в соответствии с определением IASP.

[0137] Ноцицептивная боль инициируется специализированными сенсорными ноцицепторами в периферических нервах в ответ на вредные стимулы, кодируя вредные стимулы в потенциалы действия. Ноцицепторы, как правило, на волокнах A δ и (полимодальных) волокнах C, представляют собой свободные нервные окончания, которые заканчиваются непосредственно под кожей, в сухожилиях, суставах и органах тела. Нейроны ганглия задних корешков (DRG) обеспечивают связь между периферией и спинным мозгом. Сигнал проходит через спинной мозг к стволу головного мозга и таламическим участкам и, наконец, к коре головного мозга, где он обычно (но не всегда) вызывает ощущение боли. Ноцицептивная боль может быть результатом широкого спектра химических, термических, биологических (например, воспалительных) или механических событий, которые потенциально могут раздражать или повреждать ткани тела, которые

обычно превышают определенный минимальный порог интенсивности, необходимый для того, чтобы вызвать ноцицептивную активность в ноцицепторах.

[0138] Нейропатическая боль, как правило, является результатом аномального функционирования периферической или центральной нервной системы, вызывая соответственно периферическую или центральную невропатическую боль. Нейропатическая боль определяется IASP как боль, инициированная или вызванная первичным поражением или дисфункцией нервной системы. Нейропатическая боль часто связана с фактическим повреждением нервной системы, особенно в хронических случаях. Воспалительная ноцицептивная боль обычно является результатом повреждения тканей и возникающего в результате воспалительного процесса. Нейропатическая боль может сохраняться долгое время (например, месяцы или годы) после видимого заживления любого видимого повреждения тканей.

[0139] В случаях невропатической боли сенсорная обработка пораженной области может стать аномальной, и безобидные раздражители (например, тепло, прикосновение/давление), которые в норме не вызывают боли, могут ее вызывать (например, аллодиния), или вредные раздражители могут вызывать преувеличенное восприятие боли (например, гипералгезия) в ответ на обычно болезненный раздражитель. Кроме того, нормальные раздражители могут вызывать ощущения, подобные покалыванию электрическим током или ударам, или «покалываниям» (то есть парестезии) и/или ощущениям, имеющим неприятные свойства (то есть дизестезии). Прорывная боль представляет собой обострение существовавшей ранее хронической боли. Гиперпатия представляет собой болевой синдром, возникающий в результате аномально болезненной реакции на раздражитель. Стимул в большинстве случаев является повторяющимся с повышенным болевым порогом, что можно расценивать как наименьшее ощущение боли, которое пациент может распознать как боль.

[0140] Примеры невропатической боли включают тактильную аллодинию (например, вызванную повреждением нерва), невралгию (например, постгерпетическую (или постопоясывающую) невралгию, невралгию тройничного нерва), рефлекторную симпатическую дистрофию/каузалгию (травма нерва), компоненты онкологической боли (например, боль из-за самого рака или связанных с ним состояний, таких как воспаление, или из-за лечения, такого как химиотерапия, хирургия или лучевая терапия), фантомную боль в конечностях, ущемление невропатии (например, синдром запястного канала) и невропатии, такие как периферическая невропатия (например, из-за диабета, ВИЧ, хронического употребления алкоголя, воздействия других токсинов (включая многие химиотерапевтические препараты), дефицита витаминов и большого количества других заболеваний). Нейропатическая боль включает боль, вызванную проявлением патологической работы нервной системы после повреждения нерва по различным причинам, например хирургической операции, раны, опоясывающего лишая, диабетической невропатии, ампутации ног или рук, рака и тому подобное. Медицинские

состояния, связанные с невропатической болью, включают травматическое повреждение нерва, инсульт, рассеянный склероз, сирингомиелию, повреждение спинного мозга и рак.

[0141] Раздражитель, вызывающий боль, часто вызывает воспалительную реакцию, которая сама по себе может способствовать ощущению боли. В некоторых случаях боль может быть вызвана сложной смесью ноцицептивных и невропатических факторов. Например, хроническая боль часто включает воспалительную ноцицептивную боль или невропатическую боль или их смесь. Первоначальная дисфункция или травма нервной системы могут спровоцировать высвобождение нейронами медиаторов воспаления и последующее невропатическое воспаление. Например, мигренозные головные боли могут представлять собой смесь невропатической и ноцицептивной боли. Кроме того, миофасциальная боль, вероятно, является вторичной по отношению к ноцицептивному воздействию мышц, но аномальная мышечная активность может быть результатом невропатических состояний.

[0142] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, характеризуется сниженной болью или не вызывает боли у субъекта, например, по сравнению с соответствующим фрагментом NGF без слитого Fc, по сравнению с NGF дикого типа или по сравнению с другими слитыми белками NGF-Fc, не описанными в настоящем документе (далее именуемые как «эталонная конструкция NGF»). В некоторых вариантах осуществления изобретения боль представляет собой острую боль, кратковременную боль, постоянную или хроническую ноцицептивную боль или постоянную или хроническую невропатическую боль. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, вызывает по меньшей мере на около 10% меньшую боль по сравнению с эталонной конструкцией NGF (например, β -NGF дикого типа), например, по меньшей мере на около 20%, 25%, 30%, 35%, на 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% меньшую боль по сравнению с эталонной конструкцией NGF. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, не вызывает боли при введении субъекту.

[0143] Вызывающую боль активность можно измерить любыми способами, известными в данной области, такими как способы, описанные в WO2017157325, WO2017157326 и CN108727486A, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения боль измеряется болевым порогом, чем выше болевой порог, тем меньше боль.

[0144] Например, вызывающую боль активность можно измерить, попросив пациента оценить качество и интенсивность испытываемой боли по ряду различных шкал. Вербальная шкала боли использует слова для описания диапазона от отсутствия боли, слабой боли, умеренной боли и сильной боли с оценкой от 0 до 3, присвоенной каждому. Альтернативно, пациента можно попросить оценить свою боль по числовой шкале боли от 0 (отсутствие боли) до 10 (сильнейшая возможная боль). На визуальной аналоговой шкале

(VAS) вертикальная или горизонтальная линия имеет слова, описывающие боль от отсутствия боли до максимально возможной боли, и пациента просят отметить линию в точке, которая представляет его текущий уровень боли. Индекс боли Макгилла позволяет пациентам описать как качество, так и интенсивность боли, выбирая слова, которые лучше всего описывают их боль, из серии коротких списков, например: стучит, жжет, щиплет. Другие шкалы боли можно использовать для взрослых, которые испытывают трудности с использованием VAS или числовых шкал, например, FACES, или для невербальных пациентов, например, поведенческая рейтинговая шкала. Оценка функциональной активности показывает, насколько пациенту мешает боль, когда его просят выполнить задание, связанное с болезненной областью. Улучшение оценки боли с использованием этих типов шкал, например, по сравнению с эталонными конструкциями NGF, потенциально может указывать на уменьшение побочного эффекта, вызывающего боль, для исследуемых конструкций NGF (например, полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе).

[0145] В некоторых вариантах осуществления изобретения вызывающая боль активность полипептида NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, может быть исследована на мышцах методом горячей пластины (54-55°C) для определения болевого порога. Вкратце, подходящих мышцей подвергают анестезии, затем используют метод зажима нерва для создания мышечной модели повреждения седалищного нерва, в то время как в группе ложной операции седалищный нерв только отделяют, но не зажимают. Затем мышцей делят на три группы: группу ложной операции, группу контроля травм (нормальный физиологический раствор) и экспериментальную группу (лечение полипептидами NGF длительного действия, описанными в настоящем документе, и/или контрольным NGF, таким как мышечный β -NGF). Болевой порог у каждой мышцей определяется латентностью облизывания задних лап, которую можно измерить до операции и в разные моменты времени после операции. Повышение болевого порога $\% = (\text{болевой порог на 10-й день после травмы} - \text{болевой порог до травмы}) \times 100\% / \text{болевой порог до травмы}$.

[0146] Вызывающая боль активность полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, также может быть исследована на мышцах путем измерения реакции искривленных когтей у мышцей при механической стимуляции для определения болевого порога. Это может быть проверено при кратковременном состоянии, вызывающем боль, или при длительном состоянии, вызывающем боль. Вкратце, мышцам, отвечающим критериям ответа, подкожно инъецировали в лапки либо носитель, либо полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе (или контрольный NGF, такой как мышечный β -NGF; может быть в различных концентрациях), затем измеряли реакцию изогнутого когтя при механической стимуляции после инъекции (например, в различных временных точках), что отражает болевой порог после лечения.

[0147] Вызывающая боль активность полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, также может быть исследована с помощью

поведенческих тестов. Например, носитель или полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе (или контрольный NGF, такой как мышинный β -NGF; может быть в различных концентрациях), можно вводить в суставы мышей, затем можно исследовать, вызывают ли образцы боль, регистрируя время поддержания подъема лапки и число подъемов лапки после введения (например, в разные моменты времени) для расчета общей продолжительности подъема лапки. Более короткая общая продолжительность подъема лапки указывает на меньшую активность, вызывающую боль.

Стабильность

[0148] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, обладают превосходной стабильностью, такой как физическая стабильность, химическая стабильность и/или биологическая стабильность. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, обладают превосходной термостабильностью, такой как высокая температура плавления (T_m) и/или высокая температура начала агрегации (T_{agg}). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, обладают превосходной стабильностью при ускоренном стрессе (например, высокой температуре), такой как меньшая фрагментация или отсутствие фрагментации, образования агрегатов и/или увеличения агрегатов.

[0149] Стабильность белка, в частности склонность к агрегации, в первую очередь определяется конформационной и коллоидной стабильностью белковых молекул. Принято считать, что первой стадией агрегации ненативного белка, которая является наиболее распространенной формой агрегации, является небольшое нарушение молекулярной структуры, например, частичное разворачивание белка, то есть изменение конформации. Это определяется конформационной стабильностью белка. На втором этапе частично развернутые молекулы затем сближаются, движимые диффузией и случайным броуновским движением, образуя агрегаты. Этот второй этап в первую очередь определяется коллоидной стабильностью молекул (см. Chi et al., Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Protein Science, 2003 May; 12(5): 903-913). Как используется в настоящем документе, термин «стабильность» обычно относится к сохранению целостности или к минимизации деградации, денатурации, агрегации или разворачивания биологически активного агента, такого как белок. Как используется в настоящем документе, термин «улучшенная стабильность» обычно означает, что в условиях, которые, как известно, приводят к деградации, денатурации, агрегации или разворачиванию, интересующий белок (например, описанные в настоящем документе полипептиды NGF длительного действия) сохраняет большую стабильность по сравнению с контрольным белком (например, другие слитые белки NGF-Fc).

[0150] Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) и дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF) являются хорошо известными методами в данной

области, которые используются для прогнозирования стабильности белкового состава. В частности, эти методы можно использовать для определения температуры разворачивания (T_m) белка в данном составе. В данной области техники принято коррелировать измерения высокой T_m для белка в данной композиции с более надежными и стабильными белковыми композициями для длительного и стабильного хранения.

[0151] «Стабильный» белок (или состав), например, полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, по существу сохраняет свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность в процессе получения и/или при хранении. В данной области доступны различные аналитические методики для измерения стабильности белка и они рассмотрены в работах Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991), и Jones, A. (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90. Например, в одном варианте осуществления изобретения стабильность белка определяют по процентному содержанию мономерного белка в растворе с низким процентным содержанием расщепленного (например, фрагментированного) и/или агрегированного белка. Предпочтительно, белок (или состав) стабилен при комнатной температуре (около 30°C) или при 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца, и/или он стабилен при температуре около 2-8°C по меньшей мере в течение 6 месяцев или по меньшей мере в течение 1 год или не менее 2 лет. Кроме того, белок (или состав), предпочтительно, является стабильным после замораживания (например, до -70°C) и оттаивания, что в дальнейшем именуется как «цикл замораживания/оттаивания».

[0152] Белок, например, полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, «сохраняет свою физическую стабильность» в составе, если он практически не проявляет признаков нестабильности, например, агрегации, преципитации и/или денатурации, при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности или при измерении с помощью рассеяния УФ-света или методом эксклюзионной хроматографии. Агрегация представляет собой процесс, при котором отдельные белковые молекулы или комплексы связываются ковалентно или нековалентно с образованием агрегатов. Агрегация может продолжаться до образования видимого осадка.

[0153] Белок, например, полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, «сохраняет свою химическую стабильность» в составе, если химическая стабильность в данный момент такова, что считается, что белок все еще сохраняет свою биологическую активность (например, как указано в подразделе «Биоактивность» выше). Химическую стабильность можно оценить, например, путем обнаружения и количественного определения химически измененных форм белка. Химическое изменение может включать модификацию размера (например, отсечение), которую можно оценить, например, с помощью эксклюзионной хроматографии, SDS-PAGE и/или масс-спектрометрии с лазерной десорбцией и ионизацией/временем пролета с использованием матрицы (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения

включают изменение заряда (например, происходящее в результате дезамидирования или окисления), которое можно оценить, например, с помощью ионообменной хроматографии.

[0154] Белок, например, полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, «сохраняет свою биологическую активность» в составе, если белок в фармацевтическом составе является биологически активным по назначению. Например, биологическая активность сохраняется, если биологическая активность белка в препарате находится в пределах около 30%, около 20% или около 10% (в пределах ошибок анализа) биологической активности, проявляемой в процессе получения препарата.

[0155] Специалисту в данной области понятно, что стабильность белка (например, полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе) зависит от других характеристик помимо состава препарата. Например, на стабильность могут влиять температура, давление, влажность, pH и внешние формы излучения. Стабильность белка (например, описанных в настоящем документе полипептидов NGF длительного действия) в белковом составе можно определить различными способами. В некоторых вариантах осуществления стабильность белка определяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). SEC разделяет аналиты (например, макромолекулы, такие как белки) на основе комбинации их гидродинамического размера, коэффициента диффузии и свойств поверхности. Таким образом, например, SEC может отделить описанные в настоящем документе полипептиды NGF длительного действия в их естественной трехмерной конформации от белков в различных состояниях денатурации и/или белков, которые подверглись деградации. В SEC неподвижная фаза обычно состоит из инертных частиц, упакованных в плотную трехмерную матрицу внутри стеклянной или стальной колонки. Подвижной фазой может быть чистая вода, водный буфер, органический растворитель, их смеси или другие растворители. Частицы стационарной фазы имеют небольшие поры и/или каналы, через которые могут проникать частицы меньше определенного размера. Таким образом, крупные частицы исключаются из этих пор и каналов, а более мелкие удаляются из текущей подвижной фазы. Время, в течение которого частицы иммобилизуются в порах стационарной фазы, частично зависит от того, насколько глубоко в поры они могут проникнуть. Их удаление из потока подвижной фазы приводит к тому, что им требуется больше времени для элюирования из колонки, что приводит к разделению частиц на основе различий в их размерах. См. пример 3, в котором представлены иллюстративные способы.

[0156] В некоторых вариантах осуществления SEC сочетается с методом идентификации для идентификации или характеристики белков (например, полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе) или их фрагментов. Идентификация и характеристика белков могут быть выполнены с помощью различных методов, включая, помимо прочего, хроматографические методы, например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (CE-SDS), иммуноанализ, электрофорез, ультрафиолетовая/видимая/инфракрасная спектроскопия, рамановская спектроскопия, рамановская спектроскопия с усилением поверхности, масс-спектрометрия, газовая

хроматография, статическое светорассеяние (SLS), инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR), круговой дихроизм (CD), методы разворачивания белка, индуцированного мочевиной, собственная флуоресценция триптофана, дифференциальная сканирующая калориметрия и/или связывание белка ANS.

[0157] В некоторых вариантах осуществления изобретения образцы составов (например, содержащие полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе) и эталонные составы (например, содержащие другие слитые белки NGF-Fc или стандарты) необязательно анализируют перед фазой обработки для определения содержания мономера, агрегированного и/или фрагментированного белка (и/или % увеличения фрагментации, % увеличения агрегации и т. д.), как описано ниже в примере 3. Затем каждый из белковых составов подвергается фазе обработки. Например, каждый белковый состав можно хранить в течение длительного периода (например, 3 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев или дольше) при определенной температуре (например, 40°C, 25°C или 5°C). В некоторых вариантах осуществления белковые составы подвергаются стресс-тесту, например, анализу на напряжение при перемешивании. В некоторых вариантах осуществления изобретения белковые составы подвергаются ускоренному тесту на стабильность, например, обработке в условиях ускоренного стресса, включая воздействие высокой температуры (например, 40°C), высокой влажности и/или низкого pH и т. д. В некоторых вариантах осуществления изобретения белковые составы подвергаются циклам замораживания и оттаивания. В некоторых вариантах осуществления изобретения образцы одного и того же белкового состава подвергаются дифференцированной обработке, например, хранению в течение определенного периода времени при разных температурах. После фазы обработки белковые составы анализируют для определения содержания белкового мономера, агрегатов и/или фрагментов (и/или % увеличения фрагментации, % увеличения агрегации и т. д.). В некоторых вариантах осуществления изобретения белковые составы обрабатывают при непрерывном нагревании для определения температуры плавления (T_m) и/или температуры начала агрегации (T_{agg}), например, повышение температуры от около 20°C до около 95°C (например, при скорости нагрева примерно 0,3°C/мин). T_m и T_{agg} можно определить по изменению поглощения флуоресценции и светорассеяния при 266 нм/473 нм, соответственно, на анализаторе флуоресцентного белка. Более высокая T_m указывает на более высокую термическую стабильность. Более высокая T_{agg} указывает на меньшую склонность к агрегации. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, имеют T_m по меньшей мере около 50°C, например, по меньшей мере около 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C или 75°C. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, имеют T_{agg} по меньшей мере около 50°C, например, по меньшей мере около 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C или 85°C.

[0158] Стабильность композиции или состава, такую как физическая стабильность, можно оценить способами, хорошо известными в данной области, включая определение кажущегося ослабления света образца (поглощение или оптическая плотность). Такое определение ослабления света относится к мутности состава. Мутность состава частично является внутренним свойством белка, растворенного в растворе, и обычно определяется нефелометрией и измеряется в нефелометрических единицах мутности (NTU).

[0159] Степень мутности, например, как функцию концентрации одного или нескольких компонентов в растворе, например, концентрации белка и/или соли, также называют «опалесценцией» или «опалесцирующим внешним видом» состава. Степень мутности можно рассчитать по стандартной кривой, построенной с использованием суспензий с известной мутностью. Эталонные стандарты для определения степени мутности для фармацевтических композиций могут быть основаны на критериях Европейской фармакопеи (European Pharmacopoeia, Fourth Ed., Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg, France). Согласно критериям Европейской фармакопеи, прозрачный раствор определяется как раствор с мутностью, меньшей или равной эталонной суспензии, которая имеет мутность приблизительно 3 в соответствии со стандартами Европейской фармакопеи. Нефелометрические измерения мутности могут обнаруживать рассеяние Рэлея, которое обычно изменяется линейно с концентрацией, при отсутствии эффектов ассоциации или неидеальности. Другие способы оценки физической стабильности фармацевтического белка хорошо известны в данной области, например, эксклюзионная хроматография или аналитическое ультрацентрифугирование.

[0169] В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильность относится к составу, содержащему полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, с уровнем образования частиц от низкого до неопределяемого. Фраза «уровни образования частиц от низкого до неопределяемого», используемая в настоящем документе, относится к образцам, содержащим менее чем 30 частиц/мл, менее чем 20 частиц/мл, менее чем 15 частиц/мл, менее чем 10 частиц/мл, менее чем 5 частиц/мл, менее чем 2 частиц/мл или менее чем 1 частица/мл, как определено анализом НІАС или визуальным анализом. В некоторых вариантах осуществления изобретения ни с помощью анализа НІАС, ни с помощью визуального анализа частицы в составе полипептида NGF длительного действия не обнаруживаются.

[0161] «Значительная агрегация белка» относится к уровню агрегации белка в белковом составе, который значительно превышает уровень агрегации белка в эталонном белковом составе. Эталонный белковый состав может представлять собой тот же белковый состав, что и перед периодом хранения или перед обработкой (например, до воздействия дестабилизирующих условий, таких как повышенная температура, влажность, pH и/или длительное хранение). Эталонный белковый состав может представлять собой другой белковый состав (например, другие слитые белки NGF-Fc или фрагмент NGF без слитого Fc), исследованный в тех же условиях.

[0162] Выражение «практически свободный от агрегации белков» относится к белкам (или составам) по изобретению, которые не имеют значительно более высокого уровня или процентного содержания агрегированного белка, чем эталонный состав. Например, эта фраза относится к белкам (или составам), в которых уровень агрегации белков составляет менее чем около 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% или 0,1%. Уровень агрегации белка может быть определен с использованием стандартных способов, известных в данной области, таких как описанные в примере 3 настоящего документа. В некоторых вариантах осуществления изобретения в полипептиде NGF длительного действия, описанном в настоящем документе, по существу отсутствует агрегация белков (например, в ускоренном тесте на стабильность). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет более чем около 15% агрегации белка, например, не более чем около 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% агрегации белка (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как нагревание). В некоторых вариантах осуществления изобретения в полипептиде NGF длительного действия, описанном в настоящем документе, отсутствует агрегация белка (например, при ускоренном тесте на стабильность, таком как нагревание). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет не более чем около 15% увеличения агрегации, например, не более чем около 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% 2% или 1% увеличения агрегации (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как ускоренный нагрев). В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильность определяется с помощью SEC. В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильность определяется с помощью CE-SDS.

[0163] В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильность относится к уменьшенной фрагментации полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе. Термин «уровни фрагментации от низкого до неопределяемого», как используется в настоящем документе, относится к образцам, содержащим общий белок в количестве равном или более 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, например, в виде одного пика, как определено с помощью HPSEC, или в виде нескольких пиков (например, столько пиков, сколько субъединиц), полученных с помощью восстановленного капиллярного гель-электрофореза (rCGE), представляющего нерасщепленный белок или его нерасщепленный фрагмент и не содержащих других одиночных пиков, имеющих более 5%, более 4%, более 3%, более 2%, более 1% или более 0,5% общего белка в каждом. Термин «восстановленный капиллярный гель-электрофорез», используемый в настоящем документе, относится к капиллярному гель-электрофорезу в восстанавливающих условиях, достаточных для восстановления дисульфидных связей в белке, содержащем Fc, таком как полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет фрагментацию от около 0% до около 15%, например, фрагментацию от около 0% до около 12% (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как ускоренный нагрев). В некоторых вариантах

осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет фрагментацию не более чем около 30%, например, фрагментацию не более чем около 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как ускоренный нагрев). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия не имеет фрагментации (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как ускоренный нагрев). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия характеризуется увеличением фрагментации не более чем на около 30%, например, увеличением фрагментации не более чем на около 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как ускоренный нагрев). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия имеет по меньшей мере около 75% основного пика, например, по меньшей мере около 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% основного пика (например, в ускоренном тесте на стабильность, таком как ускоренный нагрев). В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильность определяется с помощью SEC. В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильность определяется с помощью CE-SDS.

Производные полипептидов NGF длительного действия

[0164] В некоторых вариантах осуществления полипептиды NGF длительного действия, представленные в настоящем документе, могут быть дополнительно модифицированы для включения дополнительных небелковых фрагментов, которые известны в данной области и легко доступны. Фрагменты, подходящие для дериватизации полипептида NGF длительного действия, включают, но не ограничиваются ими, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но этим не ограничиваются, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), а также декстран или поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пролипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропионовый альдегид может иметь преимущества при производстве из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, присоединенных к полипептиду NGF длительного действия, может варьироваться, и, если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определить на основе таких

соображений, включая, но этим не ограничиваясь, как конкретные свойства или функции полипептида NGF длительного действия, которые необходимо улучшить, будет ли производное полипептида NGF длительного действия использоваться в терапии при определенных условиях и т. д.

[0165] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, дополнительно содержит метку, выбранную из группы, включающей хромофор, флуорофор (например, кумарин, ксантен, цианин, пирен, бораполиазиндацен, оксазин и их производные), флуоресцентный белок (например, GFP, фикобилипротеины и их производные), фосфоресцирующий краситель (например, диоксетановые, ксантеновые или карбоцианиновые красители, хелаты лантанидов), tandemный краситель (например, производное цианина-фикобилипротеина и производное ксантен-фикобилипротеина), частицу (например, кластеры золота, коллоидное золото, микросферы, квантовые точки), гаптен, фермент (например, пероксидаза, фосфатаза, гликозидаза, люцифераза) и радиоизотоп ^{125}I , ^3H , ^{14}C , ^{32}P).

[0166] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия может быть дополнительно модифицирован для включения одного или нескольких биологически активных белков, полипептидов или их фрагментов. «Биоактивный» или «биологически активный», как используется в настоящем документе взаимозаменяемо, означает проявление биологической активности в организме для выполнения конкретной функции. Например, это может означать комбинацию с определенной биомолекулой, такой как белок, ДНК и т. д., и затем усиление или ингибирование активности такой биомолекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивный белок или его фрагменты включают белки и полипептиды, которые вводят пациентам в качестве активного лекарственного вещества для профилактики или лечения заболевания или состояния, а также белки и полипептиды, которые применяют в диагностических целях, например, ферменты, используемые в диагностических тестах или анализах *in vitro*, а также белки и полипептиды, которые вводят пациенту для предотвращения заболевания, такие как вакцина. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивный белок или его фрагменты обладают иммуностимулирующей/иммунорегуляторной, мембранотранспортной или ферментативной активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения биологически активный белок, полипептиды или их фрагменты представляют собой фермент, гормон, фактор роста, цитокин или их смесь. В некоторых вариантах осуществления изобретения биологически активный белок, полипептиды или фрагменты могут специфически распознавать целевой пептид (такой как антиген или другие белки).

[0167] В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивный белок или его фрагменты, которые могут содержаться в полипептиде NGF длительного действия, описанном в настоящем документе, представляют собой антигенсвязывающий белок (например, антитело). В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивный белок или его фрагменты, которые могут содержаться в полипептиде NGF длительного

действия, описанном в настоящем документе, представляют собой миметики антител, которые являются небольшими сконструированными белками, содержащими антигенсвязывающие домены, напоминающие антитела (Geering and Fussenegger, Trends Biotechnol., 33(2):65-79, 2015). Эти молекулы получены из существующих каркасных белков человека и состоят из одного полипептида. Примерами миметиков антител, которые могут быть включены в состав полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, могут быть, помимо прочего, сконструированный белок с анкириновым повтором (DARPin; содержащий 3-5 полностью синтетических анкириновых повторов, фланкированных N- и C-концевыми доменами Cap), мультимер авидности (авимер; высокоаффинный белок, содержащий несколько доменов А, каждый домен с низкой аффинностью к мишени), или антикалин (на основе каркаса липокалинов, с четырьмя доступными петлями, последовательность каждой из которых может быть рандомизирована). В некоторых вариантах осуществления изобретения биоактивный белок или его фрагменты, которые могут содержаться в полипептиде NGF длительного действия, описанном в настоящем документе, представляет собой белок с Argm-повторами (например, β -катенин, α -импортин, плакоглобин, аденоматозный полипоз толстой кишки (APC)), который содержит Argm-повторы (характерная повторяющаяся аминокислотная последовательность длиной около 40 остатков). Каждый Argm-повтор состоит из пары альфа-спиралей, которые образуют структуру шпильки. Множественные копии повтора образуют так называемую альфа-соленоидную структуру. Белки с Argm-повторами способны связывать различные типы пептидов, полагаясь на постоянный способ связывания пептидного остова, не требуя специфических консервативных боковых цепей или взаимодействий со свободными N- или C-концами пептида. Возможность узнавания пептидного остатка за остатком в сочетании с присущей повторному белку модульностью делает белки с Argm-повторами многообещающими кандидатами для создания родового каркаса для связывания пептидов.

III. Векторы, кодирующие полипептиды NGF длительного действия

[0168] Настоящее изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующим любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе. Предложены также выделенные клетки-хозяева (например, клетки CHO, клетки HEK 293, клетки Hela или клетки COS), содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, или векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует последовательность сигнального пептида (например, SEQ ID NO: 6) на N-конце полипептида NGF длительного действия. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует

последовательность пропептида (например, SEQ ID NO: 5) на N-конце полипептида NGF длительного действия. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует последовательность сигнального пептида (например, SEQ ID NO: 6), затем последовательность пропептида (например, SEQ ID NO: 5) на N-конце полипептида NGF длительного действия.

[0169] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NGF длительного действия, содержащая от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NGF длительного действия, содержащая (или состоящая по существу из, или состоящая из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 61-67. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, кроме того, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность сигнального пептида SEQ ID NO: 6 на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, кроме того, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность пропептида SEQ ID NO: 5 на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенная нуклеиновая кислота, кроме того, содержит (от 5' до 3') последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность сигнального пептида SEQ ID NO: 6, за которой следует последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность пропептида SEQ ID NO: 5 на 5'-конце.

[0170] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NGF длительного действия, содержащая (или состоящая по существу из, или состоящая из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44 и 46. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NGF длительного действия, содержащая (или состоящая по существу из, или состоящая из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44 и 46, за исключением последовательности сигнального пептида SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена выделенная нуклеиновая, содержащая (или состоящая по существу из, или состоящая из) последовательность нуклеиновой кислоты любой из SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41, 43 и 45.

[0171] В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из полипептиды NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, подходит для репликации и интеграции в эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих (например, клетки CHO, клетки HEK 293, клетки HeLa, клетки COS). В некоторых вариантах осуществления изобретения

вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой невирусный вектор, такой как рТТ5.

[0172] Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд основанных на вирусах систем. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, лентивирусный вектор, ретровирусные векторы, вирусный вектор простого герпеса и их производные. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Гетерологичная нуклеиновая кислота может быть встроена в вектор и упакована в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в данной области. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в сконструированную клетку млекопитающего *in vitro* или *ex vivo*. В данной области известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. В данной области известен ряд аденовирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления используются лентивирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления используются самоинактивирующиеся лентивирусные векторы. Например, самоинактивирующиеся лентивирусные векторы, несущие последовательность(и), кодирующую белок конструкции, могут быть упакованы в соответствии с протоколами, известными в данной области. Полученные лентивирусные векторы можно использовать для трансдукции клетки млекопитающего с использованием методов, известных в данной области. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в клетках-потомках. Лентивирусные векторы также обладают низкой иммуногенностью и могут трансдуцировать непролиферирующие клетки.

[0173] В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой невирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вектор рТТ5. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой транспозон, такой как система транспозонов «Спящая красавица» (SB) или система транспозонов PiggyBac. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой невирусный вектор на полимерной основе, включая, например, поли(молочно-гликолевую кислоту) (PLGA) и полимолочную кислоту (PLA), поли(этиленмин) (PEI) и дендримеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой невирусный вектор на основе катионного липида, такой как катионная липосома, липидная наноэмульсия и твердая липидная наночастица (SLN). В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой невирусный вектор на основе пептидного гена, такой как поли-L-лизин. Любой из известных невирусных векторов, пригодных для редактирования генома, может

быть использован для введения нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот), кодирующей полипептид NGF длительного действия, в клетки-хозяева. См., например, Yin H. et al., *Nature Rev. Genetics* (2014) 15:521-555; Aronovich EL et al. «The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy». *Hum. Mol. Genet.* (2011) R1: R14-20; и Zhao S. et al. «PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene editing». *Transl. Lung Cancer Res.* (2016) 5(1): 120-125, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения любую одну или несколько нуклеиновых кислот или векторов, кодирующих полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, вводят в клетки-хозяева (например, CHO, HEK 293, Hela или COS) физическим методом, включая, но этим не ограничиваясь, электропорацию, сонопорацию, фотопорацию, магнитофекцию, гидропорацию.

[0174] В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор содержит селективный маркерный ген или репортерный ген для отбора клеток, экспрессирующих полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, из популяции клеток-хозяев, трансфицированных с помощью векторов (например, лентивирусных векторов, векторов рТТ5). Как селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Например, вектор может содержать терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

[0175] Нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор с использованием любых известных в данной области способов молекулярного клонирования, включая, например, использование сайтов рестрикционных эндонуклеаз и одного или нескольких селективируемых маркеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Были исследованы разновидности промоторов для экспрессии генов в прокариотических клетках или эукариотических клетках (например, клетках млекопитающих), и любой из промоторов, известных в данной области, можно использовать в настоящем изобретении. Промоторы можно грубо классифицировать как конститутивные промоторы или регулируемые промоторы, такие как индуцибельные промоторы.

[0176] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, функционально связана с конститутивным промотором. Конститутивные промоторы позволяют конститутивно экспрессировать гетерологичные гены (также называемые трансгенами) в клетках-хозяевах. Типичные промоторы, рассматриваемые в настоящем документе, включают, но этим не ограничиваются, ранний промотор цитомегаловируса (CMV), фактор элонгации человека 1 альфа (hEF1 α), промотор убиквитина С (UbiC), промотор фосфоглицерокиназы (PGK), ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), куриный β -актиновый промотор в сочетании с ранним энхансером CMV (CAGG), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор энхансера полиомы/тимидинкиназы простого

герпеса (MC1), промотор бета-актина (β -ACT), промотор «с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленным участком отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev (MND)». Эффективность таких конститутивных промоторов в управлении экспрессией трансгена широко сравнивалась в огромном количестве исследований. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, функционально связана с промотором CMV.

[0177] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, функционально связана с индуцибельным промотором. Индуцибельные промоторы относятся к категории регулируемых промоторов. Индуцибельный промотор может быть индуцирован одним или несколькими условиями, такими как физическое состояние, микроокружение клеток-хозяев или физиологическое состояние клеток-хозяев, индуктор (то есть индуцирующий агент) или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцирующее условие не индуцирует экспрессию эндогенных генов в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцирующее условие выбрано из группы, включающей: индуктор, облучение (например, ионизирующее излучение, свет), температура (например, тепло), окислительно-восстановительное состояние и состояние активации клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор может представлять собой промотор NFAT, промотор TETON® или промотор NF κ B.

IV. Способы получения

[0178] Предложены также способы получения любого из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложен способ получения полипептида NGF длительного действия, включающий: (a) культивирование клетки-хозяина (например, клетки CHO, клетки HEK 293, клетки Hela или клетки COS), содержащей любую из нуклеиновых кислоты или векторы, кодирующие полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, в условиях, эффективных для экспрессии кодируемых полипептидов NGF длительного действия; и (b) получение экспрессированного полипептида NGF длительного действия из указанной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ на стадии (a) дополнительно включает получение клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе. Полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, могут быть получены с использованием любых способов, известных в данной области, или как описано в настоящем документе. Также см. пример 1 как иллюстрацию способа.

[0179] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, экспрессируются в эукариотических клетках, таких как клетки млекопитающих. В некоторых вариантах

осуществления изобретения полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, экспрессируются в прокариотических клетках. Когда полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, экспрессируются в прокариотических клетках, полученный фрагмент proNGF-(необязательный линкер)-Fc не может быть процессирован для получения последовательности пропептида. Следовательно, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NGF длительного действия, при использовании для экспрессии в прокариотических клетках может быть сконструирована без последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность пропептида (например, SEQ ID NO: 5).

1. Рекомбинантное получение в прокариотических клетках

а) Конструирование вектора

[0180] Последовательности полинуклеиновых кислот, кодирующие белковые конструкции по настоящей заявке, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методов. Полинуклеотиды могут быть синтезированы с использованием синтезатора нуклеотидного синтезатора или в рамках методики PCR. После их получения последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Для целей настоящего изобретения можно использовать многие доступные и известные в данной области векторы. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, которые должны быть вставлены в вектор, и от конкретной клетки-хозяина, которую нужно трансформировать вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или и то, и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Векторные компоненты обычно включают, но не этим ограничиваются: точку начала репликации, селективируемый ген-маркер, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

[0181] Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, полученные от видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются в сочетании с такими клетками-хозяевами. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечить фенотипический отбор трансформированных клеток. Например, *E. coli* обычно трансформируют с использованием pBR322, плазмиды, полученной из вида *E. coli*. pBR322 содержит гены, кодирующие резистентность к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, таким образом, обеспечивает легкий способ идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг могут также содержать соответствующие промоторы, или могут быть модифицированы, с тем, чтобы включать промоторы, которые могут использоваться микробным организмом для

экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии определенных антител, подробно описаны Carter *et al.*, патент США № 5648237.

[0182] Кроме того, в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами могут быть использованы фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином. Например, для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392, можно использовать бактериофаг, такой как GEMTM-11.

[0183] Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') цистрона, которая модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делятся на два класса: индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения условий культивирования, например, наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

[0184] Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор может быть далее функционально связан с цистроном ДНК, кодирующей полипептид, путем удаления промотора из источника ДНК за счет расщепления рестрикционным ферментом и встраивания выделенной последовательности промотора в вектор по настоящей заявке. Для осуществления амплификации и/или экспрессии целевых генов можно использовать как последовательность нативного промотора, так и последовательность многих гетерологичных промоторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются гетерологичные промоторы, поскольку они в основном позволяют достичь более высокого уровня транскрипции и более высокого выхода экспрессированного целевого гена по сравнению с нативным промотором целевого полипептида.

[0185] Промоторы, подходящие для использования в прокариотических клетках-хозяевах, включают промотор PhoA, промоторные системы β-галактамазы и лактозы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако также подходят другие промоторы, функционирующие в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их последовательности нуклеиновых кислот были опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту провести их оперативное лигирование с цистронами, кодирующими целевую легкую и тяжелую цепи (Siebenlist *et al.* (1980) *Cell* 20: 269) с использованием линкеров или адаптеров для создания любых необходимых сайтов рестрикции.

[0186] В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый цистрон в составе рекомбинантного вектора включает последовательность сигнала секреции, где данный компонент направляет транспортировку экспрессированных полипептидов через мембрану. В основном, сигнальная последовательность может представлять собой

компонент вектора или может представлять собой часть ДНК целевого полипептида, в которую встраивается вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей настоящего изобретения, должна быть такой последовательностью, которая распознается и процессируется (то есть расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином В случае прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, такая сигнальная последовательность замещается прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA и MBP.

[0187] В некоторых вариантах осуществления изобретения продукция белковой конструкции по настоящей заявке может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия секреторных сигнальных последовательностей в каждом цистроне. В некоторых вариантах осуществления полипептидные компоненты экспрессируются, сворачиваются и собираются с образованием белковой конструкции в цитоплазме. Некоторые штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* trxB-) обеспечивают условия цитоплазмы, благоприятные для образования дисульфидных связей, тем самым обеспечивая правильную укладку и сборку субъединиц экспрессированного белка. См. Proba и Pluckthun, *Gene*, 159:203 (1995).

б) Прокариотические клетки-хозяева

[0188] Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии белков по настоящей заявке включают Archaeobacteria и Eubacteria, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры используемых бактерий включают *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), Enterobacteria, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются грамотрицательные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения в качестве хозяев по изобретению используют клетки *E. coli*. Примеры штаммов *E. coli* включают штамм W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) и его производные, включая штамм 33D3? имеющий генотип W3110 AfluA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R (патент США № 5639635). Также подходят другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области и описаны, например, Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). Обычно необходимо выбрать соответствующие бактерии, принимая во внимание воспроизводимость реплика в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia*, или *Salmonella* могут быть подходящим образом использованы в качестве хозяина, когда для

доставки репликона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177, или pKN410.

[0189] Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в клеточную культуру желательно включать дополнительные ингибиторы протеазы.

с) Продукция белка

[0190] Клетки-хозяева подвергают трансформации или трансфекции указанными выше векторами экспрессии и культивируют в стандартных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желательные последовательности. Трансформация означает встраивание ДНК в прокариотический организм-хозяин, так что указанная ДНК становится реплицируемой либо в виде экстра-хромосомального элемента, либо в интегрированном с хромосомой состоянии. В зависимости от типа используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют с использованием тех стандартных методик, которые подходят для таких клеток. Метод кальциевой обработки, в котором используется хлорид кальция, в основном применим для бактериальных клеток, которые содержат трудные для преодоления барьеры в виде клеточных стенок. Другой метод трансформации включает использование полиэтиленгликоля/ДМСО. Еще одним методом является электропорация.

[0191] Прокариотические клетки, используемые для получения белковых конструкций согласно настоящему изобретению растут в средах, известных специалистам в данной области, которые подходят для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают бульон Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления изобретения среда также содержит селективируемый агент, выбранный с учетом конструкции вектора экспрессии, позволяющий добиться селективного роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, добавляют ампициллин к средам для роста клеток, экспрессирующих ампициллин-резистентный ген.

[0192] Могут быть также включены любые необходимые добавки, в дополнение к источникам углерода, азота и неорганического фосфата, в соответствующих концентрациях, которые вводятся либо поодиночке, либо в смеси с другими компонентами или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или несколько восстановителей, выбранных из группы, включающей глутатион, цистеин, цистамин, тиогликолят, дитиоэритритол и дитиотрейтол. Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. Для роста *E. coli*, например, предпочтительные диапазоны температур составляют от около 20°C до около 39°C, более предпочтительно, от около 25°C до около 37°C, еще более предпочтительно, около 30°C. Среда может иметь любой pH, варьирующий от около 5 до около 9, главным образом, в зависимости от используемого организма-

хозяина. В случае *E. coli* рН, предпочтительно, составляет от около 6,8 до около 7,4 и более предпочтительно, около 7,0.

[0193] Если в векторе экспрессии по настоящей заявке используется индуцибельный промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящей заявки для контроля транскрипции полипептидов используют промоторы PhoA. Соответственно, трансформированные клетки культивируются в среде с ограниченным количеством фосфата, для индукции. Предпочтительно, среда с ограниченным количеством фосфата представляет собой среду С.Р.А.Р (см., например, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Способы* (2002), 263:133-147). Может использоваться множество других индукторов, определяемых используемой конструкцией вектора, которые известны в данной области.

[0194] Экспрессированные белковые конструкции по настоящей заявке секретируются и восстанавливаются из периплазмы клеток-хозяев. Процесс восстановления белка в типичном случае вовлекает разрушение микроорганизма с использованием, в основном, таких способов, как осмотический шок, озвучивание или лизис. После разрушения клеток клеточные осколки или целые клетки могут быть удалены центрифугированием или фильтрованием. Белки могут быть далее очищены, например, с использованием аффинной хроматографии на смоле. Альтернативно, белки могут быть перенесены в культуральную среду и выделены из нее. Клетки могут быть удалены из культуры и культуральный супернатант фильтруют и концентрируют с целью дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть также выделены и идентифицированы с использованием широко известных методов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блот анализ.

[0195] Альтернативно, производство белка в больших количествах осуществляется в процессе ферментации. Для производства рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные процедуры периодической ферментации с подпиткой. Объем крупномасштабной ферментации составляет по меньшей мере 1000 литров, предпочтительно от 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используются лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы (предпочтительный источник углерода/энергии). Ферментация в малых масштабах обычно относится к ферментации в ферментере, который имеет объемную емкость не более приблизительно 100 литров и может варьироваться от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров.

[0196] Во время процесса ферментации индукция экспрессии белка обычно инициируется после того, как клетки выращены в подходящих условиях до желаемой плотности, например, OD₅₅₀ около 180-220, на которой клетки находятся в ранней стационарной фазе. В соответствии с используемой векторной конструкцией можно использовать различные индукторы, известные в данной области и описанные выше. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов до индукции. Клетки

обычно индуцируют в течение примерно 12-50 часов, хотя можно использовать большее или меньшее время индукции.

[0197] Для повышения выхода продукции и качества белковых конструкций по настоящей заявке различные условия ферментации можно модифицировать. Например, чтобы улучшить правильную сборку и укладку секретируемых полипептидов, дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD или DsbG) или FkpA (пептидилпролилцис-, транс-изомераза с шаперонной активностью) могут быть использованы для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки-шапероны облегчают правильную укладку и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, патент США № 6083715; Georgiou *et al.*, патент США № 6027888; Bothmann и Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm и Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

[0198] Для сведения к минимуму протеолиза экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются протеолитически чувствительными) в настоящем изобретении можно использовать определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для осуществления генетической мутации (мутаций) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые дефицитные по протеазе штаммы *E. coli* доступны и описаны, например, Joly *et al.* (1998), см. выше; Georgiou *et al.*, патент США № 5264365; Georgiou *et al.*, патент США № 5508192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[0199] Штаммы *E. coli* с дефицитом протеолитических ферментов и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или более белков-шаперонов, могут быть использованы в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии, кодирующей белковые конструкции по настоящей заявке.

d) Очистка белков

[0200] Белковые конструкции, полученные как описано в настоящем документе, далее очищают с целью получения препаратов, по существу гомогенных для целей дальнейшего тестирования и использования. Стандартные методы очистки белка известны в данной области и могут использоваться соответствующим образом. Приведенные ниже способы являются лишь примерами подходящих способов очистки: фракционирование на иммуноаффинных колонках или на ионообменных колонках, метод осаждения этанолом, метод ВЭЖХ с обращением фазы, хроматография на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как DEAE; хроматофокусирование; SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель фильтрация с использованием, например, Сефадекс G-75.

[0201] В некоторых вариантах осуществления изобретения белок А, иммобилизованный на твердой фазе, используют для иммуноаффинной очистки белковых

конструкций, содержащих Fc-область по настоящей заявке. Белок А представляет собой поверхностный белок с молекулярной массой 42 кДа из *Staphylococcus aureus*, который с высокой аффинностью связывается с конструкциями, содержащими Fc, например, полипептидами NGF длительного действия, описанными в настоящем документе. Lindmark *et al* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, предпочтительно представляет собой колонку, содержащую поверхность из стекла или кремнезема, более предпочтительно, стеклянную колонку с контролируемым размером пор или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых случаях колонку покрывают реагентом, например глицерином, в попытке предотвратить неспецифическое прилипание загрязняющих веществ. Затем твердую фазу промывают для удаления загрязняющих веществ, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, интересные белковые конструкции выделяют из твердой фазы путем элюирования.

2. Рекомбинантное получение в эукариотических клетках

[0202] В случае эукариотической экспрессии компоненты вектора обычно включают, но этим не ограничиваются, один или несколько из следующих элементов: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов и энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

а) Компонент сигнальная последовательность

[0203] Вектор для применения в эукариотическом хозяине может также содержать вставку, которая кодирует сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность, предпочтительно, является такой, которая распознается и процессируется (то есть расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей белковые конструкции по настоящей заявке.

б) Точка начала репликации

[0204] Обычно точка начала репликации не требуется для вектора экспрессии у млекопитающих (начало SV40 обычно можно использовать только потому, что оно содержит ранний промотор).

с) Компонент ген селекции

[0205] Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген селекции, также называемый селективируемым маркером. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, к ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) восполняют дефицит ауксотрофов или (с) поставляют важные питательные вещества, недоступные из сложных сред, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

[0206] В одном примере схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются

гетерологичным геном, продуцируют белок, резистентность к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в режиме селекции. Примерами такой доминантной селекции являются препараты неомидин, микофеноловая кислота и гиромидин.

[0207] Другим примером подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются такие, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать нуклеиновую кислоту, кодирующую белковые конструкции по настоящей заявке, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, предпочтительно, гены металлотионеина приматов, аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т. д.

[0208] Например, клетки, трансформированные геном селекции DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является клеточная линия яичника китайского хомячка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

[0209] Альтернативно, клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, содержащие эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими полипептид, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH) можно отбирать путем роста клеток в среде, содержащей агент для селекции селективируемого маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомидин или G418. См. патент США № 4965199.

d) Компонент промотор

[0210] Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей желаемые полипептидные последовательности. Практически все эукариотические гены имеют богатую АТ область, расположенную приблизительно на 25-30 нуклеотидов выше сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, обнаруживаемая на 70-80 оснований выше старта транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариот находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности могут быть вставлены в эукариотические векторы экспрессии. См. также раздел «III. Векторы, кодирующие полипептиды NGF длительного действия» выше.

[0211] Транскрипция полипептидов с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих регулируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и, наиболее предпочтительно, вирус 40 обезьян (SV40), гетерологичными промоторами млекопитающих, например, промотором актина или промотором иммуноглобулина, промоторами теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

[0212] Ранний и поздний промоторы вируса SV40 легко получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Немедленный ранний промотор цитомегаловируса человека легко получают в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в хозяевах-млекопитающих с использованием вируса бычьей папиллом в качестве вектора описана в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК человеческого интерферона в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный терминальный повтор вируса саркомы Рауса.

е) Компонент энхансерный элемент

[0213] Транскрипцию ДНК, кодирующую белковые конструкции по настоящей заявке, высшими эукариотами часто увеличивают путем встраивания энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известно много энхансерных последовательностей генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротейна и инсулина). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40, расположенный после точки начала репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы, расположенный после точки начала репликации, и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) в отношении энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей полипептид, но, предпочтительно, расположен в сайте с 5'-стороны от промотора.

ф) Компонент терминация транскрипции

[0214] Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, человек или нуклеированные клетки из других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей полипептид. Одним из используемых компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и описанный там вектор экспрессии.

г) Селекция и трансформация клеток-хозяев

[0215] Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в настоящем документе, включают клетки высших эукариот, описанные в настоящем документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки

обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); фибробластоподобные клеточные линии COS, полученные из ткани почки обезьяны; линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячков (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/–DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы-буйвола (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TR1 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия гепатомы человека (Hep G2).

[0216] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для получения белковых конструкций и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев

[0217] Клетки-хозяева, используемые для получения белковых конструкций по настоящей заявке, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хама F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma) подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патенты США №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или U.S. Pat. Re. 30985, может быть использована в качестве питательной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред при необходимости может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфата), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как препарат GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и тому подобное, являются условиями, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для обычного специалиста в данной области.

i) Очистка белков

[0218] При использовании рекомбинантных методов белковые конструкции по настоящему изобретению могут быть получены внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретированы в среду. Если белковая конструкция производится внутриклеточно, то в качестве первой стадии частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты удаляют, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описывают процедуру выделения антител, которые секретированы в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту оттаивают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенолметилсульфонилфторида (PMSF в течение около 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Когда белковая конструкция секретирована в среду, надосадочные жидкости из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием имеющегося в продаже фильтра для концентрирования белка, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен на любой из вышеперечисленных стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста посторонних примесей.

[0219] Белковую композицию, приготовленную из клеток, можно очистить, используя, например, хроматографию на гидроксилатапите, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию, при этом аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, который присутствует в Fc-содержащей белковой конструкции. Белок А можно использовать для очистки Fc-содержащих белков на основе иммуноглобулинов человека, содержащих 1, 2 или 4 тяжелые цепи (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изоформ мыши и для человека 3 (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матрица, с которой связывают аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стирол-дивинил)бензол, обеспечивают более высокую скорость потока и более короткое время обработки, чем при использовании агарозы. Когда белковая конструкция содержит домен C_{H3}, для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Также доступны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (такая как на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от конструкции белка, которую необходимо восстановить.

[0220] После любой предварительной(ых) стадии(й) очистки смесь, включающая представляющие интерес белковые конструкции и примеси, может быть подвергнута хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком pH с использованием буфера

для элюирования при рН примерно 2,5-4,5, предпочтительно, проводимой при низких концентрациях соли (например, от около 0 до 0,25М соли).

V. Фармацевтические композиции

[0221] Кроме того, предложены фармацевтические композиции, содержащие любой из полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, и необязательно, фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид NGF длительного действия, содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4, и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4, и необязательно, фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции могут быть получены путем смешивания полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных составов или водных растворов.

[0222] Восстановленный состав может быть приготовлен путем растворения лиофилизированного полипептида NGF длительного действия в разбавителе таким образом, чтобы белок был диспергирован повсюду. Примеры фармацевтически приемлемых (безопасных и нетоксичных для введения человеку) разбавителей, пригодных для использования в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), рН-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы или водные растворы солей и/или буферы.

[0223] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит гомогенную популяцию полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе. Гомогенная популяция означает, что полипептиды NGF длительного действия абсолютно идентичны друг другу, например, имеют одинаковую конфигурацию полипептида NGF длительного действия, одинаковую группу NGF, один и тот же линкер, если таковой имеется, и один и тот же фрагмент Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере около 70% (например, по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) полипептидов NGF длительного действия в фармацевтической композиции являются гомогенными.

[0224] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция состоит по существу из (например, состоит из) полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемого носителя. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция не содержит слитых белков proNGF-Fc или preproNGF-Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит не более чем около 5% (например, не более чем около 4%, 3%, 2% или 1%)

слитого белка proNGF-Fc или preproNGF-Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция не содержит белка клетки-хозяина (например, CHO).

[0225] Фармацевтическая композиция, предпочтительно, должна быть стабильной, в которой содержащиеся в ней белки по существу сохраняют свою физическую и химическую стабильность и целостность при хранении. Различные аналитические методики для измерения стабильности белка доступны в данной области и описаны в работах *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Для быстрого скрининга состав можно хранить при температуре 40°C от 2 недель до 1 месяца, после чего измеряют временную стабильность. Если состав должен храниться при температуре 2-8°C, обычно состав должен быть стабилен при температуре 30°C или 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца и/или стабилен при температуре 2-8°C в течение по меньшей мере 2 лет. Если состав должен храниться при температуре 30°C, обычно состав должен быть стабилен в течение по меньшей мере 2 лет при температуре 30°C и/или стабилен при температуре 40°C в течение по меньшей мере 6 месяцев. Например, степень агрегации при хранении можно использовать как индикатор стабильности белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения стабильный состав полипептидов NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, может содержать менее около 10% (предпочтительно, менее около 5%) полипептида NGF длительного действия, присутствующего в составе в виде агрегата.

[0226] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция имеет срок годности по меньшей мере около 15 дней, например, по меньшей мере около 20 дней, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 3 года или дольше, например, при температуре около 2-25°C, например около 2-8°C. Как используется в настоящем документе, термин «срок годности» означает период хранения, в течение которого активный ингредиент, такой как терапевтический белок (например, описанные в настоящем документе полипептиды NGF длительного действия) в фармацевтическом составе подвергается минимальной деградации (например, не более около 5% деградации, например не более около 4%, 3% или 2% деградации), когда фармацевтический состав хранится в определенных условиях хранения, например, при температуре 2-8°C. Примеры способов оценки стабильности белка или состава включают эксклюзионную хроматографию (ЭХ)-ВЭЖХ для обнаружения, например, агрегации, обращенно-фазовую (ОФ)-ВЭЖХ для обнаружения, например, фрагментации белка, ионообменную ВЭЖХ для обнаружения, например, изменений заряда белка, масс-спектрометрию, флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию кругового дихроизма (CD), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FT-IR) и рамановскую спектроскопию для обнаружения конформационных изменений белка. Все эти методики можно использовать по отдельности или в комбинации для оценки деградации белка в фармацевтическом составе и определения

срока годности этого состава. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы по настоящему изобретению демонстрируют деградацию (например, фрагментацию, агрегацию или разворачивание) не более чем на около 5% (например, не более чем на около 4%, 3%, 2% или 1%) в течение по меньшей мере примерно 15 дней (например, по меньшей мере примерно 20 дней, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет или дольше) при хранении примерно при температуре 2-8°C.

[0227] Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, изотонические вещества (например, хлорид натрия), стабилизаторы, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); хелатирующие агенты, такие как EDTA и/или неионогенные поверхностно-активные вещества.

[0228] Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярный (менее примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

[0229] Буферы используются для регулирования pH в диапазоне, оптимизирующем терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от pH. Буферы, предпочтительно, присутствуют в диапазоне концентраций от примерно 50 мМ до примерно 250 мМ. Подходящие буферные агенты для использования в настоящей заявке включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли. Например, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, fumarat, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Кроме того, буферы могут содержать соли гистидина и триметиламина, такие как Трис.

[0230] Консерванты добавляют для замедления роста микробов и обычно присутствуют в диапазоне от 0,2% до 1,0% (масса/объем). Добавление консерванта может, например, облегчить получение многоразового (многодозового) препарата. Подходящие консерванты для использования в настоящей заявке включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; галогениды бензалкония

(например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

[0231] Агенты, повышающие тоничность, иногда называемые «стабилизаторами», присутствуют для регулирования или поддержания тонуса жидкости в композиции. При использовании с большими заряженными биомолекулами, такими как белки, их часто называют «стабилизаторами», поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий. Агенты, повышающие тоничность, могут присутствовать в любом количестве от 0,1% до 25% по массе, предпочтительно от 1% до 5%, принимая во внимание относительные количества других ингредиентов. Предпочтительные агенты, повышающие тоничность, включают многоатомные сахароспирты, предпочтительно, трехатомные или более высокие сахароспирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

[0232] Дополнительные эксципиенты включают агенты, которые могут служить одним или несколькими из следующего: (1) наполнители, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) агенты, предотвращающие денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие эксципиенты включают: многоатомные сахарные спирты (перечислены выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миониситоза, мионизитол, галактоза, галактит, глицерин, циклиты (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза); дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза); трисахариды, такие как раффиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

[0233] Неионогенные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие агенты») присутствуют для содействия солюбилизации белков, а также для защиты белков от агрегации, вызванной перемешиванием, что также позволяет препарату подвергаться поверхностному напряжению сдвига, не вызывая денатурации активных белков. Неионогенные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от около 0,05 мг/мл до около 1,0 мг/мл, предпочтительно, от около 0,07 мг/мл до около 0,2 мг/мл.

[0234] Подходящие неионогенные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т. д.), полиоксамеры (184, 188 и т. д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20), TWEEN®-

80 и др.), лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлоза и карбоксиметилцеллюлоза. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

[0235] Для того чтобы фармацевтические композиции можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Фармацевтическую композицию можно сделать стерильной путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное отверстие для доступа, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

[0236] Могут быть приготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антагонист, причем матрицы имеют форму формованных изделий, например пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамат, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

[0237] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать более одного активного соединения, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно вещества с взаимодополняющей активностью, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели.

[0238] Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметацилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (для например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты в 18-м издании *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

[0239] В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержится в одноразовом флаконе, таком как одноразовый запечатанный флакон. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая

композиция содержится во флаконе многоразового использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержится нерасфасованной в контейнере. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция подвергается криоконсервации.

VI. Способы лечения заболеваний

[0240] Полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе, и их композиции (например, фармацевтические композиции) могут быть полезны для различных применений, таких как диагностика, молекулярные анализы и терапия. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ лечения заболевания (например, заболевания, связанного с NGF, такого как неврологическое заболевание) у индивидуума (например, человека), включающий введение индивидууму эффективного количества полипептида NGF длительного действия, описанного в настоящем документе, или его фармацевтической композиции. Термин «заболевание, связанное с NGF», используемый в настоящем документе, относится к заболеванию или расстройству, вызванному или связанному с нарушением передачи сигналов рецептора NGF (например, из-за недостаточного количества NGF и/или сниженной аффинности связывания), или заболеванию или расстройству, для лечения которого требуется биоактивность NGF (например, травма/повреждение, требующее роста, поддержания, пролиферации и/или выживания нейронов для лечения). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия (или его фармацевтическую композицию) вводят внутривенно, внутримышечно, или подкожно.

[0241] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ лечения заболевания (например, заболевания, связанного с NGF, такого как неврологическое заболевание (например, диабетическая невропатия, болезнь Альцгеймера или нейротрофический кератит) или не неврологического заболевания (например, преждевременная недостаточность яичников или нарушение сперматогенеза)) у индивидуума (например, человека), включающий введение индивидууму эффективного количества полипептида NGF длительного действия (или его фармацевтической композиции), содержащего от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит (или состоит по существу из, или состоит из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-4 (например, любой из SEQ ID NO: 1-3), и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ лечения заболевания (например, заболевания, связанного с NGF, такого как неврологическое заболевание (например, диабетическая невропатия, болезнь Альцгеймера, или нейротрофический кератит) или не неврологического заболевания (например, преждевременная недостаточность яичников или нарушение сперматогенеза)) у индивидуума (например, человека), включающий введение индивидууму эффективного количества полипептида NGF длительного действия (или его фармацевтической композиции), содержащего (или состоящего по существу из, или состоящего из) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 61-67. В

некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия (или его фармацевтическую композицию) вводят внутривенно, внутримышечно или подкожно.

[0242] Способы, описанные в настоящем документе, подходят для лечения как неврологических, так и не неврологических заболеваний.

[0243] Неврологические заболевания включают заболевания нервной системы. Заболевание нервной системы относится к заболеванию, связанному с дегенерацией нейронов или повреждением центральной и/или периферической нервной системы. Конкретные примеры заболеваний нервной системы включают, но этим не ограничиваются, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, инсульт, боковой амиотрофический склероз (БАС), неврит лицевого нерва, черепно-мозговая или спинномозговая травма, острое цереброваскулярное заболевание, атрофия головного мозга, периферическая невропатия и другие заболевания, характеризующиеся некрозом или потерей нейрона, независимо от центрального нейрона, периферического нейрона или мотонейрона, кроме повреждения нерва, вызванного травмой, ожогом, почечной недостаточностью, травмой или химическими веществами/лекарственными средствами, например острое цереброваскулярное поражение центрального нерва, вызванное химическими веществами или лекарственными средствами. Заболевания нервной системы также включают периферическую невропатию, связанную с определенными состояниями, такими как невропатия, связанная с диабетом, СПИДом или химиотерапией. В некоторых вариантах осуществления изобретения неврологическое заболевание выбрано из группы, включающей мультиинфарктную деменцию, сосудистую деменцию, когнитивные нарушения вследствие органического заболевания головного мозга вследствие алкоголизма, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсию, рассеянный склероз, хорею Хантингтона, синдром Дауна, нервную глухоту, болезнь Меньера, инсульт, ALS, паралич Белла, состояния, сопровождающиеся спинальной мышечной атрофией, состояния, сопровождающиеся параличом, периферические невропатии, повреждение нервной системы в результате травмы, повреждение нервной системы в результате ожогов, повреждение нервной системы в результате дисфункции почек, повреждение нервной системы из-за травмы, повреждение нервной системы из-за токсического воздействия химиотерапии, повреждение нервной системы из-за хирургического вмешательства, повреждение нервной системы из-за ишемии, повреждение нервной системы из-за инфекции, повреждение нервной системы из-за метаболического заболевания и повреждение нервной системы из-за дефицита питания. В некоторых вариантах осуществления изобретения неврологическое заболевание представляет собой периферическую невропатию, выбранную из группы, включающей диабетическую периферическую невропатию, индуцированную токсинами периферическую невропатию, периферическую невропатию, вызванную химиотерапией, ВИЧ-ассоциированную периферическую невропатию и периферическую невропатию, поражающую мотонейроны. В некоторых вариантах осуществления изобретения неврологическое заболевание выбрано

из группы, включающей неонатальную гипоксически-ишемическую энцефалопатию, детский церебральный паралич, миопатию критических состояний, нервную глухоту, рецидивирующее повреждение гортанного нерва, черепно-мозговую травму, повреждение зубного нерва, мозговой инсульт, синдром Дауна, ALS, рассеянный склероз, спинальную мышечную атрофию, диффузное поражение головного мозга, дисплазию тимуса, контузию зрительного нерва, фолликулярную дисплазию, повреждение спинного мозга, глаукому, нейротрофический кератит, повреждение зрительного нерва, оптиконейромиелит, ассоциированные заболевания сетчатки, недержание мочи, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, деменцию, гипертоническое внутримозговое кровоизлияние, неврологическую дисфункцию, заболевание мелких сосудов головного мозга, острый ишемический инсульт, эндотелиальную дистрофию роговицы, диабетическую невропатию, диабетическую язву стопы, нейрогенную язву кожи, пролежни, нейротрофическую язву роговицы, диабетическую язву роговицы и макулярное отверстие.

[0244] Не неврологические заболевания могут включать атрофию селезенки, ушиб селезенки, снижение овариального резерва, преждевременную недостаточность яичников (POF), синдром гиперстимуляции яичников, синдром остаточного яичника, фолликулярную дисплазию яичников, нарушение сперматогенеза (например, олигозооспермию (или олигоспермию), астеноспермию, олигоастеноспермию, азооспермию, тератозооспермию, олигоастенотератозооспермию (синдром ОАТ)), ишемическую язву, стрессовую язву, ревматоидную язву, фиброз печени, язву роговицы, ожоги, язвы полости рта и венозные язвы ног.

[0245] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ лечения заболевания (например, заболевания, связанного с NGF, такого как неврологическое заболевание (например, диабетическая невропатия, болезнь Альцгеймера или нейротрофический кератит) или не неврологического заболевания (например, преждевременная недостаточность яичников или нарушение сперматогенеза)) характеризуется одной или несколькими из следующих биологических активностей: (i) поддержка выживания нейронов; (ii) стимулирование роста нейритов; (iii) усиление нейрохимической дифференцировки; (iv) стимулирование пролиферации β -клеток поджелудочной железы; (v) индуцирование врожденного и/или приобретенного иммунитета; (vi) восстановление поврежденных нервных клеток (например, роговичного нерва роговицы) и/или предотвращение повреждения (например, при нейротрофическом кератите); (vii) стимулирование пролиферации и/или секреции эстрогена клетками фолликулов яичников; (viii) ускорение заживления ран (например, при диабетической невропатии); (ix) улучшение пространственного познания, памяти и/или способности к обучению субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием (например, болезнью Альцгеймера); (x) лечение и/или предотвращение нейродегенерации; (xi) лечение атрофии семенных канальцев яичек, нарушения сперматогенеза семенных канальцев и/или фрагментов клеток эпидидимального протока; (xii) устранение снижения количества сперматозоидов и/или подвижности или увеличение количества сперматозоидов и/или

подвижности (например, при нарушении сперматогенеза); (xiii) предотвращение/реверсирование уменьшения количества и/или функции фолликулов яичников или увеличение количества и/или функции фолликулов яичников (например, при преждевременной недостаточности яичников); и/или (xiv) продление жизни пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ поддержки выживаемости нейронов, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе, может обеспечить по меньшей мере около 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше выживаемости нейронов. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ стимулирования удлинения нейритов, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанный в настоящем документе, может стимулировать удлинение нейритов по меньшей мере примерно в 2 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ усиления нейрохимической дифференцировки, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе, может усиливать нейрохимическую дифференцировку по меньшей мере примерно в 2 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ стимуляции пролиферации β -клеток поджелудочной железы, опосредованной полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе, может стимулировать пролиферацию β -клеток поджелудочной железы по меньшей мере примерно в 2 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ индукции овуляции, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе, может индуцировать овуляцию по меньшей мере примерно в 2 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ индукции врожденного и/или приобретенного иммунитета, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанный в настоящем документе, может индуцировать врожденный и/или приобретенный иммунитет по меньшей мере примерно в 1,1 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ спасения и/или предотвращения повреждения нейронов, опосредованного полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанный в настоящем документе, может спасти и/или предотвратить по меньшей мере около 5% (включая, например, по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше) повреждений нейронов, или иметь спасательную и/или профилактическую эффективность по меньшей мере примерно в 1,1 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6,

1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ стимуляции пролиферации и/или секреции эстрогена клетками фолликула яичника, опосредованной полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может стимулировать пролиферацию и/или секрецию эстрогенов фолликулярными клетками яичников по меньшей мере примерно в 1,1 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ стимуляции заживления ран, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанный в настоящем документе, может способствовать заживлению ран по меньшей мере примерно в 1,1 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ улучшения пространственного мышления, памяти и/или способности к обучению у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием (например, болезнью Альцгеймера), опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может улучшить пространственное познание, память и/или способность к обучению по меньшей мере примерно в 1,1 раза (включая, например, по меньшей мере примерно в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 раз или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ лечения и/или предотвращения нейродегенерации, опосредованной полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе, может спасти и/или предотвратить нейродегенерацию по меньшей мере на около 5% (включая, например, по меньшей мере примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ лечения атрофии семенных канальцев яичка, атрофии семенных канальцев семенника, нарушения сперматогенеза семенных канальцев и/или фрагментов клеток придатка яичка, опосредованных полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может вылечить по меньшей мере около 5% (включая, например, по меньшей мере примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше) атрофии семенных канальцев яичка, атрофии семенных канальцев семенника, нарушения сперматогенеза семенных канальцев и/или фрагментов клеток придатка яичка. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ восстановления снижения количества и/или подвижности сперматозоидов, опосредованного полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может восстановить по меньшей мере около на 5% (включая, например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше) снижение количества сперматозоидов и/или их подвижности. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ увеличения количества и/или подвижности сперматозоидов,

опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может увеличить по меньшей мере на около 5% (включая, например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% или больше) количество и/или подвижность сперматозоидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ восстановления уменьшения числа и/или функции фолликулов яичников, опосредованного полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может восстановить по меньшей мере на около 5% (включая, например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше) уменьшение количества и/или функции фолликулов яичников. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ увеличения количества и/или функции фолликулов яичников, опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может увеличить по меньшей мере на около 5% (включая, например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% или больше) количество и/или функции фолликулов яичников. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ продления жизни индивидуума (например, человека), опосредованный полипептидом NGF длительного действия или фармацевтической композицией, описанными в настоящем документе, может увеличить выживаемость индивидуума по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24 месяца или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 лет и более.

[0246] Введение полипептидов NGF длительного действия, описанных в настоящем документе, или их фармацевтических композиций можно осуществлять любым удобным способом, включая инъекцию или переливание. Путь введения соответствует известным и общепринятым способам, таким как однократный или многократный болюс или инфузия в течение длительного периода времени подходящим образом. Полипептиды NGF длительного действия или их фармацевтические композиции можно вводить пациенту перорально, подкожно, внутривенно, интрацеребрально, интраназально, чрескожно, внутрибрюшинно, внутримышечно, внутрилегочно, вагинально, ректально, внутриглазно, местно, трансартериально, внутривожно, интранодально, внутривагинально или интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, интрацеребрально, интраспинально, интратекально, внутриочагово или интраокулярно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят системно. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят индивидууму путем инфузии, такой как внутривенная инфузия. Методы инфузии для иммунотерапии известны в данной области (см., например, Rosenberg *et al.*, *New Eng. J. of Med.* 319: 1676 (1988)). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят индивидууму посредством внутривожной или подкожной (то есть

подкожной) инъекции. Для подкожных инъекций полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию можно вводить с помощью шприца. Однако доступны другие устройства для введения полипептида NGF длительного действия или его фармацевтической композиции, такие как устройства для инъекций; инъекторные ручки; автоинъекционные устройства, безыгольные устройства; и системы доставки подкожных пластырей. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят внутривенной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят непосредственно в головной мозг или позвоночник. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят местно в место повреждения или травмы, например, непосредственно в ткань раны. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят под замедленным высвобождением или пролонгированным высвобождением.

[0247] Дозировки и желаемая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться в зависимости от предполагаемого конкретного применения. Определение подходящей дозировки или пути введения находится в компетенции обычного специалиста. Эксперименты на животных обеспечивают надежное руководство для определения эффективных доз для терапии человека. Межвидовое масштабирование эффективных доз может быть выполнено в соответствии с принципами, изложенным Mordenti, J. and Chappell, W. «The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics», In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46.

[0248] При введении *in vivo* полипептида NGF длительного действия или его фармацевтической композиции нормальные дозы могут варьироваться от примерно 0,01 мкг/кг до примерно 10 мг/кг массы тела млекопитающего в зависимости от пути введения и вида млекопитающего. В объем настоящей заявки входит то, что разные составы будут эффективны для разных видов лечения и разных расстройств, и что введение, предназначенное для лечения конкретного органа или ткани, может потребовать доставки способом, отличным от такового в другой орган или ткань. Более того, дозы можно вводить одним или несколькими отдельными введениями или путем непрерывной инфузии. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и другие режимы дозирования. Ход этой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и анализов. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят в количестве от около 0,01 мкг/кг до около 10 мг/кг, например, от около 0,01 мкг/кг до около 1 мкг/кг, от около 1 мкг/кг до около 100 мкг/кг, от около 100 мкг/кг до около 500 мкг/кг, от около 500 мкг/кг до около 1 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг

или от около 0,01 мкг/кг до около 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят в дозе от около 0,01 мкг до около 1000 мкг на индивидуума (например, человека), например, от около 0,01 мкг до около 1 мкг, от около 1 мкг до около 500 мкг, от около 500 мкг до около 1000 мкг, от около 1 мкг до около 300 мкг или от около 100 мкг до около 1000 мкг на индивидуума.

[0249] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят однократно (например, болюсной инъекцией). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят многократно (например, 2, 3, 4, 5, 6 или больше раз). При многократном введении они могут осуществляться одним и тем же или разными путями и могут иметь место в одном и том же месте или в альтернативных местах. Полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию можно вводить от ежедневного до одного раза в год. Интервал между введениями может составлять от 24 часов до года. Интервалы также могут быть нерегулярными (например, после прогрессирования опухоли). В некоторых вариантах осуществления изобретения график дозирования не прерывается. Специалист в области медицины может легко определить оптимальную дозировку и режим лечения для конкретного пациента, наблюдая за пациентом на наличие признаков заболевания и соответствующим образом корректируя лечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, или его фармацевтическую композицию вводят один раз в день (ежедневно), один раз в 2 дня, один раз в 3 дня, один раз в 4 дня, один раз в 5 дней, один раз в 6 дней, один раз в неделю, один раз в 10 дней, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели, один раз каждые 4 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев, один раз в 7 месяцев, один раз в 8 месяцев, один раз в 9 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят один раз каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят один раз каждую неделю. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическая композиция закапывается один раз в день. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию закапывают три раза в день. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию закапывают пять раз в день.

[0250] В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид NGF длительного действия или его фармацевтическую композицию вводят отдельными дозами, такими как примерно 2, 3, 4, 5 или более доз. В некоторых вариантах осуществления изобретения отдельные дозы вводят в течение примерно недели, месяца, 2 месяцев, 3 месяцев или дольше. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза делится поровну. В некоторых вариантах осуществления изобретения отдельные дозы составляют около 20%, около 30% и около 50% от общей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения интервал между последовательными отдельными дозами составляет примерно 1 день, 2 дня, 3 дня, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, месяц, 3 месяца, 6 месяцев или дольше. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и другие режимы дозирования. Ход этой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и анализов.

VII. Промышленные изделия и наборы

[0251] Кроме того, предложены наборы, стандартные дозировки и изделия, содержащие полипептиды NGF длительного действия, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен набор, который содержит фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, и, предпочтительно, содержит инструкции по его применению, например, для применения при лечении расстройств, описанных в настоящем документе (например, неврологического заболевания).

[0252] Наборы по настоящему изобретению включают один или несколько контейнеров, содержащих полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе, например, для лечения заболевания. Например, инструкции содержат описание введения полипептида NGF длительного действия для лечения заболевания, такого как неврологическое заболевание. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума (например, человека), подходящего для лечения, на основе определения наличия у этого индивидуума заболевания и стадии заболевания. Инструкции, относящиеся к применению полипептида NGF длительного действия, обычно включают информацию о дозировке, графике дозирования и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или частичные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в комплект), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом диске) также являются приемлемыми. Наборы по настоящей заявке находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается ими, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Также рассматриваются упаковки для использования в сочетании с конкретным устройством, таким как инфузионное устройство, такое как мининасос. Набор

может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой полипептид NGF длительного действия, описанный в настоящем документе. Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент. Наборы могут необязательно содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующая информация. Обычно набор включает контейнер и этикетку или лист-вкладыш (вкладыши) на контейнере или связанный с ним.

[0253] Таким образом, настоящая заявка относится также к промышленным изделиям, которые включают флаконы (такие как запечатанные флаконы), бутылки, банки, гибкую упаковку и тому подобное. Промышленное изделие может содержать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку контейнера или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Как правило, контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения заболевания или расстройства (такого как неврологическое заболевание), описанного в настоящем документе, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). На этикетке или листке-вкладыше указано, что композиция используется для лечения конкретного состояния у индивидуума. Этикетка или вкладыш в упаковку дополнительно содержат инструкции по введению композиции индивидууму. На этикетке могут быть указаны инструкции по восстановлению и/или использованию. Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, может быть многоразовым флаконом, что позволяет многократно вводить (например, от 2 до 6 введений) восстановленного состава. На этикетке или листке-вкладыше указано, что композиция используется для лечения конкретного состояния у индивидуума. Этикетка или вкладыш в упаковку дополнительно содержат инструкции по введению композиции индивидууму. На этикетке могут быть указаны инструкции по восстановлению и/или использованию. Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, может быть многоразовым флаконом, что позволяет многократно вводить (например, от 2 до 6 введений) восстановленного состава. Кроме того, он может включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

[0254] Наборы или изделия производства могут включать несколько стандартных доз фармацевтической композиции и инструкции по применению, расфасованные в количествах, достаточных для хранения и использования в аптеках, например, больничных аптеках и рецептурных аптеках.

ПРИМЕРЫ

[0255] Приведенные ниже примеры предназначены только для иллюстрации изобретения и поэтому не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение

каким-либо образом. Следующие примеры и подробное описание предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Пример 1: Получение полипептидов NGF

Конструкция плазмиды

[0256] Примером конструкции плазмиды служит слитый белок preproNGF-Fc 2-118-L3Fc10-M1-5 (SEQ ID NO: 34). Аналогичные способы использовали для других слитых белков preproNGF-Fc и контрольного prepro-mNGF118 (SEQ ID NO: 47), который представляет собой preproNGF с мутацией F12E и двумя С-концевыми аминокислотами (Arg-Ala), укороченными в части β -NGF. Конструкции FD-G4Fc (см. CN105273087A) и WM-G24Fc (см. CN106008722A) служили в качестве контролей. NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1), NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1), 2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1), и NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4) были конструкциями, описанными в WO2017157325. Конфигурации различных полипептидов см. в таблице 1 конфигураций различных полипептидов NGF и выравнивание фрагментов Fc см. на ФИГ. 1A-1F.

Таблица 1. Конфигурации полипептидов NGF

Конструкция	Зрелый фрагмент β -NGF	Линкер	Фрагмент Fc
mNGF118 (prepro SEQ ID NO: 47) (зрелый SEQ ID NO: 1)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	/	/
FD-G4Fc (prepro SEQ ID NO: 22) (зрелый SEQ ID NO: 55)	β -NGF дикого типа 118aa (SEQ ID NO: 3)	GSGGGSGGGGSGGGGSGG GGG (SEQ ID NO: 71)	модифицированный Fc IgG4 -FD (SEQ ID NO: 19)
WM-G24Fc (prepro SEQ ID NO: 24) (зрелый SEQ ID NO: 56)	β -NGF дикого типа 118aa (SEQ ID NO: 3)	KTGGGSGGGG (SEQ ID NO: 72)	модифицированный IgG2/4 Fc (SEQ ID NO: 20)
NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1) (prepro SEQ ID NO: 26) (зрелый SEQ ID NO: 57)	β -NGF дикого типа 120aa (SEQ ID NO: 4)	/	IgG1 M7 (SEQ ID NO: 15)
NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1) (prepro SEQ ID NO: 28) (зрелый SEQ ID NO: 58)	β -NGF дикого типа 120aa (SEQ ID NO: 4)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 16)
2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1) (prepro SEQ ID NO: 30) (зрелый SEQ ID NO: 59)	мутантный β -NGF <u>120aa</u> (SEQ ID NO: 2)	/	IgG1 M7 (SEQ ID NO: 15)

NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4) (prepro SEQ ID NO: 32) (зрелый SEQ ID NO: 60)	β -NGF дикого типа 120aa (SEQ ID NO: 4)	/	модифицированный Fc IgG4 (SEQ ID NO: 18)
2-118-L3Fc10-M1-5 (prepro SEQ ID NO: 34) (зрелый SEQ ID NO: 61)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M1-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 10)
2-118-L3Fc10-M3-5 (prepro SEQ ID NO: 36) (зрелый SEQ ID NO: 62)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 12)
NGF-118-L3Fc10-M3-5 (prepro SEQ ID NO: 38) (зрелый SEQ ID NO: 63)	β -NGF дикого типа 118aa (SEQ ID NO: 3)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 12)
2-L3Fc10-M3-5 (prepro SEQ ID NO: 40) (зрелый SEQ ID NO: 64)	мутантный β -NGF <u>120aa</u> (SEQ ID NO: 2)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 12)
2-118-L3Fc10-M5-5 (prepro SEQ ID NO: 42) (зрелый SEQ ID NO: 65)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M5-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 14)
2-118-L3Fc10M7-5 (prepro SEQ ID NO: 44) (зрелый SEQ ID NO: 66)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 16)
2-118-L3G4-BM	мутантный β -NGF 118aa	GGGGGGSGGGGSGGGGSA	модифицированный Fc IgG4

(prepro SEQ ID NO: 46) (зрелый SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1)	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 18)
--	----------------	-----------------	-----------------

[0257] Нуклеиновые кислоты, кодирующие различные слитые белки p_{repro}NGF-Fc (например, «2-118-L3Fc10-M1-5») или контрольный p_{repro}-mNGF118 были синтезированы и клонированы в векторы pSC-T (например, «pSC-2-118-L3Fc10-M1-5») (от компании у Shanghai Jierui Bio-Engineering Co., Ltd. Beijing Branch). Праймеры PCR, содержащие сайты рестрикции HindIII и XhoI, соответственно, использовали для амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих различные слитые белки p_{repro}NGF-Fc или контрольный p_{repro}-mNGF118, затем продукты PCR субклонировали в собственный эукариотический вектор экспрессии pTT5 (например, «pTT5-2-118-L3Fc10-M1-5»).

Экспрессия рекомбинантного белка

[0258] Клетки 293F, трансфицированные эукариотическими векторами экспрессии pTT5, несущими нуклеиновые кислоты, кодирующие различные слитые белки p_{repro}NGF-Fc (например, pTT5-2-118-L3Fc10-M1-5) или контрольный p_{repro}-mNGF118, культивировали при 37°C, 8% CO₂, 120 об/мин в течение 5 дней. Супернатант, который содержал экспрессированные белки, собирали.

Очистка рекомбинантного белка

[0258] Экспрессированные слитые белки NGF-Fc сначала грубо очищали с помощью аффинной очистки белка А, затем использовали колонку HiTrap™ Butyl HP (GE Healthcare) для дальнейшего отделения их от белка-хозяина на основе различных гидрофобных свойств. Затем остаточные агрегаты удаляли с помощью колонки для гель-фильтрации Superdex 200 (GE Life Sciences) с получением очищенных зрелых слитых белков NGF-Fc. Зрелый контроль mNGF118 сначала очищали на колонке HiTrap™ Butyl HP (GE Healthcare), затем на колонке для гель-фильтрации Superdex 200 (GE Life Sciences). Чистоту этих белков, которая превышала 90%, подтверждали с помощью SDS-PAGE.

Пример 2: Исследования термостабильности зрелых слитых белков NGF-Fc

[0260] Чтобы рассчитать температуру плавления (T_m) и температуру начала агрегации (Tagg) образцов, соответственно, при определении изменений поглощения флуоресценции и светорассеяния при 266 нм/473 нм в процессе нагревания образца использовали анализатор флуоресцентного белка Uncle (Unchained Labs). Начальная температура была установлена на 20°C, конечная температура была установлена на 95°C, скорость нагрева составляла 0,3°C/мин. Измерения для каждого образца повторяли 3 раза. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Средняя температура плавления (T_m) и температура начала агрегации (T_{agg}) зрелых слитых белков NGF-Fc

Конструкция (зрелый NGF-Fc)	Зрелый фрагмент β -NGF	Линкер	Фрагмент Fc	T_m	T_{agg}
FD-G4Fc (зрелый SEQ ID NO: 55)	β -NGF дикого типа 118aa (SEQ ID NO: 3)	GSGGGSGGGGSGGGGSGG GGG (SEQ ID NO: 71)	модифицированный Fc IgG4 -FD (SEQ ID NO: 19)	62,4°C	65°C
WM-G24Fc (зрелый SEQ ID NO: 56)	β -NGF дикого типа 118aa (SEQ ID NO: 3)	KTGGGSGGGG (SEQ ID NO: 72)	модифицированный IgG2/4 Fc (SEQ ID NO: 20)	62°C	63,7°C
NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1) (зрелый SEQ ID NO: 57)	β -NGF дикого типа 120aa (SEQ ID NO: 4)	/	IgG1 M7 (SEQ ID NO: 15)	63,4°C	71,4°C
NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1) (зрелый SEQ ID NO: 58)	β -NGF дикого типа 120aa (SEQ ID NO: 4)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 16)	63,7°C	76,6°C
2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1) (зрелый SEQ ID NO: 59)	мутантный β -NGF <u>120aa</u> (SEQ ID NO: 2)	/	IgG1 M7 (SEQ ID NO: 15)	63,3°C	70°C
NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4) (зрелый SEQ ID NO: 60)	β -NGF дикого типа 120aa (SEQ ID NO: 4)	/	модифицированный Fc IgG4 (SEQ ID NO: 18)	61,3°C	62,5°C
2-118-L3Fc10-M1-5 (зрелый SEQ ID NO: 61)	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M1-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 10)	55,6°C	54,7°C

	(SEQ ID NO: 1)				
2-118-L3Fc10-M3-5 (зрелый SEQ ID NO: 62)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 12)	63,3°C	77°C
NGF-118-L3Fc10-M3-5 (зрелый SEQ ID NO: 63)	β -NGF дикого типа 118aa (SEQ ID NO: 3)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 12)	62,4°C	76,2°C
2-L3Fc10-M3-5 (зрелый SEQ ID NO: 64)	мутантный β -NGF <u>120aa</u> (SEQ ID NO: 2)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 12)	62,7°C	75,6°C
2-118-L3Fc10-M5-5 (зрелый SEQ ID NO: 65)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M5-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 14)	60,4°C	77,9°C
2-118-L3Fc10M7-5 (зрелый SEQ ID NO: 66)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	(G4S) ₃ (SEQ ID NO: 68)	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa) (SEQ ID NO: 16)	64°C	76°C
2-118-L3G4-BM (зрелый SEQ ID NO: 67)	мутантный β -NGF 118aa (SEQ ID NO: 1)	GGGGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 69)	модифицированный Fc IgG4 (SEQ ID NO: 18)	64,7°C	66,5°C

Температура плавления (T_m)

[0261] Как видно из таблицы 2, 2-118-L3G4-BM продемонстрировал самую высокую температуру плавления (T_m), то есть наилучшую термостабильность, среди всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, полученный из (FD-G4Fc, WM-G24Fc, NGF-4-12PAA, и 2-118-L3G4-BM), или даже среди всех протестированных зрелых слитых белков NGF-Fc.

[0262] Из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, полученный из IgG1, 2-118-L3Fc10-M1-5 продемонстрировал более низкую T_m (то есть меньшую термостабильность), в то время как другие продемонстрировали аналогичную T_m.

Температура начала агрегации (Tagg)

[0263] Как видно из таблицы 2, зрелые слитые белки NGF-Fc, содержащие Fc-фрагмент, полученный из IgG1 (за исключением 2-118-L3Fc10-M1-5), демонстрировали более высокие значения Tagg по сравнению со зрелыми слитыми белками NGF-Fc, содержащими фрагмент Fc, происходящий из IgG4. Это указывает на то, что зрелые слитые белки NGF-Fc, содержащие фрагмент Fc, полученный из IgG1, менее склонны к агрегации в процессе нагревания.

[0264] Из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG4, 2-118-L3G4-BM проявляет самые высокие значения Tagg, демонстрируя его превосходную антиагрегационную эффективность в процессе нагревания по сравнению с другими конструкциями слияния Fc, происходящими из IgG4.

[0265] Из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG1, 2-118-L3Fc10-M1-5 демонстрировал самый низкий уровень Tagg (наихудшее антиагрегационное действие в процессе нагревания), NGF-1-15M7 и 2-1-15M7 продемонстрировали относительно низкий уровень Tagg, в то время как остальные слитые конструкции Fc, полученные из IgG1, показали высокие и сходные значения Tagg.

Пример 3: Ускоренное тестирование стабильности зрелых слитых белков NGF-Fc

[0266] Зрелые слитые белки NGF-Fc разбавляли PBS до конечной концентрации 2 мг/мл и инкубировали при температуре 40°C. Образцы отбирали в дни 0 («0h» на фигурах), 3, 7, 9 и 14 в течение инкубационного периода, затем хранили при температуре -80°C. Разложение и агрегацию образцов обнаруживали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) и капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия (CE-SDS).

Способ определения с помощью эксклюзионной хроматографии размеров (SEC)

[0267] SEC разделяет молекулы по разнице в размерах, когда они проходят через смолу, упакованную в колонку. Образцы белка центрифугировали при 10000g в течение 5 минут при 4°C. Осадки ресуспендировали в PBS. Образцы объемом 80-100 мкл переносили в 384-луночный планшет для обнаружения на биоперестраиваемом УФ-детекторе Waters® ACQUITY UPLC® H-класса (TUV) с объемом ввода 20 мкл, длиной волны 280 нм, скоростью потока 0,25 мл/мин и общим временем работы 17 минут. Буфер подвижной фазы

содержал 100 мМ РВ (80 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ NaH_2PO_4), 300 мМ NaCl , 10% ацетонитрила, рН 7,2.

[0268] [0268] Как показано в таблице 3 и на ФИГ. 3А-3D, из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG4, 2-118-L3G4-ВМ и FD-G4Fc проявляли превосходную стабильность по сравнению с WM-G24Fc и NGF-4-12РАА с точки зрения увеличения агрегатов и образования фрагментов. NGF-4-12РАА показал очень очевидную фрагментацию, и процент фрагментации достиг 49,59% (ФИГ. 3А), в то время как процент фрагментации 2-118-L3G4-ВМ и FD-G4Fc был ниже 2,1% во время ускоренного стресса. WM-G24Fc имел не только значительное увеличение агрегатов (процент агрегатов достигал 49,15%), но также явную фрагментацию во время ускоренного стресса (ФИГ. 3С). Процентное содержание мономеров 2-118-L3G4-ВМ и FD-G4Fc превышало 85%, в то время как процентное содержание мономеров WM-G24Fc и NGF-4-12РАА со временем явно уменьшалось. По сравнению с 2-118-L3G4-ВМ, FD-G4Fc демонстрировал большее образование агрегатов и фрагментацию во время ускоренного стресса, что позволяет предположить, что 2-118-L3G4-ВМ обладает лучшей антифрагментационной и антиагрегационной активностью по сравнению с FD-G4Fc.

[0269] Как показано в таблице 3 и на ФИГ. 3Е-3М, из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG1, 2-118-L3Fc10-M3-5, 2-118-L3Fc10-M5-5, 2-118-L3Fc10M7-5 и NGF-118-L3Fc10-M3-5 продемонстрировал значительно лучшую стабильность при ускоренном стрессе, чем другие слитые белки Fc, происходящие из IgG1, с отсутствием детектируемого образования фрагментов (0%) и гораздо меньшим приростом агрегатов. 2-118-L3Fc10-M1-5 также показал сравнимую или лучшую стабильность, чем слитые белки Fc, происходящие из IgG1, такие как NGF-1-15M7, NGF-L3Fc10M7-5 и 2-1-15M7.

Таблица 3. Измерение SEC процентного содержания различных компонентов и процентного прироста агрегатов зрелых слитых белков NGF-Fc при ускоренном тесте на стабильность при температуре 40°C (образец 14-го дня)

Конструкция (зрелый NGF-Fc)	Зрелый фрагмент β-NGF	Линкер	Фрагмент Fc	% агрегации	% фрагмента	Основной пик, %	Увеличение агрегации, %
FD-G4Fc	β -NGF дикого типа 118aa	GSGGGSGGG G SGGGSGGG GS	модифицированный Fc IgG4-FD	11,86	2,1	86,05	4,38
WM-G24Fc	β -NGF дикого типа 118aa	KTGGGSGGG S	модифицированный IgG2/4 Fc	49,15	16,48	34,36	45,6
NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1)	β -NGF дикого типа 120aa	/	IgG1 M7	12,34	5,71	81,94	12,12
NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1)	β -NGF дикого типа 120aa	(G4S) ₃	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa)	9,61	7,02	83,38	7,74
2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1)	мутантный β -NGF <u>120aa</u>	/	IgG1 M7	18,2	10,47	71,33	16,39
NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4)	β -NGF дикого типа 120aa	/	модифицированный Fc IgG4	9,45	49,59	40,96	7,07

2-118-L3Fc10-M1-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M1-5 (N' минус 5aa)	11,38	4,43	84,19	9,51
2-118-L3Fc10-M3-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	7,18	0	92,81	5,68
NGF-118-L3Fc10-M3-5	β -NGF дикого типа 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	5,31	0	94,68	4,12
2-L3Fc10-M3-5	мутантный β -NGF <u>120aa</u>	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	13,23	6,23	80,54	12,01
2-118-L3Fc10-M5-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M5-5 (N' минус 5aa)	6,29	0	93,71	4,14
2-118-L3Fc10M7-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa)	5,04	0	94,96	4,2
2-118-L3G4-BM	мутантный β -NGF 118aa	GGGGGGSGG GGSGGGGSA	модифицированный Fc IgG4	10,32	1,39	88,29	9,24

Определения методом капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS)

[0270] При капиллярном электрофорезе образцы разделяли в капилляре на основе электрофоретической подвижности, которая зависит от заряда и размера молекул. Сначала 40 мкл 1× буфера для образцов и 10 мкл образца белка смешивали в центрифужной пробирке, чтобы получить 50 мкл смеси, содержащей конечную концентрацию белка 0,4 мкг/мкл. В смесь добавляли 1 мкл восстановленного 25× внутреннего стандарта с последующим добавлением 2,5 мкл 250 мМ йодацетамида. Всю смесь встряхивали и инкубировали при температуре 70°C в течение 10 мин, затем давали остыть, тщательно перемешивали и затем центрифугировали. Супернатант 50 мкл обработанного образца переносили в 96-луночный планшет. 96-луночный планшет центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, а затем помещали в систему Maurice (ProteinSimple) для обнаружения CE-SDS в соответствии со стандартным протоколом.

[0271] Как показано в таблице 4 и на ФИГ. 4А-4D, из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG4, в процессе ускоренного стресса NGF-4-12PAA и WM-G24Fc показали весьма очевидную фрагментацию; и 2-118-L3G4-ВМ имели самую низкую фрагментацию. Это согласуется с результатами SEC. Совокупные пики появлялись справа от основных пиков для FD-G4Fc (ФИГ. 4В), но этого не наблюдалось для 2-118-L3G4-ВМ (ФИГ. 4D). В заключение, 2-118-L3G4-ВМ имеет гораздо лучшую стабильность в процессе ускоренного стресса по сравнению с другими слитыми белками Fc, происходящими из IgG4, что согласуется с результатами SEC.

[0272] Как видно из таблицы 4 и на ФИГ. 4Е-4М, из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG1, 2-118-L3Fc10M7-5, NGF-118-L3Fc10-M3-5 и 2-118-L3Fc10-M3-5 обладали наилучшей стабильностью в процессе ускоренного стресса, без видимых пиков фрагментов (см. ФИГ. 4I, 4J и 4M), а прирост фрагментов образца на 14-й день составил 0%. 2-118-L3Fc10-M5-5 также имел хорошую стабильность с гораздо меньшим приростом фрагментов (5,8% на 14-й день). Напротив, другие слитые белки NGF-Fc, содержащие Fc-фрагмент IgG1 (например, NGF-L3Fc10M7-5), были более склонны к образованию фрагментов.

Таблица 4 Измерение с помощью CE-SDS процентного содержания фрагментов и процентного прироста фрагментов зрелых слитых белков NGF-Fc в ускоренном тесте на стабильность при температуре 40°C (образец 14-го дня)

Конструкция (зрелый NGF-Fc)	Зрелый фрагмент β -NGF	Линкер	Фрагмент Fc	% фрагмента	Увеличение % фрагмента
FD-G4Fc	β -NGF дикого типа 118aa	GSGGGSGGG GS GGGGSGGGG S	модифицированный Fc IgG4-FD	17,9	14,4
WM-G24Fc	β -NGF дикого типа 118aa	KTGGGSGGGS	модифицированный IgG2/4 Fc	91,6	67,8
NGF-1-15M7(rhNGF-Fc1)	β -NGF дикого типа 120aa	/	IgG1 M7	15,8	8,6
NGF-L3Fc10M7-5(rhNGF-Li-Fc1)	β -NGF дикого типа 120aa	(G4S) ₃	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa)	47	31
2-1-15M7(rhNGF-(F12E)-Fc1)	мутантный β -NGF <u>120aa</u>	/	IgG1 M7	27	22,6
NGF-4-12PAA(rhNGF-Fc4)	β -NGF дикого типа 120aa	/	модифицированный Fc IgG4	91,4	65,4
2-118-L3Fc10-M1-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M1-5 (N' минус 5aa)	16,7	11,9
2-118-L3Fc10-M3-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	0	0

NGF-118-L3Fc10-M3-5	β -NGF дикого типа 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	0	0
2-L3Fc10-M3-5	мутантный β -NGF <u>120aa</u>	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	27,4	27,4
2-118-L3Fc10-M5-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M5-5 (N' минус 5aa)	5,8	5,8
2-118-L3Fc10M7-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa)	0	0
2-118-L3G4-BM	мутантный β -NGF 118aa	GGGGGGSGG GG SGGGGSA	модифицированный Fc IgG4	11,4	10

[0273] Подводя итог, на основании результатов SEC и CE-SDS: 1) Из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG4, 2-118-L3G4-ВМ показал лучшую ускоренную стабильность, чем FD-G4Fc, и значительно лучшую ускоренную стабильность, чем WM-G24Fc и NGF-4-12PAA; 2) из всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, происходящий из IgG1, 2-118-L3Fc10-M3-5, NGF-118-L3Fc10-M3-5, и 2-118-L3Fc10M7-5 продемонстрировали наилучшую ускоренную стабильность, за которой следует 2-118-L3Fc10-M5-5, по сравнению со всеми другими конструкциями; и 3) условно говоря, зрелые слитые белки NGF-Fc, содержащие Fc-фрагмент, производный от IgG1, проявляли лучшую антиагрегационную способность во время ускоренного стресса по сравнению с белками, содержащими Fc-фрагмент, производный от IgG4.

Пример 4: Анализ пролиферации клеток TF-1 для оценки биологической активности слитых белков NGF-Fc

[0274] Анализ пролиферации клеток TF-1 использовали для проверки биологической активности различных слитых белков NGF-Fc.

[0275] Клетки TF-1 представляют собой факторзависимую эритролейкемическую клеточную линию человека. Клетки TF-1 ресуспендировали в основной культуральной среде (среда RPMI 1640+10% FBS) с получением суспензии, содержащей $5,0 \times 10^4$ клеток/мл, для последующего использования. Готовили стандартный раствор для мышинового NGF SuTaiSheng® (стандартный контроль), тестовые растворы различных слитых белков NGF-Fc и контрольные растворы mNGF118 (мутантный β -NGF 118aa) и rhNGF (рекомбинантный человеческий β -NGF 120aa дикого типа, SEQ ID NO: 4, приготовленные и очищенные, как описано в примере 1), были приготовлены таким образом, чтобы конечный белок составлял 200 ЕД/мл \times 100 мкл/лунку в предварительно меченном 96-луночном планшете. Затем в каждую лунку 96-луночного планшета, содержащего стандартный контроль (мышинный NGF SuTaiSheng®), тестовый слитый белок NGF-Fc или контрольный раствор, добавляли 100 мкл $5,0 \times 10^4$ клеток/мл клеточной суспензии TF-1, затем инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 72 часов во влажном инкубаторе. В каждую лунку клеточной суспензии добавляли 20 мкл раствора для анализа CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, номер по каталогу G3581), затем инкубировали при температуре 37°C, 5% CO₂ в течение 3 часов. Затем планшет измеряли на поглощение при 490 нм и 650 нм на спектрофотометре. Данные регистрировали и нормализовали к стандартному контролю NGF (мышинный NGF SuTaiSheng®).

[0276] Как можно видеть на ФИГ. 5А, 2-118-L3Fc10-M3-5 продемонстрировал самую высокую биологическую активность в стимулировании пролиферации клеток TF-1 среди всех зрелых слитых белков NGF-Fc, содержащих Fc-фрагмент, полученный из IgG1 (или даже среди всех конструкций NGF, включая rhNGF, mNGF118 и мышинный NGF SuTaiSheng®); 2-118-L3Fc10-M3-5 также обладал самой высокой биологической активностью среди трех наиболее стабильных конструкций (2-118-L3Fc10-M3-5, NGF-118-L3Fc10-M3-5 и 2-118-L3Fc10M7-5) в ускоренном анализе стабильности (см. пример 3). Как

можно видеть на ФИГ. 5B, все зрелые слитые белки NGF-Fc, содержащие Fc-фрагмент, полученный из IgG4, проявляли биологическую активность в стимулировании пролиферации клеток TF-1, а 2-118-L3G4-BM продемонстрировал биологическую активность, сравнимую со стандартным контрольным NGF мыши SuTaiSheng®.

Пример 5: Анализ биологической активности *in vivo* различных слитых белков NGF-Fc у крыс

[0277] Верхний шейный ганглий (SCG) представляет собой ткань, состоящую примерно из 30000 нейронов, и является одной из наиболее чувствительных тканей к NGF, особенно в процессе пренатального и постнатального развития. В анализе пролиферации клеток TF-1 (см. пример 4) некоторые слитые белки NGF-Fc, содержащие фрагмент Fc, полученный из IgG1 или IgG4, продемонстрировали высокую биологическую активность. Различные слитые белки NGF-Fc вводили в крысиный SCG, и размер SCG измеряли в различные моменты времени после инъекции, чтобы оценить активность слитых белков NGF-Fc в стимулировании роста SCG *in vivo*.

[0278] Новорожденным крысам линии Sprague Dawley (SD) подкожно вводили в шею различные слитые белки NGF-Fc или контроли NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или мутантный NGF118), затем умерщвляли для вскрытия SCG. Инъекция PBS служила отрицательным контролем. Как показано на ФИГ. 6A, контрольный белок NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или мутантный NGF118) или PBS вводили один раз в день в день 0, 1, 2 и 3, затем на день 4 получали SCG. 2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM вводили в 0-й день однократно в той же дозе, затем на 4-й день получали SCG. Вкратце, после декапитации голову крысы фиксировали на операционной платформе, дренировали кровь ватными тампонами, сначала определяли трахею и большое затылочное отверстие, затем выделяли ткань оболочки сонной артерии на косо-задней стороне трахеи и удаляли микропинцетом и помещали в чашку Петри, содержащую PBS, с последующим выделением SCG под препаровальным микроскопом. Избыток жидкости на поверхности изолированного SCG удаляли бумажной салфеткой, затем SCG помещали на чашку с чистой поверхностью для определения массы. Морфология SCG продемонстрирована на ФИГ. 6B. Записанные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. ** указывает на статистически значимое значение по сравнению с группой, получавшей PBS; n.s. указывает на «нет значимости» по сравнению с группой, получавшей PBS. Как можно видеть на ФИГ. 6C, при дозе введения 2 нМ мутантный β -NGF 118aa (mNGF118), мышинный NGF SuTaiSheng® и 2-118-L3Fc10-M3-5 не стимулировали рост SCG со статистической значимостью по сравнению с отрицательным контролем PBS. При этом 2-118-L3G4-BM значительно способствовал росту SCG по сравнению с контролем PBS (**p<0,01). При введении дозы 5 нМ либо контроли NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118), либо слитые белки NGF-Fc (2-118-L3G4-BM или 2-118-L3Fc10-M3-5) значительно стимулировали рост SCG *in vivo*, когда по сравнению с группой, получавшей PBS (**p<0,01), и активность, стимулирующая рост SCG, существенно не отличалась среди четырех протестированных белков NGF (n.s. указывает на p>0,05) (ФИГ. 6D). Таким

образом, однократная подкожная инъекция 2-118-L3G4-ВМ продемонстрировала более высокую активность в стимулировании роста SCG *in vivo* по сравнению с мышинным NGF SuTaiSheng® или мутантным β -NGF 118aa (mNGF118) даже в дозе 2 нМ. В то время как при более высоких дозах (5 нМ) однократная обработка либо 2-118-L3G4-ВМ, либо 2-118-L3Fc10-M3-5 продемонстрировала схожую активность в стимулировании роста SCG.

Пример 6: Фармакокинетические (ФК) исследования различных полипептидов NGF на крысах

[0279] Авторы изобретения исследовали фармакокинетические профили различных конструкций NGF путем инъекции взрослым крысам.

[0280] 24 самца крыс SD (возраст 6-8 недель, около 250-300 г на крысу) случайным образом разделяли на 3 группы (по 8 в каждой группе) и внутримышечно вводили по 235 мкг/кг 2-118-L3Fc10-M3-5, 2-118-L3G4-ВМ или mNGF118 (мутантный β -NGF 118aa без слияния Fc), соответственно. Перед инъекцией из задней глазничной вены собирали 150 мкл крови (0 часов) или через 1 час, 4 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 120 часов, 168 часов, 216 часов и 288 часов после инъекции. После сбора крови выделяли плазму, затем использовали для исследования содержания NGF с помощью набора пар антител к NGF человека, подобранных методом ELISA (Sino Biological, SEK11050). Средние значения оптической плотности стандартов при 450-630 нм откладывали по оси Y, а концентрации стандартов откладывали по оси X для получения линейного уравнения стандартной кривой с требованием $R^2 > 0,98$. Затем по линейному уравнению стандартной кривой рассчитывали концентрации различных образцов в плазме крови. GraphPad Prism 5.0 использовался для построения полулогарифмического графика зависимости концентрации образца от времени, Phoenix WinNonlin 6.2 использовался для анализа фармакокинетики, а GraphPad Prism 5.0 использовался для построения графиков рассеяния периода полувыведения.

[0281] Как можно видеть на ФИГ. 7А, слитые белки NGF-Fc показали гораздо более высокую концентрацию в плазме крови с течением времени после однократной внутримышечной инъекции по сравнению с контролем mNGF118 без слитого Fc; и 2-118-L3G4-ВМ показали сходную концентрацию в плазме крови с течением времени после однократной внутримышечной инъекции по сравнению с 2-118-L3Fc10-M3-5. Как можно видеть на ФИГ. 7В, период полувыведения 2-118-L3G4-ВМ (55 часов) был почти таким же, как у 2-118-L3Fc10-M3-5 (55 часов), оба были намного дольше, чем (примерно в 31 раз) mNGF118. контроль без слияния Fc (период полувыведения 1,75 часа). Эти результаты также объясняют, почему однократная доза 2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5 продемонстрировала схожую активность в стимулировании роста SGC *in vivo* по сравнению с непрерывной инъекцией контролей NGF, не являющихся слитыми Fc (мышинный NGF или mNGF118 SuTaiSheng®)(см. ФИГ. 6D).

[0282] Периоды полувыведения wtNGF120 (то есть «rhNGF», человеческий β -NGF дикого типа 120aa, SEQ ID NO: 4), NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1), NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1), 2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1) и NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4) показаны в таблице 2 WO

2017157325 и суммированы в таблице 5. Период полувыведения mNGF118, исследованного в этом эксперименте (1,75 часа), был подобен периоду полувыведения wtNGF120, исследованному в WO 2017157325 (1,8 часа). Как видно из таблицы 5, конструкции NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1), NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1) и 2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1) продлевают период полувыведения *in vivo* более чем в 17 раз по сравнению с контролями wtNGF120 или mNGF118 без слияния Fc; также примерно в 1,4 раза больше, чем NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4). Период полувыведения 2-118-L3G4-BM (55 часов), исследованного в этом эксперименте, был почти таким же, как у 2-118-L3Fc10-M3-5 (55 часов), оба примерно в 31 раз больше по сравнению с контролями wtNGF120 или mNGF118 без Fc-слияние, а также намного дольше, чем все ранее исследованные зрелые слитые белки NGF-Fc с Fc-фрагментом, происходящим либо из IgG1, либо из IgG4.

Таблица 5. Период зрелых полипептидов NGF

Конструкция	Зрелый фрагмент β -NGF	Линкер	Фрагмент Fc	Полувыведение (t1/2, час)
wtNGF120 (rhNGF)	β -NGF дикого типа 120aa	/	/	1,8
NGF-1-15M7 (rhNGF-Fc1)	β -NGF дикого типа 120aa	/	IgG1 M7	38,75
NGF-L3Fc10M7-5 (rhNGF-Li-Fc1)	β -NGF дикого типа 120aa	(G4S) ₃	IgG1 M7-5 (N' минус 5aa)	33,83
2-1-15M7 (rhNGF-(F12E)-Fc1)	мутантный β -NGF <u>120aa</u>	/	IgG1 M7	32,24
NGF-4-12PAA (rhNGF-Fc4)	β -NGF дикого типа 120aa	/	модифицированный Fc IgG4	23,1
mNGF118	мутантный β -NGF 118aa	/	/	1,75
2-118-L3Fc10-M3-5	мутантный β -NGF 118aa	(G4S) ₃	IgG1 M3-5 (N' минус 5aa)	55
2-118-L3G4-BM	мутантный β -NGF 118aa	GGGGGGSGGGGSGGGG SA	модифицированный Fc IgG4	55

Пример 7: Слитый белок NGF-Fc способствует заживлению ран при диабетической невропатии

[0283] Диабетическая невропатия является одним из частых хронических осложнений сахарного диабета, больные которым характеризуются медленным заживлением ран, разной степенью инфицирования, язвами, сибирской язвой, даже с риском ампутации. Данный пример иллюстрирует исследование терапевтических эффектов слитых белков NGF-Fc на модели животных с диабетической невропатией (например, посредством оценки заживления ран).

[0284] Мышей CD-1 получали от компании Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. Модель диабета на животных создавали стандартными способами (например, см. G. Graiani et al., «Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of Type 1 diabetic mice», *Diabetologia*, 2004, 47(6):1047-54). Через 4 недели индукции диабета мышей анестезировали и наносили две полнослойные кожные раны диаметром 4 мм рядом друг с другом в межлопаточной области с помощью одноразового оборудования для перфорации кожи. 50 мкг/мл SuTaiSheng® мышинового NGF, mNGF118 или слитого белка NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) вводили в правую рану в дозе 20 мкл/введение. В левую рану вводили равный объем PBS (служащий отрицательным контролем). PBS, мышиный NGF SuTaiSheng® или mNGF118 вводили в дни 0 (после сверления спины мышей), 1, 2 и 3 один раз в день. 2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM в той же дозе вводили в день 0 (после сверления) однократным введением. Площадь раны измеряли сразу после сверления и записывали как площадь раны на 0-й день. Затем измеряли площади раны на 4-й и 7-й дни с последующим расчетом скорости закрытия раны. Записанные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Гистограмму рисовал с помощью GraphPad Prism 8.0.1.

[0285] Как показано на ФИГ. 8, сравнивалось, будет ли закрытие на 7-й день лучше по сравнению с 4-м днем для всех групп; SuTaiSheng® мышиный NGF, mNGF118 и слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) значительно способствовали заживлению диабетических ран по сравнению с отрицательным контролем PBS ($p < 0,01$). В частности, на 4-й день средняя площадь раны в группе лечения PBS была примерно в 1,3 раза больше, чем в группе SuTaiSheng® мышинового NGF, mNGF118 или слитого белка NGF-Fc. Эти результаты демонстрируют, что мышиный слитый белок SuTaiSheng® NGF, mNGF118 или NGF-Fc может эффективно улучшать дефект медленного заживления ран у мышей с диабетом. Кроме того, на 7-й день скорость закрытия ран у мышей с диабетом, которым вводили слитый белок NGF-Fc, была выше, чем у мышей SuTaiSheng® в группе лечения NGF и mNGF118. Это продемонстрировало превосходный терапевтический эффект *in vivo* слитого белка NGF-Fc по сравнению с NGF (например, мышиный NGF SuTaiSheng® или mNGF118).

Пример 8: Терапевтический эффект слитого белка NGF-Fc на болезнь Альцгеймера

[0286] Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой дегенеративное заболевание центральной нервной системы с прогрессирующей потерей памяти в качестве основного клинического проявления, которое в основном возникает у пожилых людей со сложным патогенезом. Этот пример иллюстрирует исследование терапевтических эффектов слитых белков NGF-Fc на AD *in vivo* (например, путем оценки поведенческих изменений животных).

[0287] Крыс Wistar использовали для создания животной модели болезни Альцгеймера стандартными методами (например, см. G.L. Wenk et al. «Basal forebrain neurons and memory: a biochemical, histological and behavioural study of differential vulnerability to ibotenate and quisqualate». *Neurosci*, 1992, 106(6): 909-923). Вкратце, крысам Wistar вводили стереотаксическую инъекцию иботеновой кислоты (IBO). Через два дня после введения IBO анестезированных крыс модели AD помещали на спину. 150 мкг/мл NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитого белка NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) вводили интраназально в общей дозе 100 мкл/введение. Крысы с моделью AD, которым вводили равный объем PBS, служили группой отрицательного контроля. NGF или PBS непрерывно вводили один раз в день в течение 7 дней. Слитый белок NGF-Fc вводили однократно в день 1. Поведенческие изменения крыс оценивали с помощью водного лабиринта Морриса (MWM) на 7-й день. Вкратце, используя устройство для водного лабиринта Морриса, перед экспериментом крыс обучали взбираться на платформу. В ходе эксперимента регистрировали время поиска платформы (задержка выхода; от входа в воду до подъема на платформу) и время пересечения положения, в котором платформа была помещена, но затем удалена в течение 120 с. Записанные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента.

[0288] Как показано в таблице 6 время поиска платформы у крыс с моделью AD, обработанных мышинным слитым белком NGF, mNGF118 или NGF-Fc SuTaiSheng® (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) значительно сокращалось (* $p < 0,05$), а время пересечения платформы значительно увеличивалось (* $p < 0,05$) по сравнению с группой отрицательного контроля. Таким образом, NGF и слитые белки NGF-Fc, описанные в настоящем документе, могут эффективно улучшать пространственное познание, память и способность к обучению крыс с моделью AD. Кроме того, у крыс с моделью AD, получавших либо 2-118-L3Fc10-M3-5, либо 2-118-L3G4-BM, по-видимому, наблюдалось более короткое время поиска платформы и более высокая частота пересечения платформ по сравнению с крысами, получавшими NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118). Эти данные демонстрируют превосходный терапевтический эффект *in vivo* слитого белка NGF-Fc на AD.

Таблица 6. Статистическая таблица водного лабиринта Морриса ($\bar{x} \pm \text{стандартное отклонение}$)

Группа	Время поиска платформы (с)	Время пересечения платформы (появление)
--------	----------------------------	---

Отрицательный контроль PBS	52,28±20,12	3,31±1,85
SuTaiSheng® мышинный NGF	32,05±16,36*	7,43±2,85*
mNGF118	31,91±18,87*	7,58±3,26*
2-118-L3Fc10-M3-5	28,16±20,85*	8,01±3,07*
2-118-L3G4-BM	27,58±17,95*	8,58±2,46*

Пример 9: Терапевтический эффект слитого белка NGF-Fc на преждевременную недостаточность яичников

[0289] Преждевременная недостаточность яичников (POF) относится к естественной аменорее до 40 лет, вызванной недостаточностью функции яичников, которая часто сопровождается снижением уровня эстрогенов, повышением уровня фолликулообразующего гормона и повышением уровня гонадотропина, со сложной этиологией и механизмом. Этот пример демонстрирует терапевтическую эффективность слитого белка NGF-Fc при лечении POF с помощью анализа пролиферации линии клеток гранулезоподобной опухоли яичников человека (KGN) *in vitro* и анализа секреции эстрогена KGN, а также на крысах с моделью POF.

[0290] В анализе пролиферации KGN 100 мкл суспензии KGN (1×10^4 клеток/мл) добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета за один день до анализа. Бессывороточную среду DMEM заменяли перед экспериментом. После смены среды в лунки экспериментальной группы добавляли мышинный NGF, mNGF118 или слитый белок SuTaiSheng® NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) с конечной концентрацией 10 мкг/мл. Отрицательная контрольная группа не подвергалась никакому лечению после смены среды. В каждой группе было по 4 повторения. Через 48 часов в каждую лунку добавляли 10 мкл набора Cell Counting Kit-8 (DOJINDO, #CK04) для измерения жизнеспособных клеток. После одного часа инкубации измеряли поглощение при 450 нм. Записанные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Гистограмму рисовал с помощью GraphPad Prism 8.0.1.

[0291] Как показано на ФИГ. 9А, как NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118), так и слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) значительно стимулировали пролиферацию KGN по сравнению с группой отрицательного контроля ($p < 0,05$). Условно говоря, KGN, обработанный слитым белком NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM), показал немного более высокую скорость пролиферации по сравнению с KGN, обработанным NGF.

[0292] В анализе секреции эстрогена KGN клетки (слияние составляло около 80%) инокулировали в 24-луночные планшеты с плотностью 1×10^5 клеток/лунку, затем бессывороточную среду заменяли. После смены среды в лунки экспериментальной группы добавляли мышинный NGF, mNGF118 или слитый белок SuTaiSheng® NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) с конечной концентрацией 10 мкг/мл. Отрицательная контрольная группа не подвергалась никакому лечению после смены среды. В каждой группе было по 4 повторения. После 18 часов инкубации клетки дважды промывали, затем

обрабатывали $2,2 \times 10^{-8}$ М тестостерона (Beijing Solarbio Life Science & Technology Co., Ltd, #IT0110) и 0,01 МЕ/мл овечьего фолликулостимулирующего гормона (National Health Physics Program, Ovine FSH) в течение 24 час. Получали супернатант и разбавляли в 1,6 раза. Используя набор для определения эстрогена (KGE014), произведенный R&D systems, измеряли значение поглощения при 450 нм и рассчитывали концентрацию секретируемого эстрогена. Записанные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Гистограмму строили с помощью GraphPad Prism 8.0.1.

[0293] Как показано на ФИГ. 9В, как NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118), так и слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) значительно стимулировали секрецию эстрогена KGN по сравнению с группой отрицательного контроля ($p < 0,05$). Условно говоря, KGN, обработанный слитым белком NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM), показал несколько более высокую секрецию эстрогена по сравнению с KGN, обработанным NGF.

[0294] 4-Винилциклогексендиэпоксид (VCD) может избирательно разрушать примордиальные фолликулы и первичные фолликулы в яичниках самок крыс, но не действует на вторичные фолликулы и фолликулы синуса, что приводит к POF у самок крыс. Для дальнейшего изучения *in vivo* эффективности слитого белка NGF-Fc при лечении POF была создана крысиная модель POF путем внутривентриальной инъекции VCD крысам SD в течение двух недель подряд (например, см. F.S. Muhammad et al., «Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult Sprague-Dawley rats: ovarian, clinical, and pathologic outcomes». *Comp Med*, 2009,59(1):46-59). Лечение NGF начинали, когда начинали создание животной модели, что обозначалось как День 1. NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) вводили подкожно в дозе 10 мкг/кг массы тела/инъекцию для экспериментальных групп; группе отрицательного контроля вводили равный объем стерильного физиологического раствора. Мышинный NGF, mNGF118 SuTaiSheng® или стерильный солевой раствор вводили *quaque die alterna* (через день). Слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) вводили один раз в неделю. Через 42 дня всех крыс умерщвляли, получали и фиксировали ткани яичников, заливали в парафин, делали срезы и окрашивали H&E (гематоксилином и эозином). Затем подсчитывали количество фолликулов. Записанные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента. Гистограмму строили с помощью GraphPad Prism 8.0.1.

[0295] Как показано на ФИГ. 9С, мышинный NGF SuTaiSheng®, mNGF118 и слитый белок NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM) значительно увеличивали количество первичных фолликулов ($p < 0,05$) по сравнению с отрицательной контрольной группой, демонстрируя их превосходный эффект в отношении уменьшения числа первичных фолликулов, вызванного POF. На крысиной модели POF, обработанная мышинным NGF, mNGF118 или слитым белком NGF-Fc SuTaiSheng® (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-BM), было показано большее количество примордиальных фолликулов, а также вторичных фолликулов по сравнению с отрицательным контролем.

Пример 10: Терапевтический эффект слитого белка NGF-Fc на олигоастеноспермию

[0296] Олигоастеноспермия в основном характеризуется уменьшением количества сперматозоидов и/или подвижности сперматозоидов. Сперматозоиды образуются в результате серии событий деления и дифференцировки зародышевых клеток с пролиферативной способностью в семявыносящих канальцах яичка. На деление, дифференцировку и образование сперматозоидов зародышевых клеток может повлиять тепловой стресс. Этот пример иллюстрирует исследование терапевтического действия слитого белка NGF-Fc на олигоастеноспермию (олигозооспермию и астеноспермию) на мышинной модели нарушения сперматогенеза.

[0297] В эксперименте использовали мышей C57BL/6JSHjh (Shanghai Jihui Experimental Animal Breeding Co., Ltd). В случае экспериментальных групп вводили подкожно в пах по 20 мкг/кг массы тела/инъекцию NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или по 60 мкг/кг массы тела/инъекцию слитого белка NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-БМ). Нормальную контрольную группу или контрольную группу с моделью нарушения сперматогенеза лечили инъекцией равного объема 0,9% хлорида натрия. Первый день лечения (NGF, слитый белок NGF-Fc или хлорид натрия) обозначали как День 1. Для создания мышинной модели нарушения сперматогенеза, вызванного тепловым стрессом, обработанных мышей анестезировали через 4 часа после первой инъекции. После того, как яички мыши опустились в мошонку, нижнюю часть живота (задние конечности, хвост и мошонку) мышей в контрольной группе модели нарушения сперматогенеза, экспериментальной группе NGF и экспериментальной группе слитого белка NGF-Fc на 30 минут погружали в водяную баню с постоянной температурой 42°, в то время как нижнюю часть живота мышей в нормальной контрольной группе на 30 минут погружали в водяную баню с постоянной температурой 25°. Мышинный NGF или mNGF118 SuTaiSheng® вводили *quaque die alterna*. 2-118-L3G4-БМ или 2-118-L3Fc10-M3-5 вводили два раза в неделю. Нормальной контрольной группе или контрольной группе с моделью нарушения сперматогенеза вводили инъекцию 0,9% хлорида натрия *quaque die alterna*. Общий период введения составил пять недель. Всех мышей умерщвляли на 37-й день. Левый эпидидимальный хвост собирали, взвешивали, затем помещали в культуральную среду M199, предварительно нагретую до температуры 37°C, разрезали на кусочки и помещали в инкубатор при температуре 37°C на 5 минут. Полученную суспензию сперматозоидов разбавляли культуральной средой M199 в соотношении 1:6. После смешивания получали разбавитель и регистрировали количество и подвижность сперматозоидов с помощью анализатора спермы TOXIVOS. Зарегистрированные данные анализировали с помощью t-критерия Стьюдента.

[0298] Как показано в таблице 7, количество и подвижность сперматозоидов в контрольной группе с моделью нарушения сперматогенеза были значительно ниже, чем в контрольной группе с нормальным состоянием, демонстрируя, что модели животных были успешно созданы. Количество и подвижность сперматозоидов в экспериментальных

группах NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) и слитого белка NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5) значительно увеличились по сравнению с контрольной группой с моделью нарушения сперматогенеза. Эти результаты продемонстрировали, что подкожная инъекция NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитого белка NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5) может эффективно восстановить снижение количества сперматозоидов и плохую подвижность сперматозоидов при нарушениях сперматогенеза, таких как олигозооспермия, астеноспермия и олигоастеноспермия.

Таблица 7. Количество сперматозоидов и подвижность сперматозоидов в мышинной модели с нарушением сперматогенеза, обработанных NGF или слитым белком NGF-Fc

Группа	Количество сперматозоидов ($\times 10^6/\text{г}$)	Подвижность сперматозоидов (%)
Нормальный контроль	4222,5 \pm 592,1	79,7 \pm 5,3
Нарушение сперматогенеза модельный контроль	1905,3 \pm 747,2	59,5 \pm 11,3
SuTaiSheng® мышинный NGF	3201,6 \pm 1246,0	71,5 \pm 20,4
mNGF118	2882,5 \pm 1093,6	69,6 \pm 10,9
2-118-L3Fc10-M3-5	3734,1 \pm 1290,2	77,0 \pm 11,3
2-118-L3G4-ВМ	3544,9 \pm 1442,9	73,8 \pm 9,1

[0299] Для дальнейшего изучения терапевтических эффектов слитого белка NGF и NGF-Fc правые яички и придатки яичек умерщвленных мышей взвешивали, фиксировали 10% нейтральным формалином, заливали, делали срезы и окрашивали H&E для оценки их гистопатологии. Как показано в таблице 8, NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) и слитый белок NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5) демонстрируют значительное терапевтическое действие на атрофию семенных канальцев яичка, нарушение сперматогенеза в семенных канальцах и фрагменты клеток протоков придатка яичка, вызванные тепловым стрессом.

[0300] Кроме того, слитый белок NGF-Fc продемонстрировал сравнимые или даже лучшие терапевтические эффекты.

Таблица 8. Гистопатологическая статистика подкожной инъекции слитого белка NGF или NGF-Fc мышам с нарушением сперматогенеза

Группа			Нормальный контроль	Модельный контроль	SuTaiSheng® мышиный NGF	mNGF11 8	2-118-L3Fc10- M3-5	2-118- L3G4- BM
Семенник	Атрофия семенных канальцев	Слабая	1	4	4	3	2	3
		Легкая	0	4	3	3	1	1
		Умеренная	0	2	1	2	0	1
		Тяжелая	0	1	0	0	0	0
		Общая	1	11	8	8	3	5
	Нарушение сперматогенеза в семенных канальцах	Слабое	0	10	8	10	6	4
		Легкое	0	2	2	1	1	1
		Умеренное	0	1	0	0	0	0
Общее		0	13	10	11	7	5	
Эпидидимис	Эпидидимальные сперматозоиды	Слабые	0	7	8	9	10	9
		Легкие	0	3	2	1	0	0
		Общие	0	10	10	10	10	9
	Фрагменты клеток эпидидимального протока	Слабые	1	5	3	2	1	1
		Общие	1	5	3	2	1	1
	Сперматозная гранулема/семинома	Легкая	1	0	1	0	1	1
		Общая	1	0	1	0	1	1

Пример 11: Терапевтический эффект слитого белка NGF-Fc на нейротрофический кератит

[0301] Нейротрофический кератит представляет собой дегенеративное заболевание, вызванное нарушением заживления эпителия роговицы, которое в основном характеризуется снижением чувствительности роговицы. Этот пример иллюстрирует исследование терапевтических эффектов слитого белка NGF-Fc на нейротрофический кератит в модели нейротрофического кератита у крыс (например, с помощью анализа окрашивания роговицы флуоресцеином натрия или измерения длины нерва роговицы).

[0302] Для создания модели нейротрофического кератита на животных 3-дневным крысам SD подкожно инъецировали 8 мг/мл раствора капсаицина (Shanghai McLean Biochemical Technology Co., Ltd., #C10831884) в дозе 50 мкл на крысу. Через две недели после инъекции капсаицина 6 раз в день вводили 60 мкг/мл NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитого белка NGF-Fc (2-118-L3G4-BM или 2-118-L3Fc10-M3-5) с интервалом около 2 ч в виде глазных капель по 20 мкл/глаз/введение. Равный объем 0,9% раствора хлорида натрия вводили с той же частотой, что и отрицательный контроль. Первый день введения был обозначен как D1. Лечение длилось 2 недели и проводилось только один раз в каждой группе на D15.

[0303] Затем для оценки терапевтических эффектов слитого белка NGF-Fc проводили окрашивание роговицы флуоресцеином натрия. Окрашивание роговицы флуоресцеином натрия может напрямую указывать на целостность и степень повреждения роговицы. Интактная роговица не окрашивается. Окрашиваться может только поврежденная роговица, и чем выше оценка окрашивания, тем выше степень повреждения роговицы. Вкратце, раствор флуоресцеина натрия (3 мкл, 0,5%) капали в глаза крыс и окрашивали глаза в течение 1,5 минут. Затем конъюнктивный мешок промывали 1,25 мл стерильного физиологического раствора каждые 10 секунд 3 раза подряд. После каждого промывания нормальный физиологический раствор вокруг глаз впитывали бумажной салфеткой. Через 5 минут после окрашивания поверхность глаза осматривали в щелевой лампе (с кобальтовым синим фильтром), фотографировали и оценивали. Усовершенствованная шкала NEI для оценки флуоресцентного окрашивания использовалась в качестве стандарта оценки. В частности, каждая роговица была разделена на 5 областей (1-центральная область, 2-верхняя, 3-височная, 4-носовая и 5-нижняя), максимальная оценка для каждой области составила 8 баллов, где точка 0 указывает на отсутствие окрашенной области, 1 указывает на то, что область точечного окрашивания составляет 1%~25% соответствующей площади, 2 указывает на то, что площадь точечной окраски составляет 26%~50% соответствующей площади, 3 указывает на то, что площадь точечной окраски составляет 51%~75% соответствующей площади и 4 указывает на то, что область точечного окрашивания составляет 76%~100% соответствующей площади. Если окрашенная область была плотной и/или можно было увидеть очевидное слияние в этой области, дополнительно дается 1, 2, 3 или 4 балла в соответствии с процентом окрашенной области в соответствующей области, соответственно, то есть 1 дополнительный балл за

окрашенную область 1%~25%, 2 дополнительных балла за окрашенную область 26%~50%, 3 дополнительных балла за окрашенную область 51%~75% и 4 дополнительных балла за окрашенную область 76%~100%. Максимальная суммарная оценка для каждого глаза составила 40 баллов. Измерения проводились в общей сложности 4 раза в дни 0 (до первой обработки), 4, 8 и 14. Рассчитывали общий балл окрашивания роговицы флуоресцеином натрия. Зарегистрированные данные проанализировали с помощью SPSS13.0, и гистограмму строили с помощью GraphPad Prism 8.0.1.

[0304] Как показано на ФИГ. 10А, показатели окрашивания флуоресцеином натрия роговицы крыс на модели нейротрофического кератита в NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитом белке NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5), получавших экспериментальные были значительно ниже ($p < 0,01$ на 4-й и 8-й день, $p < 0,001$ на 14-й день), чем в группе отрицательного контроля, что указывает на то, что NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитый белок NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5) позволяют значительно восстановить целостность поврежденной роговицы. Роговица, обработанная слитым белком NGF-Fc (2-118-L3Fc10-M3-5 или 2-118-L3G4-ВМ), показала несколько более низкие показатели окрашивания флуоресцеином натрия по сравнению с роговицей, обработанной NGF.

[0305] Далее для изучения терапевтической эффективности проводили анализ нервов роговицы. В день 15 крыс забивали через 1 час после последней обработки. Извлекали правое глазное яблоко. Роговицу отделяли вдоль лимба роговицы, промывали, покрывали, окрашивали и фиксировали на предметных стеклах. Морфологию нервных волокон роговицы наблюдали под оптическим микроскопом (200×). Область роговицы разделяли радиально от центра на четыре лоскута с последующим фотографированием поля зрения с наибольшим количеством нервов роговицы в каждом из четырех лоскутов. Затем измеряли длину роговичных нервов в каждом поле зрения и в качестве конечного результата рассчитывали среднюю длину роговичных нервов во всех четырех полях. Для обработки данных использовался пакет SPSS13.0, а для построения гистограммы использовалась графическая призма 8.0.1.

[0306] Как показано на ФИГ. 10В, средняя длина нерва роговицы на моделях нейротрофического кератита у крыс, обработанных NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитым белком NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5), была значительно длиннее ($p < 0,05$), чем в группе отрицательного контроля. В частности, средняя длина нерва роговицы у крыс, получавших SuTaiSheng® мышинный NGF, mNGF118, 2-118-L3G4-ВМ и 2-118-L3Fc10-M3-5, была примерно в 1,14 раза, 1,14 раза, 1,21 раза и 1,18 раза больше чем в группе отрицательного контроля, соответственно. Эти результаты демонстрируют, что NGF (мышинный NGF SuTaiSheng® или mNGF118) или слитый белок NGF-Fc (2-118-L3G4-ВМ или 2-118-L3Fc10-M3-5) могут эффективно лечить повреждение нерва роговицы, вызванное нейротрофическим кератитом.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 (мутантный β -NGF человека, 118aa)

SSSHPIFHRGEEVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFE
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLS
RKAVR

SEQ ID NO: 2 (мутантный β -NGF человека , 120aa)

SSSHPIFHRGEEVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFE
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLS
RKAVRRA

SEQ ID NO: 3 (β -NGF человека дикого типа, 118aa)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFE
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLS
RKAVR

SEQ ID NO: 4 (β -NGF человека дикого типа, 120aa)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFE
TKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLS
RKAVRRA

SEQ ID NO: 5 (пропептид NGF, 103aa)

EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITV
DPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKR

SEQ ID NO: 6 (сигнальный пептид NGF, 18aa)

MSMLFYTLITAFILIGQA

SEQ ID NO: 7 (человеческий IgG1 дикого типа Fc IGHG1*05)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 8 (человеческий IgG1 дикого типа Fc IGHG1*03, естественный вариант)

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 9 (модифицированный Fc IgG1 M1 [N297A относительно IGHG1*03])

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 10 (модифицированный Fc IgG1 M1-5 [N297A относительно IGHG1*03, N° 5aa процессинг])

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (модифицированный Fc IgG1 M3 [L234A+L235A+P331S относительно IGHG1*03])

*EPK*SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 12 (модифицированный Fc IgG1 M3-5 [L234A+L235A+P331S относительно IGHG1*03, N° 5aa процессинг])

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13 (модифицированный Fc IgG1 M5 [L234A+L235E+G237A+A330S+P331S относительно IGHG1*03])

*EPK*SCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 14 (модифицированный Fc IgG1 M5-5 [L234A+L235E+G237A+A330S+P331S относительно IGHG1*03, N° 5aa процессинг])

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 15 (модифицированный Fc IgG1 M7 [E233P+L234V+L235A+G236del+A327G+A330S+P331S относительно IGHG1*03])

*EPK*SCDKTHTCPPCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

SEQ ID NO: 16 (модифицированный Fc IgG1 M7-5
[E233P+L234V+L235A+G236del+A327G+A330S+P331S относительно IGHG1*03, N' 5aa процессинг])

DKTHTCPPCPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17 (человеческий IgG4 дикого типа Fc)

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 18 (модифицированный IgG4 Fc [S228P+F234A+L235A])

ESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 19 (модифицированный IgG4 Fc-FD)

SKYGPPCPCPAPEFGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 20 (модифицированный IgG2/4 Fc)

VERKCCVECPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 21 (последовательность нуклеиновой кислоты FD-G4Fc; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (wt 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttctacactctgatacacagctttctgateggcatacagggc*gaaccacactcagagagcaatgtccctgca
ggacacaccatcccccaagcccactggactaaactcagattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgagcggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcaacattactgtggacccaggctgttataaaagcggcgactccgtcaccctgtgtct
gttttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggactcagagctggtggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcggg**tc**atcatcccatcccatcttccacaggggcgaattctcggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggtggggataagacc
accgccacagatcaagggcaaggaggtgatggtgtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttga
gaccaagtccgggacccaateccgttgacagcgggtgccggggcattgactcaaacactggaactcatattgtaccagact
cacacctttgcaagggcgtgaccatggatggcaagcaggtgcctggcgggttatccggatagatacggcctgtgtgtgtgctc
agcaggaaggctgtgagaGGCTCCGGCGGCGGCTCCGGTGGCGGCGGCTCAGGAGGAGGAG

GCTCCGGTGGTGGTGGTTCCTCCAAGTATGGCCCCCCTGCCCCCCTGCCAGCACC
TGAGTTCGAGGG*Ggaccatcagttctctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtc*
acgtgcgtggtggtgacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgagggtgcataatgccaaag
acaaagccgcgggaggagcagttcaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaa
ggagtacaagtgaaggtctccaaacaaaggcctcccgctctccategagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagag
ccacaggtgtacacctgccccateccaggaggatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggettctacccc
agcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggt
cctttctctacagcaggctaacctggacaagagcaggtggcaggaggggaatgttctctcatgctccgtgatgcatgaggetctg
*cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtct***CCGggtaaa**

SEQ ID NO: 22 (аминокислотная последовательность FD-G4Fc; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF***FLIGIQAE****EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA**
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKR**SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ**
YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM**DGKQAAWR****FIRIDT**
ACVCLSRKA**VRGSGGGSGGGSGGGSGGGSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFP**
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKG**FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG**
NVFSCSV**MHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEQ ID NO: 23 (последовательность нуклеиновой кислоты WM-G24Fc; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG2/4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttctacactctgatcacagctttctgatcggcatacagggc***gaaccacactcagagagcaatgtccctgca**
ggacacaccatccccaaagccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgagcggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcgaacattactgtggacccaggctgttataaaagcggcgactccgttcacccgtgtgct
gtttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcgg**tc****atcatccatccatcttccacaggggcgaattctcggtgtgtgacagtgacagcgtgtgggtggggataagacc**
accgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgggagaggtgaacattaacaacagtgattcaaacagtactttttga
gaccaagtccgggacccaaatccggtgacagcgggtgccggggcattgactcaaaagcactggaaactcatattgtaccagact
cacacctttgcaaggcgtgaccatggatggcaagcaggetgctggcggtttatccggatagatacggcctgtgtgtgtgtgctc
agcaggaaggctgtgaga**AAGACCGGCGGTGGCTCCGGCGGGCGGCTCCGTGGAGCGGAAGTG**
CTGCGTGGAGTGCCCCCCTGCCCCGCTCCCCCGTGGCTGGACCATCAGTCTTCTG
TTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT

ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGA
 GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGA
 GCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTA

SEQ ID NO: 24 (аминокислотная последовательность WM-G24Fc; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG2/4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF***FLIGIQAE**EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
 AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRRLSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKR**SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ**
 YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM~~MDGKQAAWR~~FIRIDT
 ACVCVLSRKAVR**K**TGGGSGGG**S**VERKCCVEC**PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS**
RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG**QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF**
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 25 (последовательность нуклеиновой кислоты NGF-1-15M7; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttctctacactctgatcacagctttctgatcgccatacagggc***gaaccacactcagagagcaatgtccctgca**
ggacacaccatccccaaagccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgccagcggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcgaacattactgtggacccaggctgttataaaagcggcgactccgttcaccccgctgct
gtttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcgg**tc**atcatcccatccatcttccacaggggcaattctcggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggtgggataagacc
 accgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttga
 gaccaagtccgggacccaatcccgttgacagcgggtgcccgggcatgactcaaaagcactggaactcatattgtaccagact
 cacacctttgcaaggcgtgaccatggatggcaagcaggetgctggcggtttatccgatagatacggcctgtgtgtgtgctc
 agcaggaaggctgtgagaagagcc**GAGCCCAAATCTTGTGACAAA**ACTCACACATGCCACCGTG
 CCCAGCACCTCCAGTCGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCTC
 ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCATCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
 AACCAAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA

GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
 ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCCCCGGGTA

SEQ ID NO: 26 (аминокислотная последовательность NGF-1-15M7; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF***FLIGIQAE**EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
 AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKR**SSSHPIFHRGEFSVCDSVS**VWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ
 YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM~~MDGKQAAWR~~FIRIDT
 ACVCLSRKAVRRAEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 27 (последовательность нуклеиновой кислоты NGF-L3Fc10M7-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttctctacactctgatcacagctttctgatcggcatacagggc***gaaccacactcagagagcaatgtccctgca**
ggacacaccatccccaaagcccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgccagcggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcgaacattactgtggaccaccaggctgttataaaagcggcgactccgttaccccgctgtgct
gttttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcgg**tc**atcatcccatcccattctccacagggggcgaattctcggtgtgtgacagtgcagcgtgtgggtggggataagacc
 accgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtggggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttga
 gaccaagtgcgggacccaatcccgttgacagcgggtgcccggggcattgactcaaaagcactggaaactcatattgtaccagact
 cacaccttgtcaagggcgtgaccatggatggcaagcaggetgctggcggtttatccgatagatacggcctgtgtgtgtgctc
 agcaggaaggctgtgagaagagccggcggtggcggctccggcggtggcggtccggcggtggcggtccGACAAAATC
 ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCTGTCGCCGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
 GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
 GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
 GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
 TGCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
 AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
 CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
 CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT

*GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTA*

SEQ ID NO: 28 (аминокислотная последовательность NGF-L3Fc10M7-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF*FLIGIQ*A***EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA**
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKR**SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ**
YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM**MDGKQAAWR****FIRIDT**
ACV**CVLSRKAVRRAGGGGSGGGGSGGGG****DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD**
TL**MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**FSCS**
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 29 (последовательность нуклеиновой кислоты 2-1-15M7; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttgtctacactctgatcacagctttctgatcgccatacagggc***gaaccacactcagagagcaatgtccctgca**
ggacacaccatccccaaagcccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgccagcggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcgaacattactgtggaccccaggctgttataaaagcggcgactccgttaccccgtgtgct
gttttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcgg**tc****atcatcccatcccattctccacagggggcgaagagtcgggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggttggggataagac**
caccgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttg
agaccaagtgcgggacccaatecccgttgacagcgggtgcccggggcattgactcaaaagcactggaactcatattgtaccacgac
tcacaccttgtcaaggectgacctggatggcaagcaggtgcctggcggtttatccggatagatacggcctgtgtgtgtgtgctc
agcaggaaggctgtgagaagagcc**GAGCCCAAATCTTGTGACAAA****ACTCACACATGCCACCGTG**
CCCAGCACCTCCAGTCGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCCTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACA**ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG**
GCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA

*ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCCCCGGGTA*

SEQ ID NO: 30 (аминокислотная последовательность 2-1-15M7; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF*FLIGQA*EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THR*SKR*SSSHPIFHRGEE*SVCD*SVSVWVGDKTTATDIK*GKEVMVLGEVNINNSVFK
QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM*DGKQA*AWRFIRID
TACVVCVLSRKA*VRRAEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD*LMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO: 31 (последовательность нуклеиновой кислоты NGF-4-12PAA; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttgttctacactctgatacacagctttctgateggcatacagggcgaaccacactcagagagcaatgtccctgca
ggacacaccatcccccaagcccactggactaaactcagattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgccagcggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcaacattactgtggacccaggctgttaaaaagcggcgactccgttccccgtgtgct
gttttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcggctcatcatcccatcccatcttccacaggggcgaattctcggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggtggggataagacc
accgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttga
gaccaagtgcgggacccaatcccggtgacagcgggtgccggggcattgactcaaagcactggaactcatattgtaccagact
cacacctttgcaagggcgtgaccatggatggcaagcaggtgcctggcggtttatccgatagatacggcctgtgtgtgtgctc
agcaggaaggctgtgagaagagccgagtc~~caaatatggtcecccatgcccacctgcccagcacctgaggtcggggggaccat
cagtcttctgttcccccaaaaacccaaggacactctcatgatctccggacccctgaggtcactgtcgtggtgggtgagcgtgagccag
gaagaccccgaggtccagttcaactggtagctggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttca
acagcagtaaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaaca
aaggcctcccgtctccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacccctgccccatec
caggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggtcttaccaccagcagatcgcctggagtggtggaaa
gcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgectcccgtgctggactccgacggctcttcttctctacagcaggctaaccgt
ggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcct
ctccctgtctctgggtaaa~~*

SEQ ID NO: 32 (аминокислотная последовательность NGF-4-12PAA; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE*EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
 AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
 THRSKRSSSHPIFHRGEFSVCDSSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ
 YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDT
 ACVCLSRKAVRRAESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQ
 KSLSLSLGK

SEQ ID NO: 33 (последовательность нуклеиновой кислоты 2-118-L3Fc10-M1-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgtgttctacactctgatcacagctttctgatcgccatacagggc*gaaccacactcagagagcaatgtccctgca
 ggacacaccatccccaaagcccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcggccccggcagcggc
 gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcaacattactgtggacccaggctgttaaaaagcggcgactccgtcaccccgtgtgct
 gtttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgggtgctgccccctcaacaggactcacagg
 agcaagcggtcacatcccacatcccattccacaggggcaagagtcgggtgtgacagtgtcagcgtgtgggttggggataagac
 caccgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttg
 agaccaagtgcgggacccaatcccgttgacagcgggtgcccggggcattgactcaagcactggaactcatattgtaccacgac
 tcacaccttgtcaaggegtgaccatggatggcaagcaggtgctggcggttatecggatagatacggcctgtgtgtgtgtgctc
 agcaggaaggctgtgagagggcgtggcggtccggcggtggcggtccggcggtggcggtccGACAAAACCTCACACA
 TGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC
 CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCTAGCACGTACCGTGT
 GGTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
 CAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
 GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 34 (аминокислотная последовательность 2-118-L3Fc10-M1-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE*EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
 AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR

THRSKRSSSHPIFHRGEESVCDSVSVVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK
 QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRID
 TACVCVLSRKAVRGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 35 (последовательность нуклеиновой кислоты 2-118-L3Fc10-M3-5;
 сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF
 (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут,
 модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

atgagcatgtgttctacactctgatacacagctttctgateggcatacagggcgaaccacactcagagagcaatgtccctgca
 ggacacaccatccccaaagccactggactaaactcagattcccttgacactgcccttcgagagcccgagcgccccggcagcgcc
 gatagctgcacgcgtggcgggcgagaccgcaacattactgtggacccaggctgttaaaaagcgcgactccgttccccgtgtgct
 gtttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcggtggtgctgccccctcaacaggactcacagg
 agcaagcggtcateatcccateccatcttccacagggcggaagagtcggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggttggggataagac
 caccgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttg
 agaccaagtgccgggacccaaatcccgttgacagcggtgcccggggcattgactcaagcactggaactcatattgtaccacgac
 tcacaccttgtcaaggectgaccatggatggcaagcaggtgctggcggtttatecggatagatacggcctgtgtgtgtgctc
 agcaggaaggctgtgagagccggtggcgctccggcggtggcgctccggcggtggcgctccgcacaaaactcacacatgccac
 cgtgccagcactgaagecgtgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggacccct
 gaggtcacatgcgtgggtggcagtgagccaggaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataat
 gccaaagacaaagccggggaggagcagtacaacagcagctaccgtgtggtcagctcctcaccgtcctgcaccaggactggctga
 atggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagcc
 ccgagaaccacaggtgtacacctgccccateccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaagget
 tctatcccagcgacatgcctggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccagcctcccgtgtggactcc
 gaggtccttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgatga
 ggetctgcacaaccactacagcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa

SEQ ID NO: 36 (аминокислотная последовательность 2-118-L3Fc10-M3-5;
 сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF
 (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут,
 модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF*LIGIQAE**EPH**SESNPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
 AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKRSSSHPIFHRGEESVCDSVSVVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK
 QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRID
 TACVCVLSRKAVRGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPEAAGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC

*LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO: 37 (последовательность нуклеиновой кислоты NGF-118-L3Fc10-M3-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttctacactctgatcacagctttctgacggcatacaggcggaaccacactcagagagcaatgtccctgca
ggacacaccatccccaaagcccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgcccgaggcaggc
gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcgaacattactgtggacccaggctgttataaaagcggcgactccgttcaccccggtgct
gtttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcggtggtgctgccccctcaacaggactcacagg
agcaagcggtcateatcccatccatcttccacagggggaattctcggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggtggggataagacc
accgccacagacatcaagggaaggaggtgatgggtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttga
gaccaagtccgggacccaaatccggttgacagcgggtgcccggggcattgactcaaaagcactggaactcatattgtaccagact
cacacetttgcaaggcgtgaccatggatggcaagcaggetgctggcggtttatccggatagatacggcctgtgtgtgtgctc
agcaggaaggctgtgagagccggtggcggctccggcggtggcggctccggcggtggcggtccggacaaaactcacacatgcccac
cgtgccagcacetgaagcgcgtgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccct
gaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccaagaagaccctgaggtaagttcaactggtagctggagcggcgtggaggtgcataat
gccaagacaaaagccggggaggagcagtacaacagcagctaccgtgtggtagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctga
atggcaaggagtacaagtcaaggctccaaacaaagccctccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagcc
ccgagaaccacaggtgtacacctgccccateccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaagget
tctatccagcagacatgcctggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactcc
gacggctccttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgatga
ggetctgcacaaccactacaagcagaagagcctctccctgccccgggtaaa*

SEQ ID NO: 38 (аминокислотная последовательность NGF-118-L3Fc10-M3-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGQAEPHSESNPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKRSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ
YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMGKQAAWRFIRIDT
ACVCLSRKAVRGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO: 39 (последовательность нуклеиновой кислоты 2-L3Fc10-M3-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

agaccaagtccgggacccaatcccgttgacagcgggtgccggggcattgactcaaagcactggaactcatattgtaccacgac
 tcacaccttgtcaaggegetgaccatggatggcaagcaggetgctggcggtttatccggatagatacggcctgtgtgtgtgctc
 agcaggaaggctgtgagagggcgtggcgctccggcggtggcggtccggcggtggcggtcc*GACAAA*ACTCACACA
 TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGAGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
 GGTGAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
 CAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAAGCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG
 GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 42 (аминокислотная последовательность 2-118-L3Fc10-M5-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAF****LIGIQ***AEPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA
 AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKRRLRSRVLVSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKRSSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK
 QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFRID
 TACVCLSRKAVRGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPEAEGAPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 43 (последовательность нуклеиновой кислоты 2-118-L3Fc10M7-5; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

*atgagcatgttctacactctgatcacagctttctgateggcatacaggcg*gaaccacactcagagagcaatgtccctgca
 ggacacaccatccccaaagccactggactaaactcagcattcccttgacactgcccttcgagagcccgcagcgcgccggcagcggc
 gatagctgcacgcgtggcggggcagaccgcaacattactgtggacccaggctgtttaaagcggcgactccgttcacccgtgtgct
 gtttagcaccagcctccccgtgaagctgcagacactcaggatctggacttcgaggtcgtggtgctgccccctcaacaggactcacagg
 agcaagcggctcatcatcccatccatcttccacagggggaagagtcggtgtgtgacagtgtcagcgtgtgggtggggataagac
 caccgccacagacatcaagggcaaggaggtgatgggtgtgggagaggtgaacattaacaacagtgtattcaaacagtactttttg
 agaccaagtccgggacccaatcccgttgacagcgggtgccggggcattgactcaaagcactggaactcatattgtaccacgac
 tcacaccttgtcaaggegetgaccatggatggcaagcaggetgctggcggtttatccggatagatacggcctgtgtgtgtgctc

*gtcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctggtgggacgtgagccaggaagacc
cgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgagggtgcataatgccaagacaagccgcgaggagcagttcaacagcacgt
accgtgtggtcagctctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaagggtctccaacaaggcctcc
cgctctccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggagga
gatgaccaagaaccagggtcagcctgaactgctggtcaaaaggtcttaccaccagcagctgcccgtggagtggaagcaatgggc
agccggagaaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctctcttctctacagcaggctaacctgggacaaga
gcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtct
ctgggtaaa*

SEQ ID NO: 46 (аминокислотная последовательность 2-118-L3G4-BM; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE***EPHSES***NVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA*
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRRLSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THR**SKR****SSSHPIFHRGEESV****CDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK**
QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM**DGKQA****AWRFIRID**
TACVCVLSRKA**VRGGGGGGSGGGGSA****ESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFP**
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 47 (мутантный human preproNGF, 239aa; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE***EPHSES***NVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA*
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRRLSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THR**SKR****SSSHPIFHRGEESV****CDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK**
QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM**DGKQA****AWRFIRID**
TACVCVLSRKA**VR**

SEQ ID NO: 48 (мутантный human preproNGF, 241aa; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE***EPHSES***NVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA*
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRRLSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THR**SKR****SSSHPIFHRGEESV****CDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFK**
QYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM**DGKQA****AWRFIRID**
TACVCVLSRKA**VRRA**

SEQ ID NO: 49 (человеческий preproNGF дикого типа, 239aa; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE***EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA**
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKR**SSSHPIFHRG****EFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ**
YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAARWFIRIDT
ACVCVLSRKAVR

SEQ ID NO: 50 (человеческий preproNGF дикого типа, 241aa; сигнальный пептид выделен курсивом, пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом)

*MSMLFYTLITAFLLIGIQAE***EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPA**
AAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNR
THRSKR**SSSHPIFHRG****EFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQ**
YFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAARWFIRIDT
ACVCVLSRKAVRRA

SEQ ID NO: 51 (мутантный proNGF человека, 221aa; пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом)

EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAIAARVAGQTRNITV
DPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKR**SSSHPIFHRG**
E**E****SVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDS**
GCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAARWFIRIDTACVCVLSRKAVR

SEQ ID NO: 52 (мутантный proNGF человека, 223aa; пропептид выделен рамкой, β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом)

EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAIAARVAGQTRNITV
DPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKR**SSSHPIFHRG**
E**E****SVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDS**
GCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAARWFIRIDTACVCVLSRKAVRRA

SEQ ID NO: 53 (человеческий proNGF дикого типа, 221aa; пропептид выделен рамкой, β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом)

EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAIAARVAGQTRNITV
DPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKR**SSSHPIFHRG**
EFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDS
GCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAARWFIRIDTACVCVLSRKAVR

SEQ ID NO: 54 (человеческий proNGF дикого типа, 223aa; пропептид выделен рамкой, β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом)

EPHSESNVPAGHTIPQAHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAIAARVAGQTRNITV
DPRLFKKRRLRSPRVLFSTQPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKR**SSSHPIFHRG**
EFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQYFFETKCRDPNPVDS
GCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAARWFIRIDTACVCVLSRKAVRRA

SEQ ID NO: 55 (аминокислотная последовательность зрелого FD-G4Fc; β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
 VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56 (аминокислотная последовательность зрелого WM-G24Fc; β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG2/4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRKTGGGSGGGGSVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFI
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 57 (аминокислотная последовательность зрелого NGF-1-15M7; β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRRRAEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 58 (аминокислотная последовательность зрелого NGF-L3Fc10M7-5; β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRRAGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 59 (аминокислотная последовательность зрелого 2-1-15M7; β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRRAEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 60 (аминокислотная последовательность зрелого NGF-4-12PAA; β -NGF (120aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRRAESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSLGK

SEQ ID NO: 61 (аминокислотная последовательность зрелого 2-118-L3Fc10-M1-5; β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 62 (аминокислотная последовательность зрелого 2-118-L3Fc10-M3-5; β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKAVRGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 63 (аминокислотная последовательность зрелого NGF-118-L3Fc10-M3-5; β -NGF (118aa дикого типа) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKA \underline{VRR} GGGGSGGGGSGGGGSDKTH \underline{T} CP \underline{P} CAPEAAGG \underline{P} SVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI \underline{E} KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 64 (аминокислотная последовательность зрелого 2-L3Fc10-M3-5; β -NGF (мутантный 120aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKA \underline{VRR} AGGGGSGGGGSGGGGSDKTH \underline{T} CP \underline{P} CAPEAAGG \underline{P} SVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI \underline{E} KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 65 (аминокислотная последовательность зрелого 2-118-L3Fc10-M5-5; β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKA \underline{VRR} GGGGSGGGGSGGGGSDKTH \underline{T} CP \underline{P} CAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSI \underline{E} KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 66 (аминокислотная последовательность зрелого 2-118-L3Fc10M7-5; β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный Fc IgG1 выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEESVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTM \underline{D} GKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKA \underline{VRR} GGGGSGGGGSGGGGSDKTH \underline{T} CP \underline{P} APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI \underline{E} KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 67 (аминокислотная последовательность зрелого 2-118-L3G4-BM; β -NGF (мутантный 118aa) выделен жирным шрифтом, линкер подчеркнут, модифицированный IgG4 Fc выделен курсивом и жирным шрифтом)

SSSHPIFHRGEEVCDVSVVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNINNSVFKQY
 FFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTA
 CVCVLSRKA^UVRGGGGGGSGGGGSAESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 68 (линкер)

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 69 (линкер)

GGGGGGSGGGGSGGGGSA

SEQ ID NO: 70 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GGGG)_n

SEQ ID NO: 71 (линкер)

GSGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 72 (линкер)

KTGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 73 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (G)_n

SEQ ID NO: 74 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GS)_n

SEQ ID NO: 75 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GGS)_n

SEQ ID NO: 76 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GGGS)_n

SEQ ID NO: 77 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GGS)_n(GGGS)_n

SEQ ID NO: 78 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GSGGS)_n

SEQ ID NO: 79 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)
 (GGSGS)_n

SEQ ID NO: 80 (линкер)

GSGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 81 (линкер)

GGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 82 (линкер)

GGGSGGSGGS

SEQ ID NO: 83 (линкер)

GGSGGSGGSGGSGGG

SEQ ID NO: 84 (линкер)

GGSGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 85 (линкер)

GGSGGSGGSGGSGGSGGS

SEQ ID NO: 86 (линкер)

GG

SEQ ID NO: 87 (линкер)

GGSG

SEQ ID NO: 88 (линкер)

GGSGG

SEQ ID NO: 89 (линкер)

GSGSG

SEQ ID NO: 90 (линкер)

GSGGG

SEQ ID NO: 91 (линкер)

GGGSG

SEQ ID NO: 92 (линкер)

GSSSG

SEQ ID NO: 93 (линкер)

GGSGGS

SEQ ID NO: 94 (линкер)

SGGGGS

SEQ ID NO: 95 (линкер)

GGGGS

SEQ ID NO: 96 (линкер; n обозначает целое число, равное по меньшей мере 1)

$(GA)_n$

SEQ ID NO: 97 (линкер)

GRAGGGGAGGGG

SEQ ID NO: 98 (линкер)

GRAGGG

SEQ ID NO: 99 (линкер)

ASTKGP

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид фактора роста нервов длительного действия (NGF), содержащий от N-конца до C-конца фрагмент NGF и фрагмент Fc, где фрагмент NGF содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-3, и где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1 или Fc IgG4.
2. Полипептид NGF длительного действия по п.1, где фрагмент NGF соединяется с Fc-фрагментом с помощью пептидного линкера.
3. Полипептид NGF длительного действия по п.2, где пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 68-72.
4. Полипептид NGF длительного действия по п.2 или 3, где пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 70), и где n обозначает любое из 1, 2, 3, 4, 5 или 6.
5. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.1-4, где фрагмент Fc является производным от Fc IgG1, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8.
6. Полипептид NGF длительного действия по п.5, где фрагмент Fc содержит мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких E233, L234, L235, G236, G237, N297, A327, A330 и P331, относящиеся к SEQ ID NO: 8.
7. Полипептид NGF длительного действия по п.5 или 6, где фрагмент Fc содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких E233P, L234V, L234A, L235A, L235E, G236del, G237A, N297A, A327G, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8.
8. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.5-7, где во фрагменте Fc также отсутствуют первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 7 или 8.
9. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.5-8, где фрагмент Fc содержит мутации L234A, L235A и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8.
10. Полипептид NGF длительного действия по п.9, где фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 12.
11. Полипептид NGF длительного действия по п.9, где полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-64.
12. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.5-8, где фрагмент Fc содержит мутации E233P, L234V, L235A, G236del, A327G, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8.
13. Полипептид NGF длительного действия по п.12, где фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 16.
14. Полипептид NGF длительного действия по п.13, где полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.
15. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.5-8, где фрагмент Fc содержит мутации L234A, L235E, G237A, A330S и P331S, относящиеся к SEQ ID NO: 8.
16. Полипептид NGF длительного действия по п.15, где фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14.

17. Полипептид NGF длительного действия по п.16, где полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

18. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.5-8, где фрагмент Fc содержит мутацию N297A, относящуюся к SEQ ID NO: 8.

19. Полипептид NGF длительного действия по п.18, где фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 10.

20. Полипептид NGF длительного действия по п.19, где полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

21. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.1-4, где фрагмент Fc является производным от Fc IgG4, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

22. Полипептид NGF длительного действия по п.21, где фрагмент Fc содержит мутацию в положении, выбранном из одного или нескольких S228, F234 и L235, относящихся к SEQ ID NO: 17.

23. Полипептид NGF длительного действия по п.21 или 22, где фрагмент Fc содержит мутацию, выбранную из одной или нескольких S228P, F234A и L235A, относящиеся к SEQ ID NO: 17.

24. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.21-23, где фрагмент Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

25. Полипептид NGF длительного действия по п.24, где полипептид NGF длительного действия содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

26. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.1-25, где полипептид NGF длительного действия имеет период полувыведения по меньшей мере около 10 часов при введении человеку внутривенно, внутримышечно, внутриглазно или подкожно.

27. Полипептид NGF длительного действия по любому из пп.1-26, где полипептид NGF длительного действия вызывает меньшую боль по сравнению с полипептидом NGF, содержащим фрагмент NGF с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 или 4.

28. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид NGF длительного действия по любому из пп.1-27.

29. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.28.

30. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.29.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид NGF длительного действия по любому из пп.1-27, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

32. Способ лечения у индивидуума заболевания, связанного с NGF, включающий введение индивидууму эффективного количества фармацевтической композиции по п.31.

33. Способ по п.32, где заболевание, связанное с NGF, представляет собой неврологическое заболевание.

34. Способ по п.33, отличающийся тем, что неврологическое заболевание выбрано из группы, включающей: неонатальную гипоксически-ишемическую энцефалопатию,

детский церебральный паралич, критическую миопатию, нервную глухоту, рецидивирующее повреждение гортанного нерва, черепно-мозговую травму, повреждение зубного нерва, мозговой инсульт, синдром Дауна, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, спинальную мышечную атрофию, диффузное поражение головного мозга, дисплазию тимуса, ушиб зрительного нерва, фолликулярную дисплазию, повреждение спинного мозга, глаукому, нейротрофический кератит, поражение зрительного нерва, оптикомиелит, сопутствующие заболевания сетчатки, недержание мочи, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, деменцию, гипертоническое внутримозговое кровоизлияние, неврологическую дисфункцию, заболевание мелких сосудов головного мозга, острый ишемический инсульт, эндотелиальную дистрофию роговицы, диабетическую невропатию, диабетическую язву стопы, нейрогенную язву кожи, пролежни, нейротрофическую язву роговицы, диабетическую язву роговицы и макулярное отверстие.

35. Способ по п.33 или 34, где неврологическое заболевание представляет собой диабетическую невропатию, болезнь Альцгеймера или нейротрофический кератит.

36. Способ по п.32, где заболевание, связанное с NGF, представляет собой не неврологическое заболевание.

37. Способ по п.36, где не неврологическое заболевание выбрано из группы, включающей: атрофию селезенки, ушиб селезенки, снижение овариального резерва, преждевременную недостаточность яичников, синдром гиперстимуляции яичников, остаточный синдром яичников, фолликулярную дисплазию яичников, нарушение сперматогенеза, такое как олигозооспермия, астеноспермия и олигоастеноспермия, ишемическую язву, стрессовую язву, ревматоидную язву, фиброз печени, язву роговицы, ожоги, язву полости рта и венозные язвы ног.

38. Способ по п.36 или 37, где не неврологического заболевания представляет собой преждевременную недостаточность яичников или нарушение сперматогенеза.

39. Способ по любому из пп.32-38, где фармацевтическую композицию вводят в дозе от около 0,01 мкг до около 1000 мкг на индивидуума.

40. Способ по любому из пп.32-39, где фармацевтическую композицию вводят с частотой приема примерно один раз в неделю или примерно один раз в месяц.

41. Способ по любому из пп.32-40, где фармацевтическую композицию вводят перорально, подкожно, внутривенно, интрацеребрально, интраназально, чрескожно, внутрибрюшинно, внутримышечно, внутрилегочно, вагинально, ректально, внутриглазно или местно.

По доверенности

ФИГ. 1А

IGHG1*05_wt EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 60

IGHG1*03_wt EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 60

IGHG1*05_wt NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

IGHG1*03_wt NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

(SEQ ID NO: 7)

ФИГ. 1В

M1-5 -----DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 55

IGHG1*03_wt EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 60

M1-5 NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 115

IGHG1*03_wt NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

(SEQ ID NO: 10)

ФИГ. 1С

M3-5 -----DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 55

IGHG1*03_wt EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 60

M3-5 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKT 115

IGHG1*03_wt NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKT 120

(SEQ ID NO: 12)

ФИГ. 1D

(SEQ ID NO: 8)

M5-5 -----DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 55

IGHG1*03_wt EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 60

M5-5 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKT 115

IGHG1*03_wt NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKT 120

(SEQ ID NO: 14)

(SEQ ID NO: 8)

ФИГ. 1Е

IGHG1*03_wt EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF 60

M7 EPKSCDKTHTCPPCPA~~PVA~~-GPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF 59

IGHG1*03_wt N~~W~~YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

M7 N~~W~~YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 119

IGHG1*03_wt ISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~P 180

M7 ISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~P 179 (SEQ ID NO: 8)

ФИГ. 1F

(SEQ ID NO: 15)

IGHG4_wt ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWY 60

IGHG1*03_wt PVLDSG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 232

Модифицированный_G4 ESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD~~TL~~MISRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWY 60

M7 PVLDSG~~S~~FFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 231

*****.***** *****

IGHG4_wt VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK 120

Модифицированный_G4 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK 120

(SEQ ID NO: 17)

(SEQ ID NO: 18)

IGHG4_wt AKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~PPVL 180

Модифицированный_G4 AKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TT~~PPVL 180

IGHG4_wt DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229

Модифицированный_G4 DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229

*****3*****

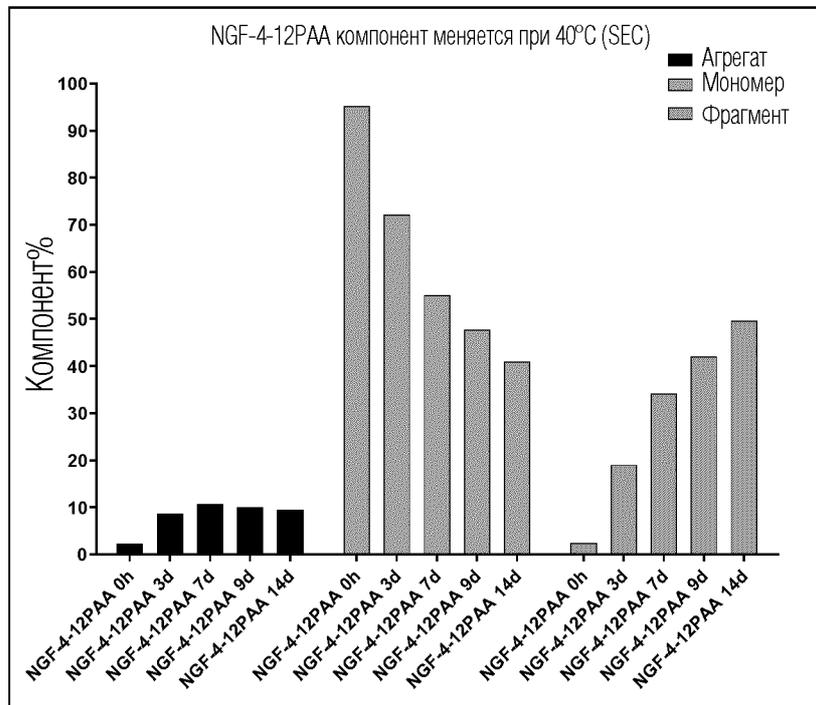
4/22

Сайт расщепления фурином



ФИГ. 2

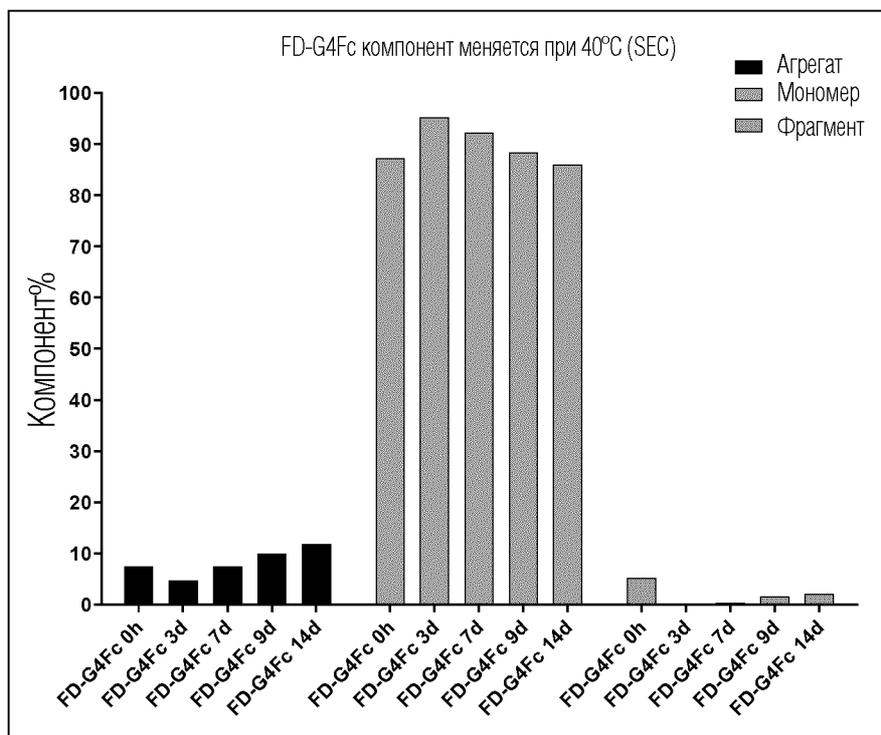
NGF-4-12PAA	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	2.38	8.7	10.73	10.11	9.45
Мономер %	95.18	72.21	55.08	47.79	40.96
Фрагмент %	2.44	19.09	34.19	42.1	49.59



ФИГ. 3А

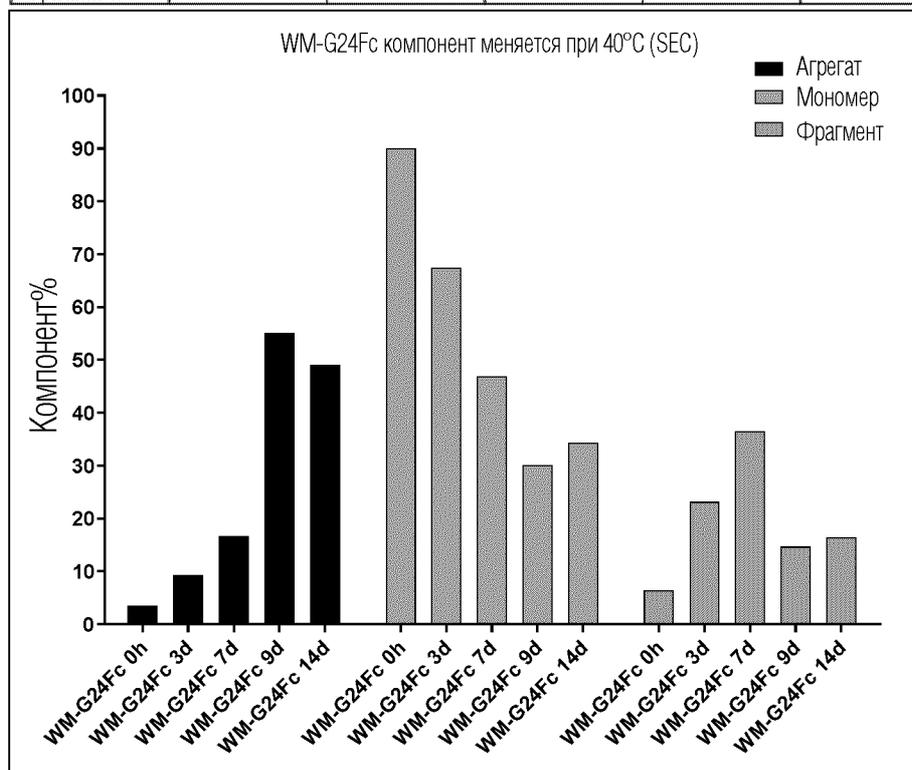
5/22

FD-G4Fc	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	7.48	4.76	7.42	9.94	11.86
Мономер %	87.29	95.23	92.21	88.46	86.05
Фрагмент %	5.23	0	0.37	1.6	2.1



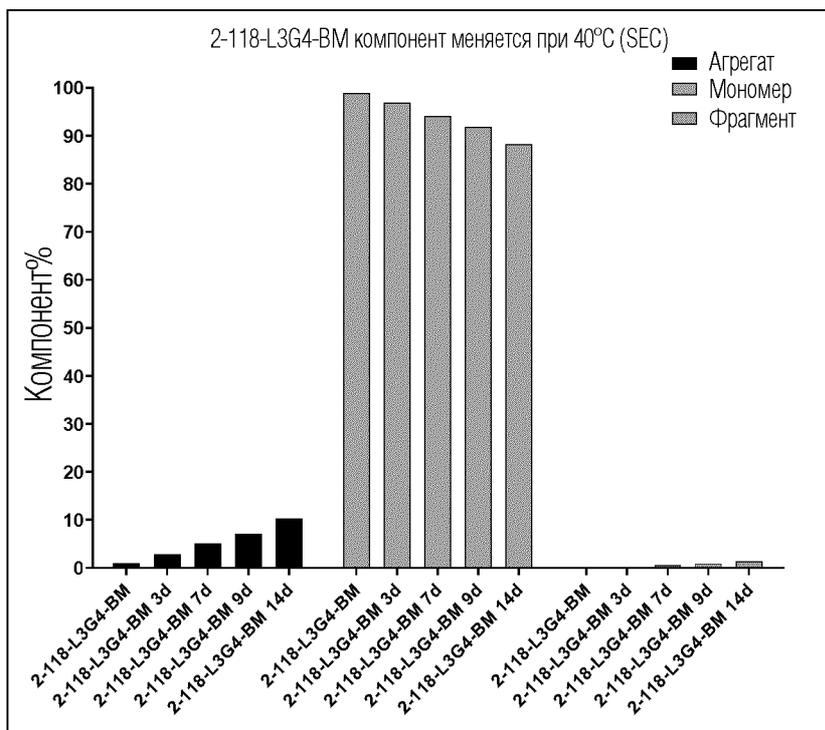
ФИГ. 3В

WM-G24Fc	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	3.55	9.37	16.64	55.16	49.15
Мономер %	90.04	67.46	46.89	30.11	34.36
Фрагмент %	6.41	23.18	36.48	14.73	16.48



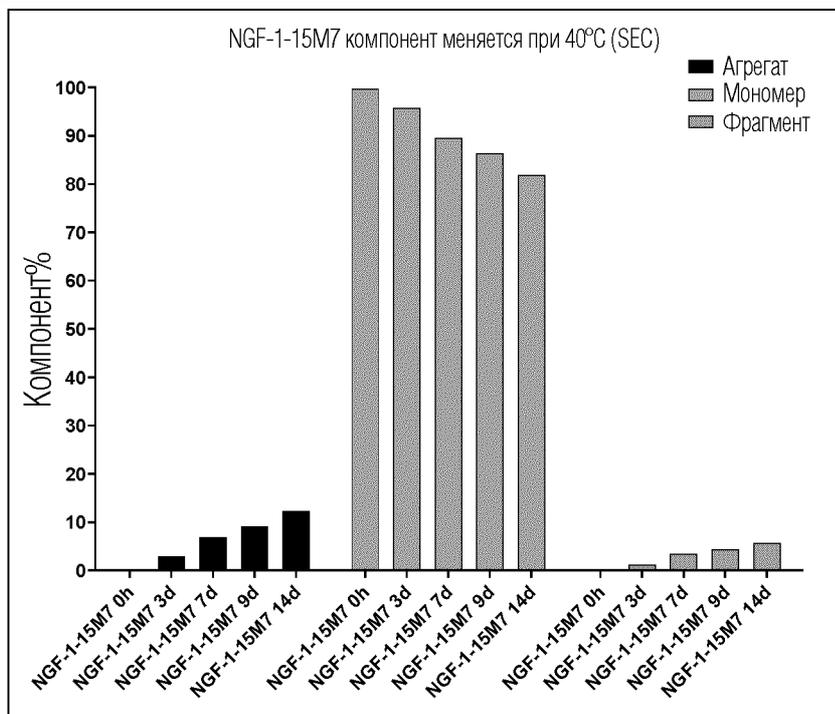
ФИГ. 3С

2-118-L3G4-BM	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.08	2.89	5.14	7.16	10.32
Мономер %	98.93	96.95	94.19	91.89	88.29
Фрагмент %	0	0.16	0.67	0.94	1.39



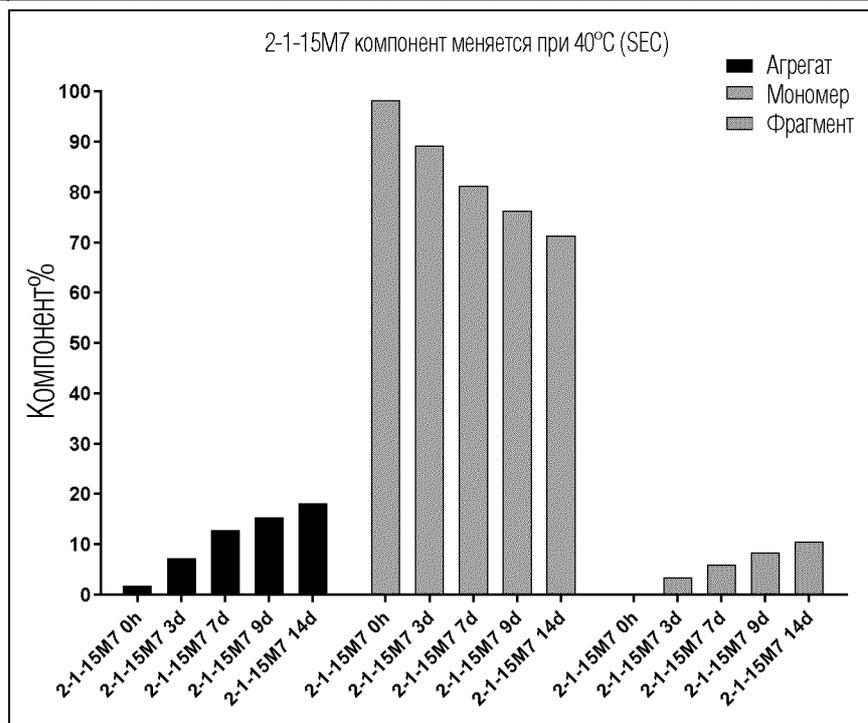
ФИГ. 3Д

NGF-1-15M7	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	0.22	2.95	6.97	9.13	12.34
Мономер %	99.78	95.8	89.59	86.44	81.94
Фрагмент %	0	1.25	3.43	4.42	5.71



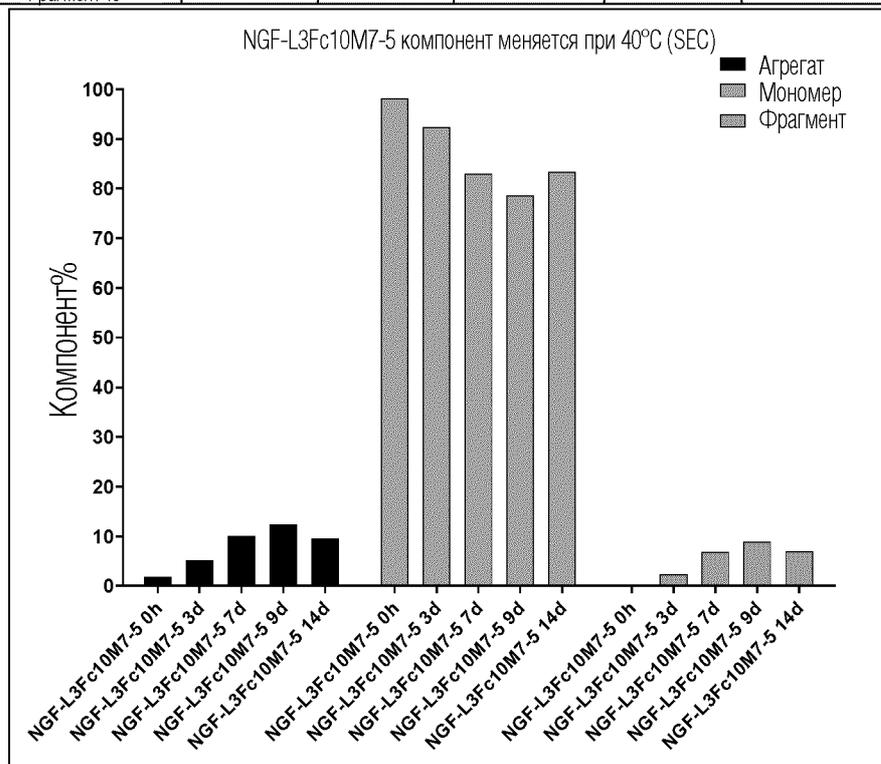
ФИГ. 3Е

2-1-15M7	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.81	7.28	12.76	15.39	18.2
Мономер %	98.19	89.22	81.27	76.21	71.33
Фрагмент %	0	3.5	5.98	8.41	10.47



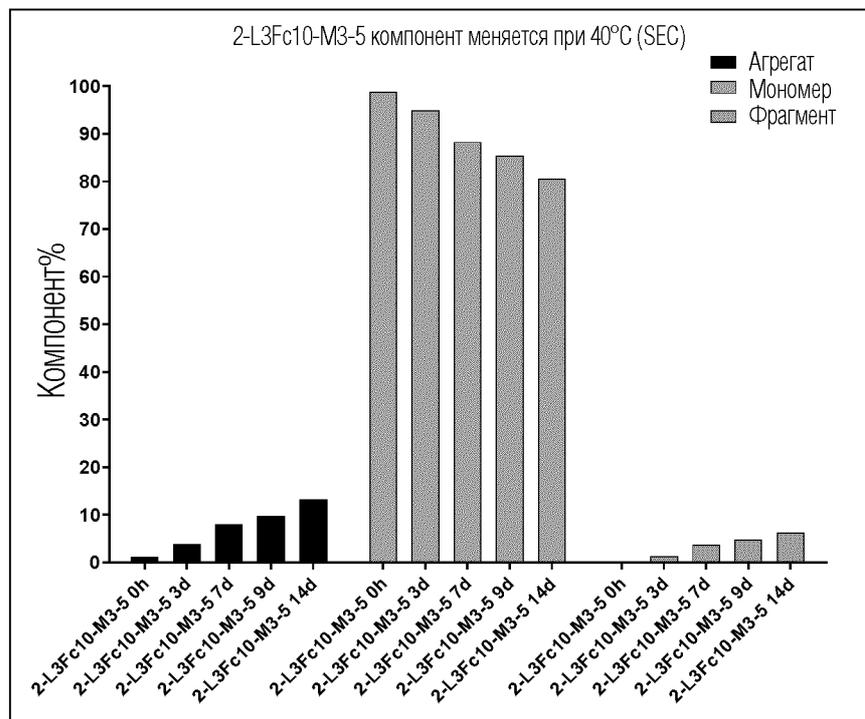
ФИГ. 3F

NGF-L3Fc10M7-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.87	5.26	10.15	12.46	9.61
Мономер %	98.14	92.38	82.99	78.6	83.38
Фрагмент %	0	2.36	6.86	8.94	7.02



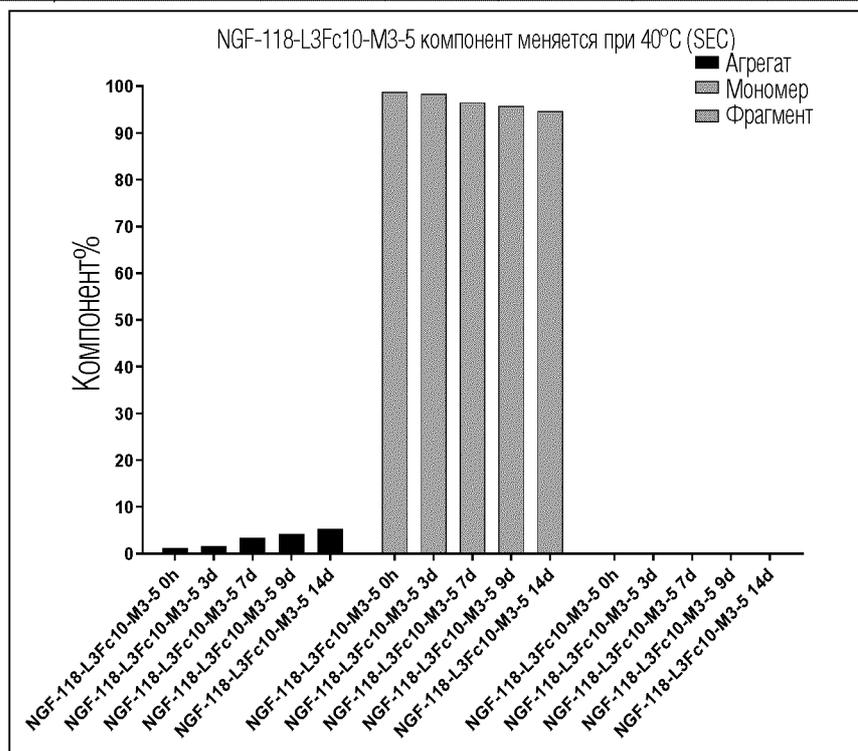
ФИГ. 3G

2-L3Fc10-M3-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.22	3.85	8.05	9.78	13.23
Мономер %	98.78	94.91	88.3	85.44	80.54
Фрагмент %	0	1.24	3.65	4.78	6.23



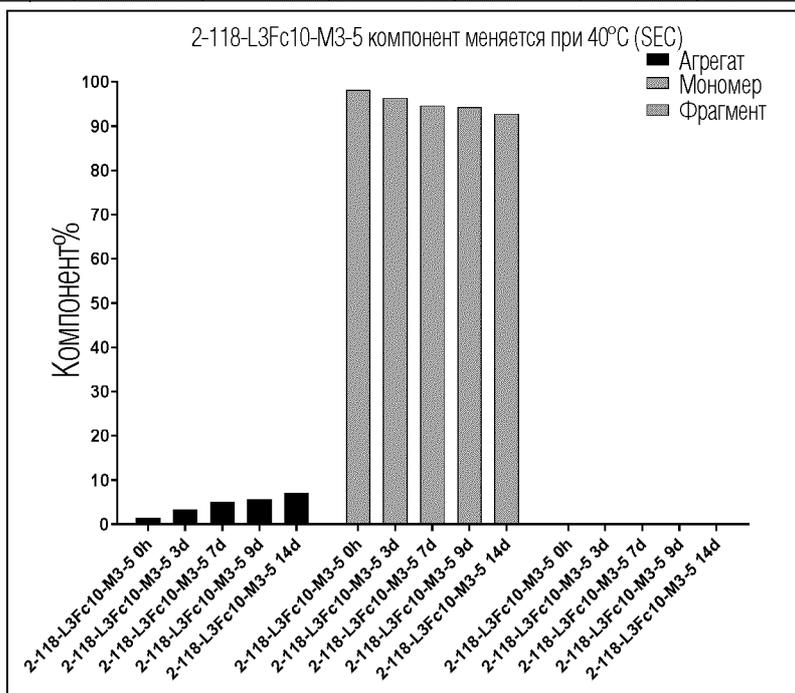
ФИГ. 3H

NGF-118-L3Fc10-M3-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.19	1.65	3.46	4.21	5.31
Мономер %	98.81	98.35	96.54	95.79	94.68
Фрагмент %	0	0	0	0	0



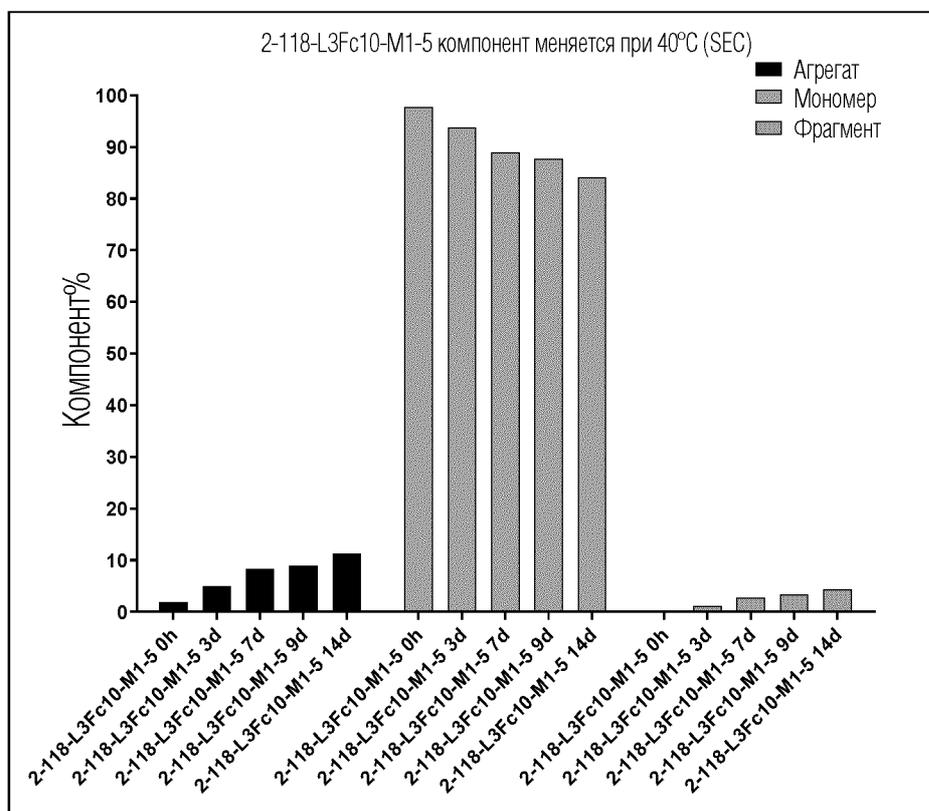
ФИГ. 3I

2-118-L3Fc10-M3-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.5	3.34	5.15	5.66	7.18
Мономер %	98.23	96.43	94.67	94.34	92.81
Фрагмент %	0.27	0.23	0.18	0	0



ФИГ. 3J

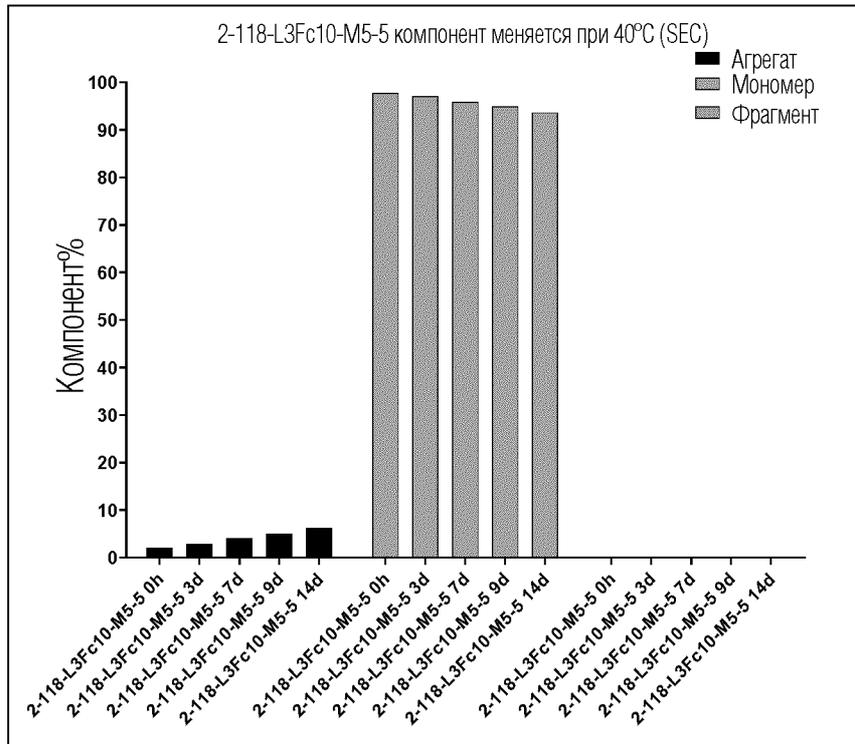
2-118-L3Fc10-M1-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	1.87	5.01	8.34	8.91	11.38
Мономер %	97.75	93.86	88.94	87.71	84.19
Фрагмент %	0.38	1.13	2.72	3.38	4.43



ФИГ. 3K

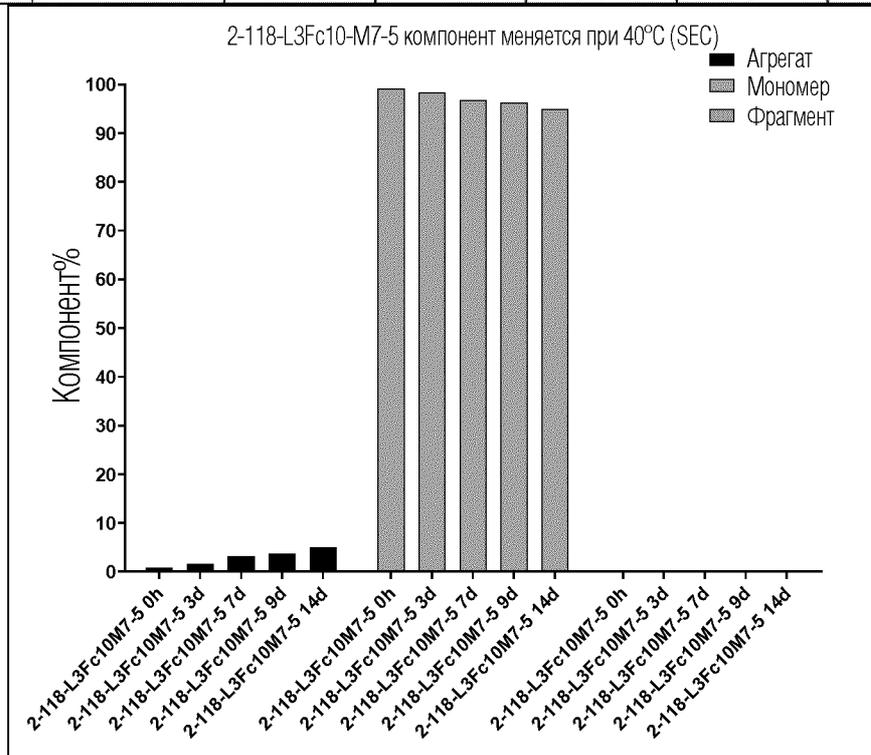
10/22

2-118-L3Fc10-M5-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	2.15	2.89	4.12	5.02	6.29
Мономер %	97.86	97.11	95.87	94.98	93.71
Фрагмент %	0	0	0	0	0



ФИГ. 3Л

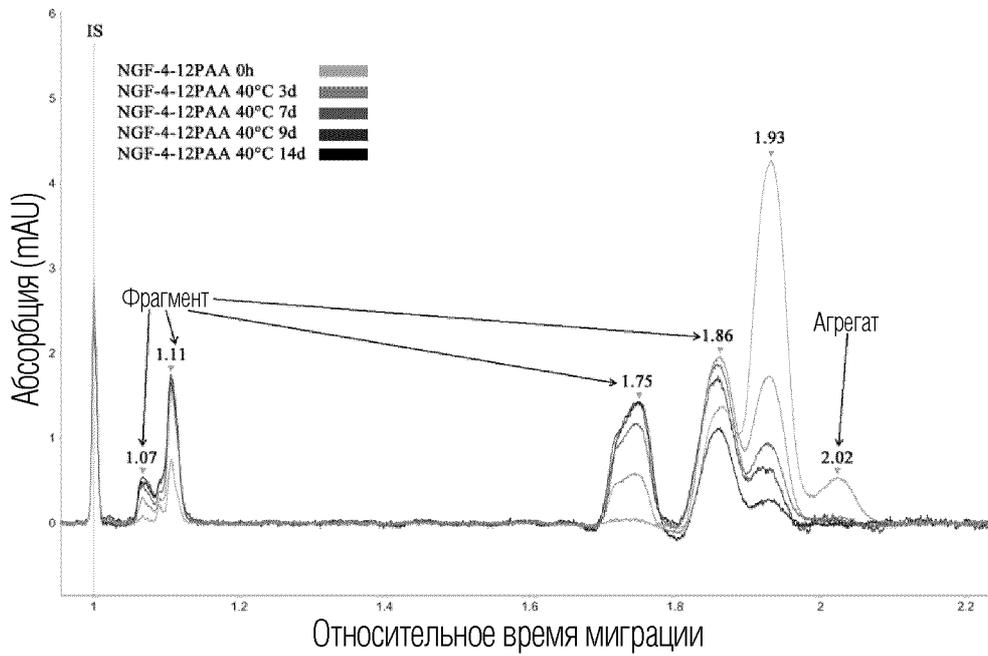
2-118-L3Fc10M7-5	0h	3d	7d	9d	14d
Агрегат %	0.84	1.57	3.25	3.76	5.04
Мономер %	99.16	98.43	96.75	96.25	94.96
Фрагмент %	0	0	0	0	0



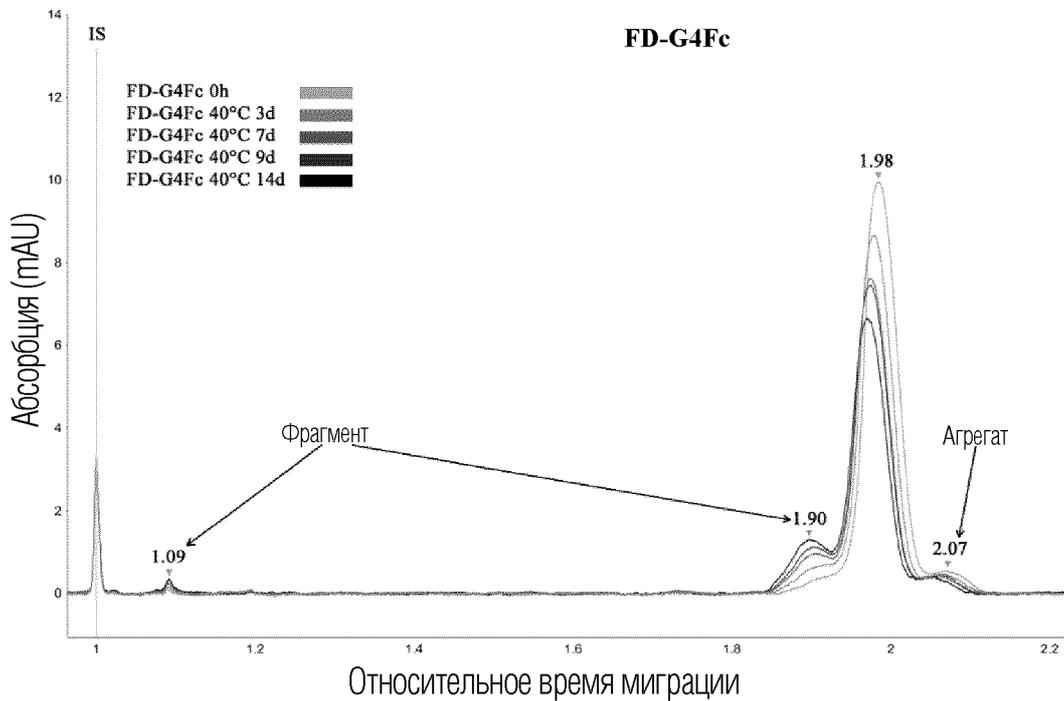
ФИГ. 3М

11/22

NGF-4-12PAA

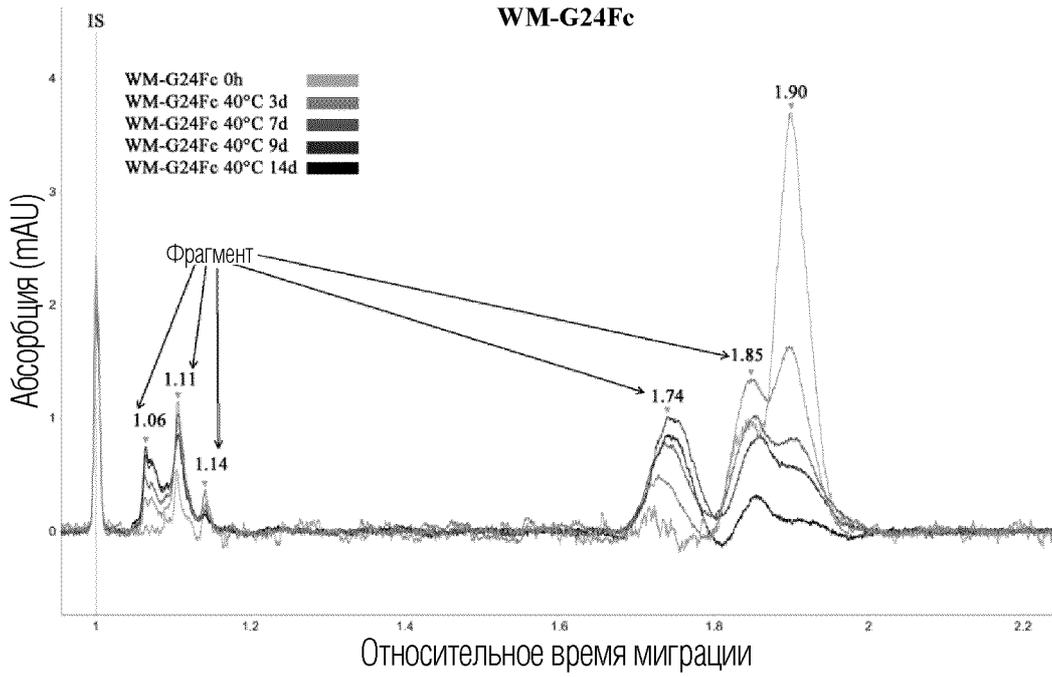


ФИГ. 4А

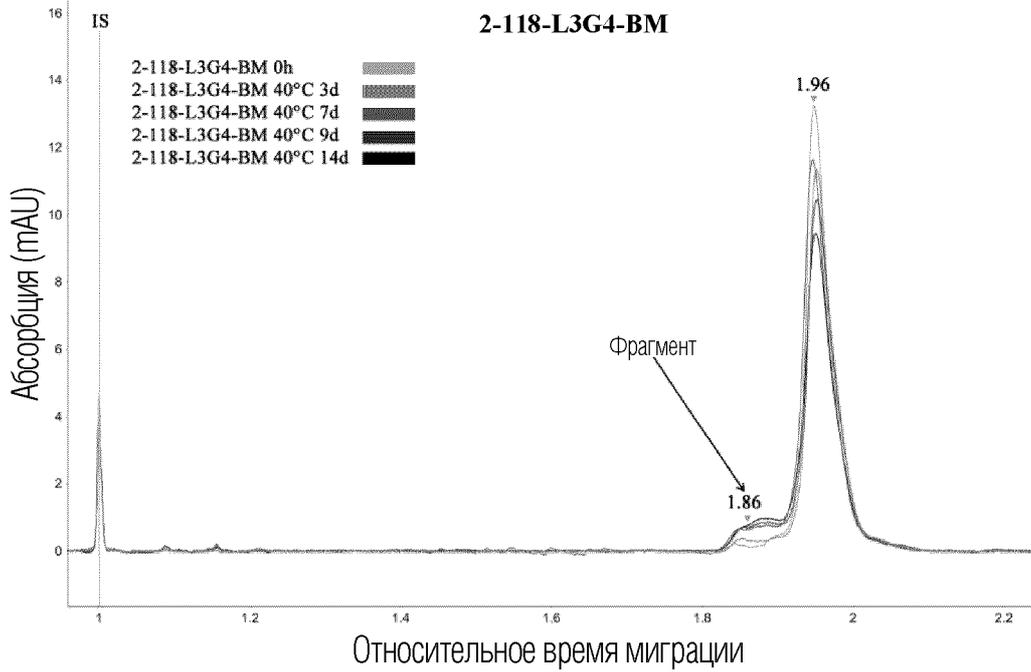


ФИГ. 4В

12/22



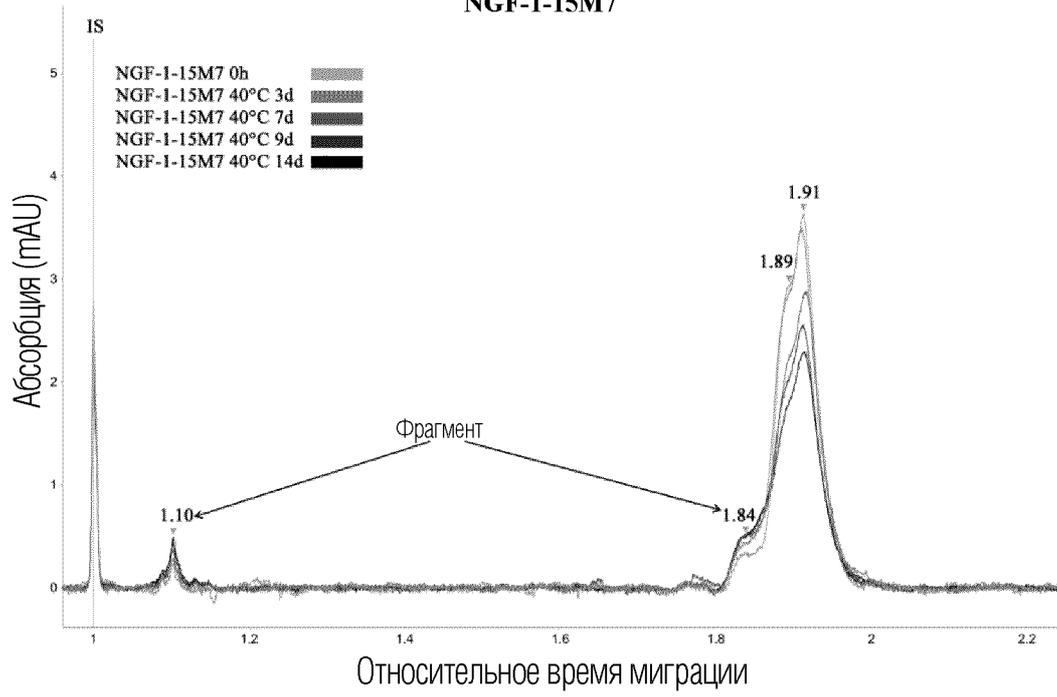
ФИГ. 4С



ФИГ. 4D

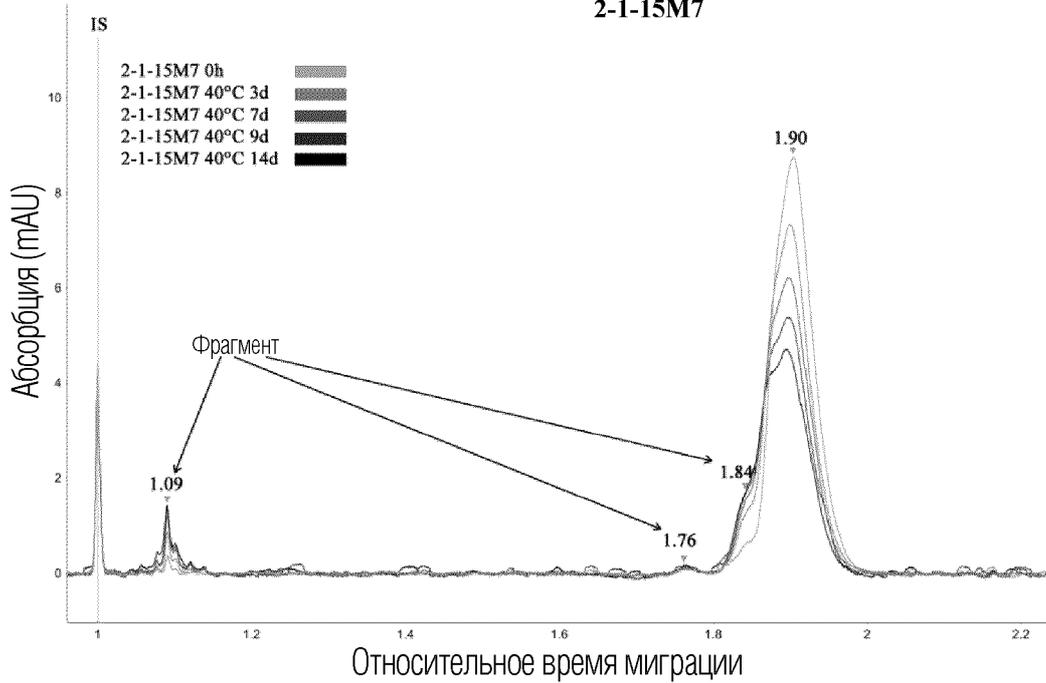
13/22

NGF-1-15M7



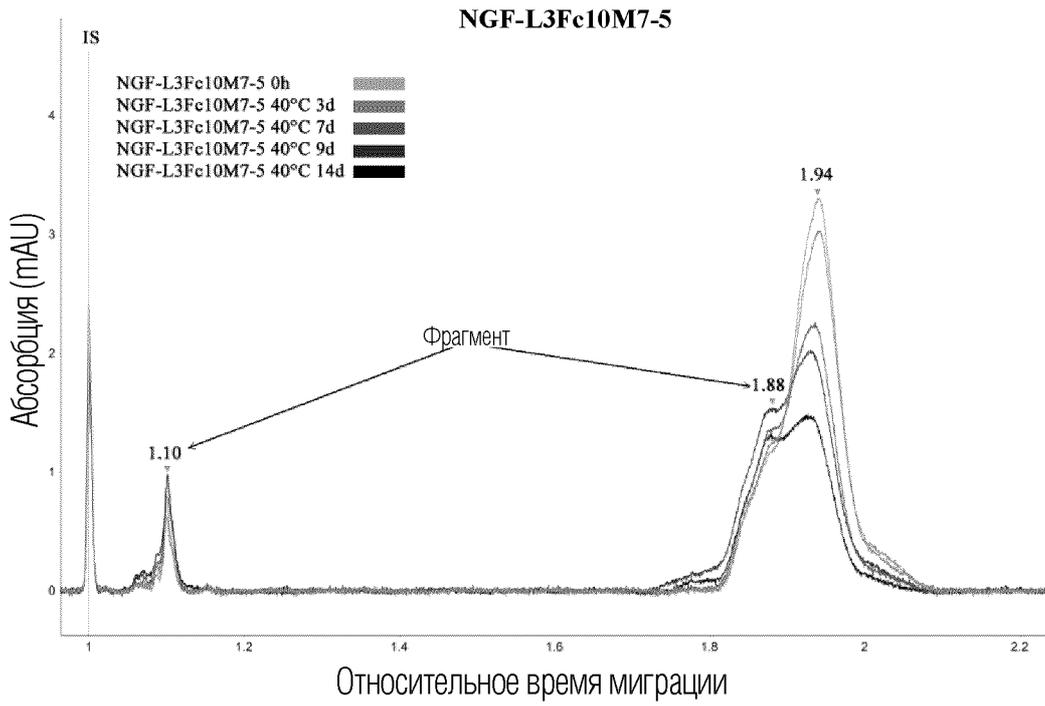
ФИГ. 4Е

2-1-15M7

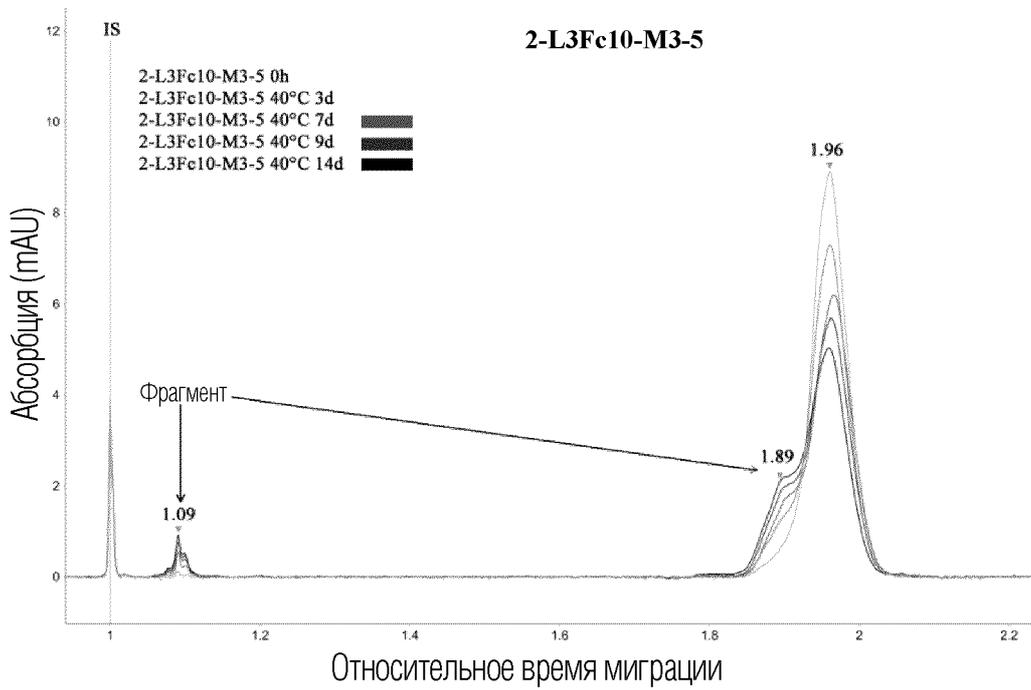


ФИГ. 4F

14/22

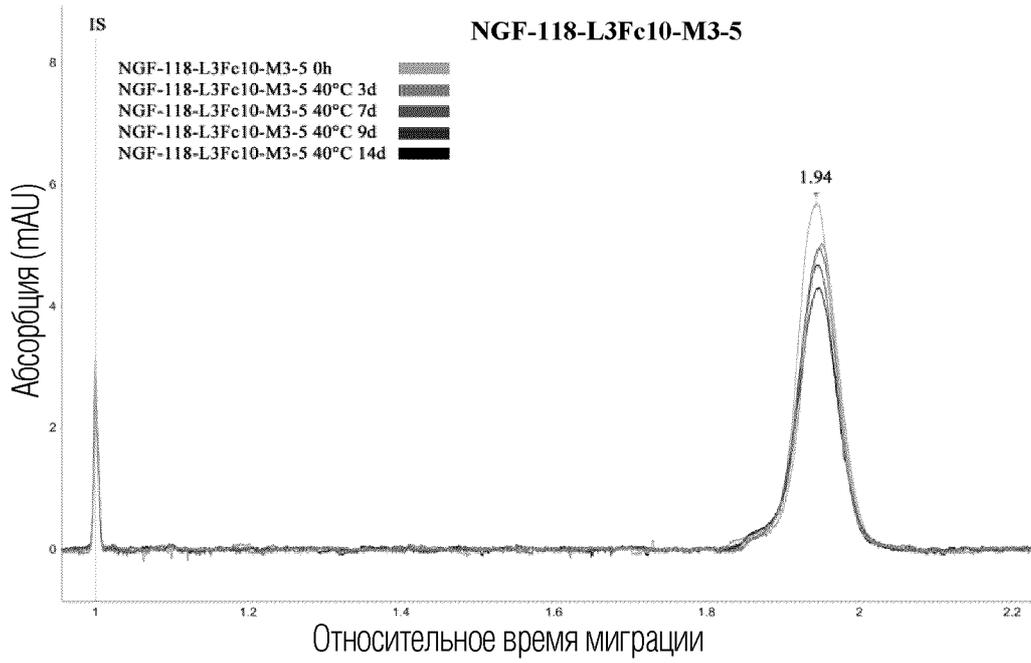


ФИГ. 4G

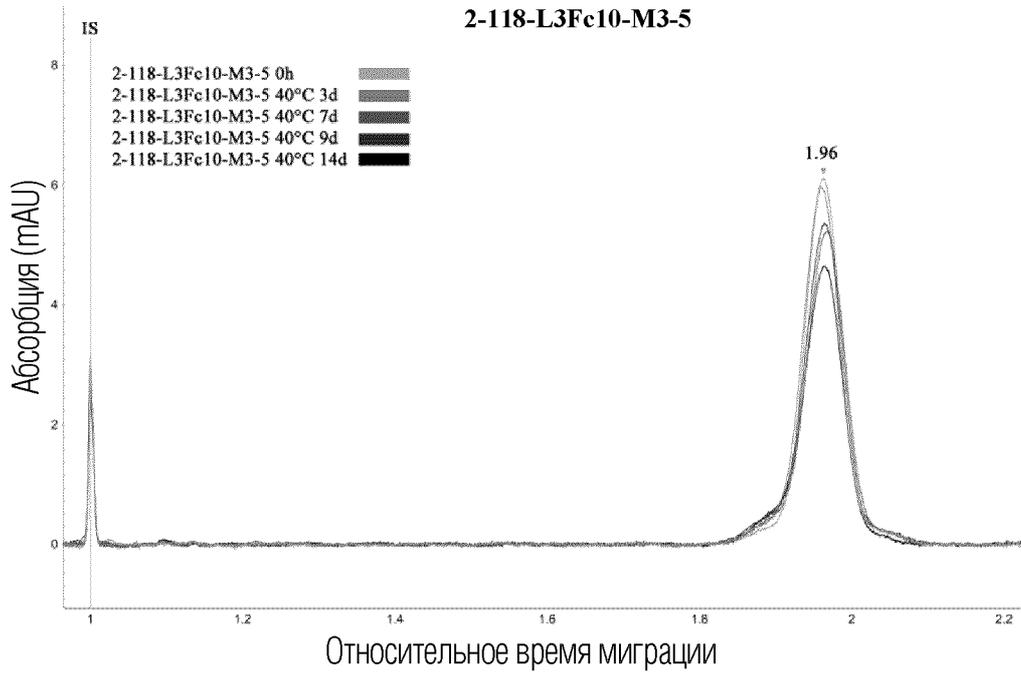


ФИГ. 4H

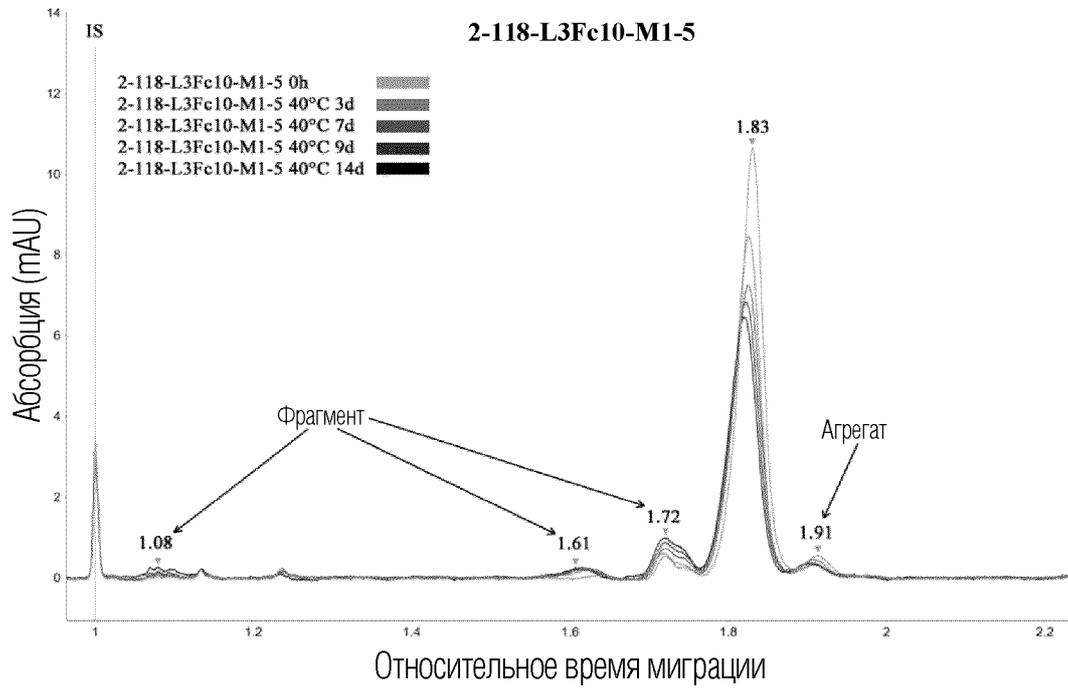
15/22



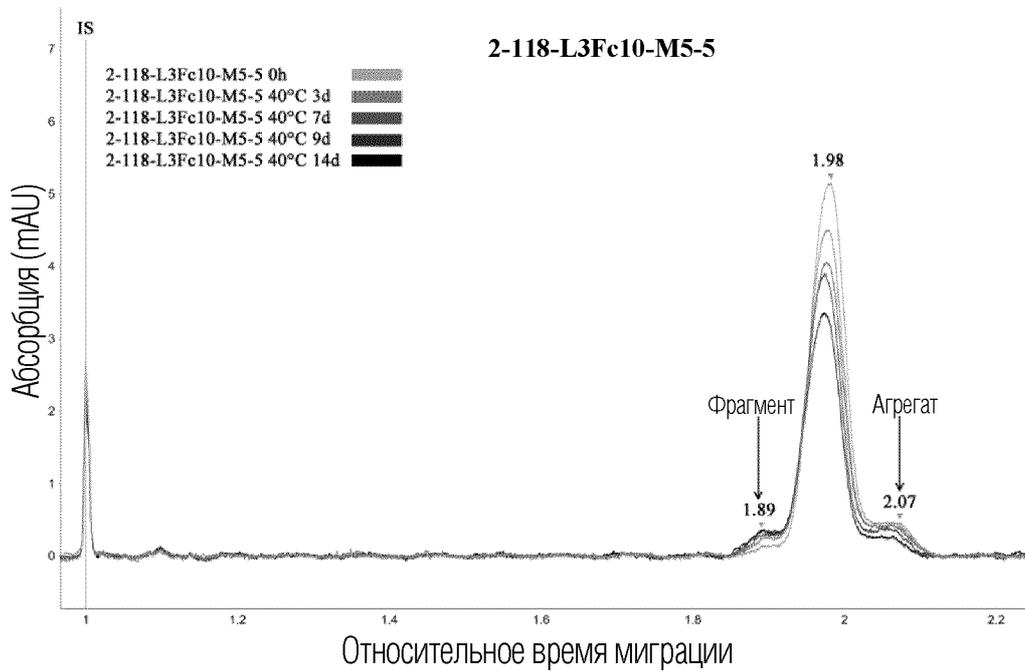
ФИГ. 4I



ФИГ. 4J

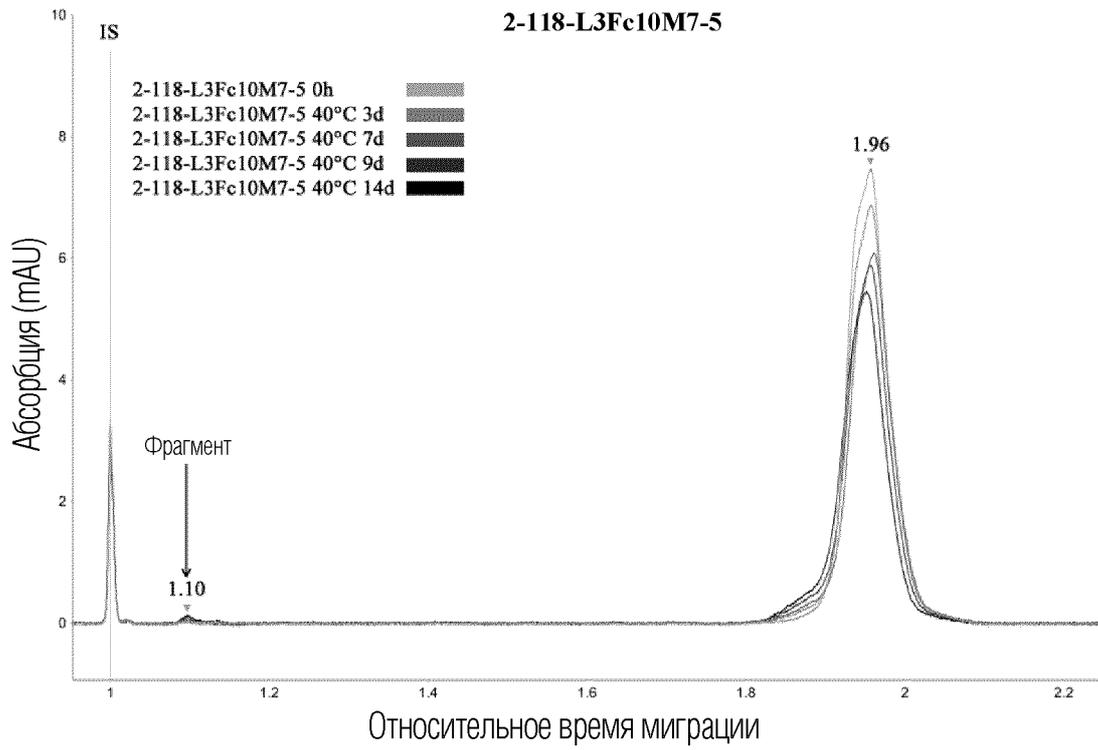


ФИГ. 4К

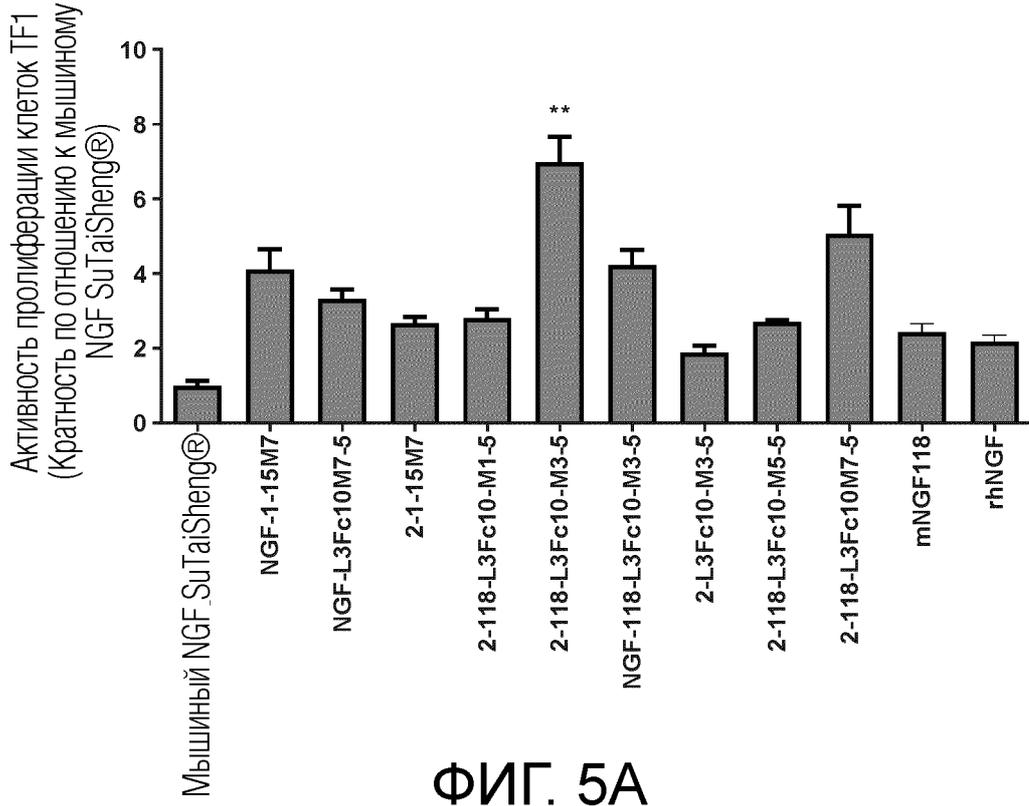


ФИГ. 4Л

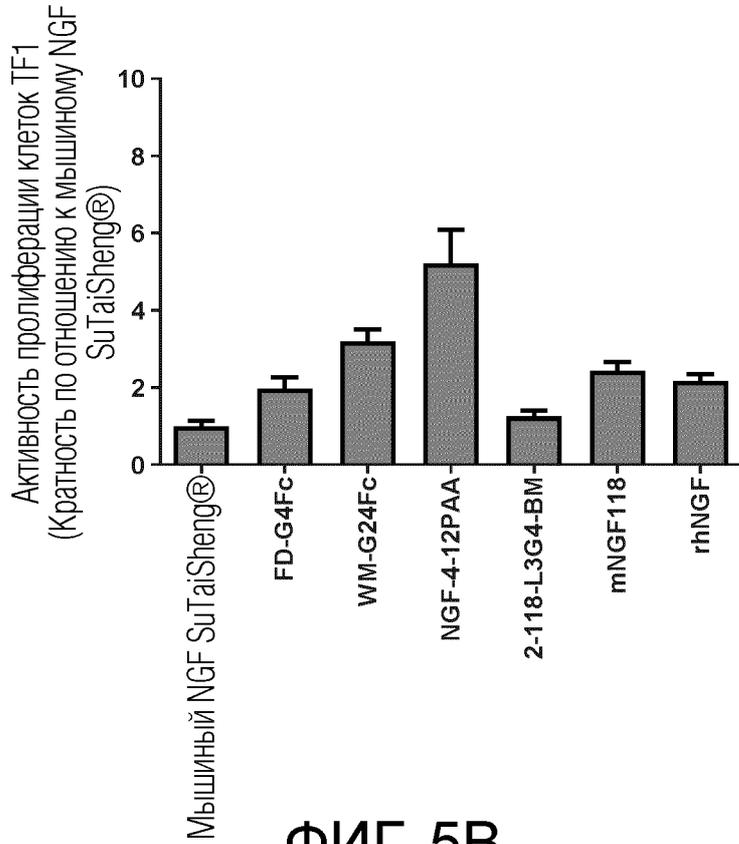
17/22



ФИГ. 4М

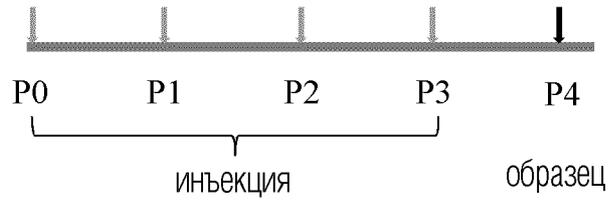


ФИГ. 5А

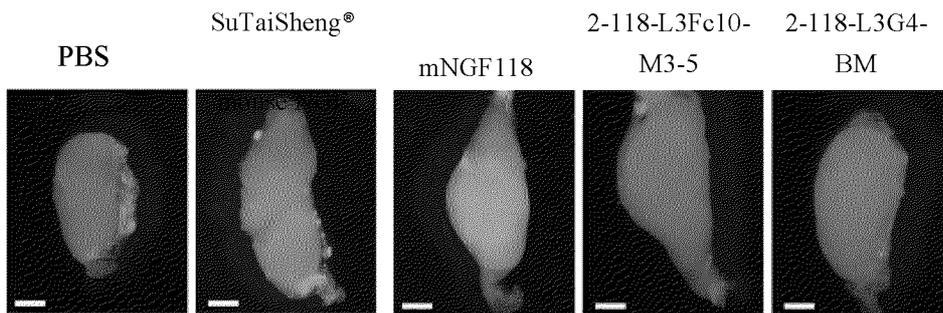


ФИГ. 5В

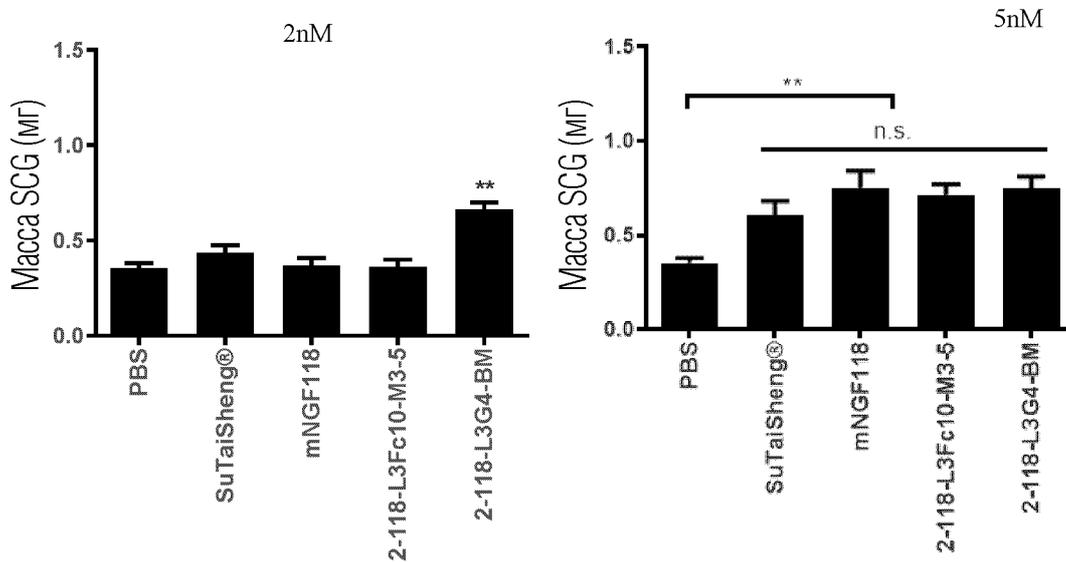
19/22



ФИГ. 6А

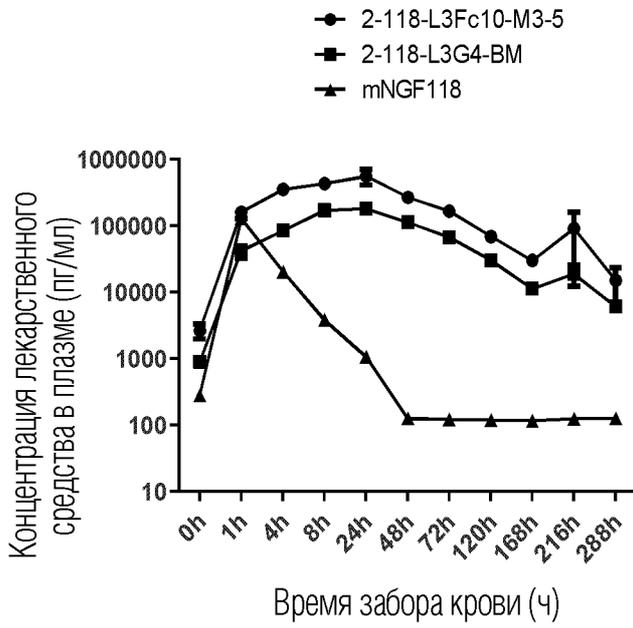


ФИГ. 6В

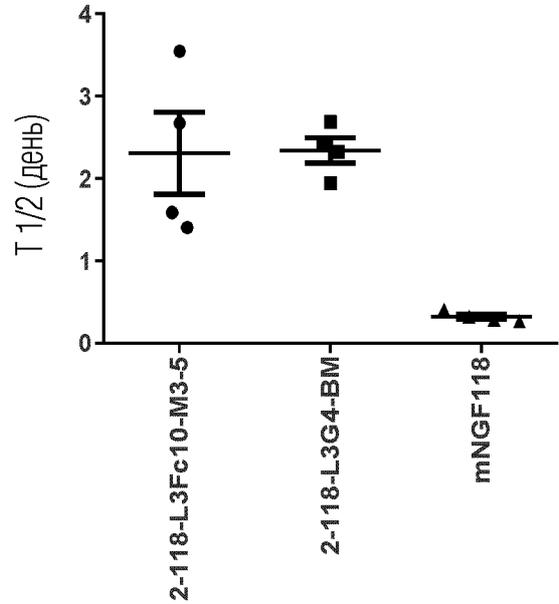


ФИГ. 6С

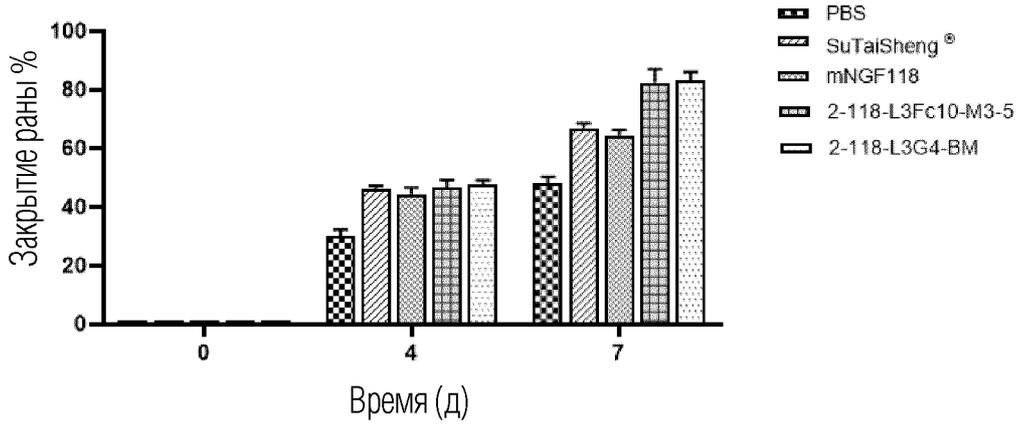
ФИГ. 6D



ФИГ. 7А

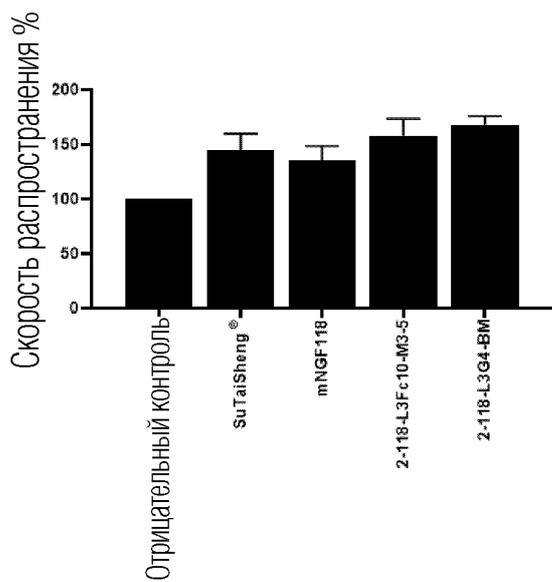


ФИГ. 7В

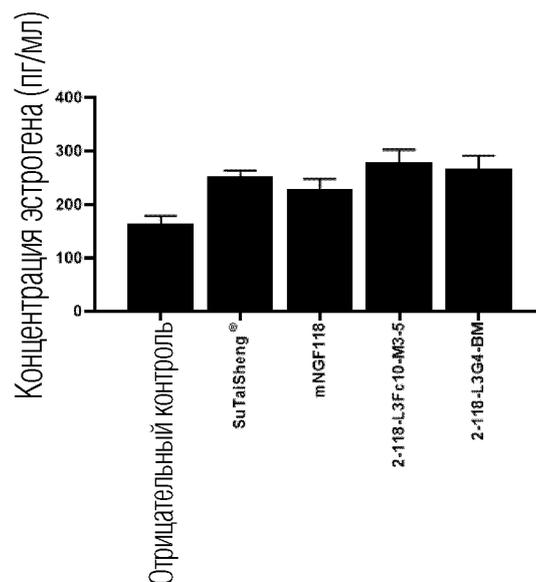


ФИГ. 8

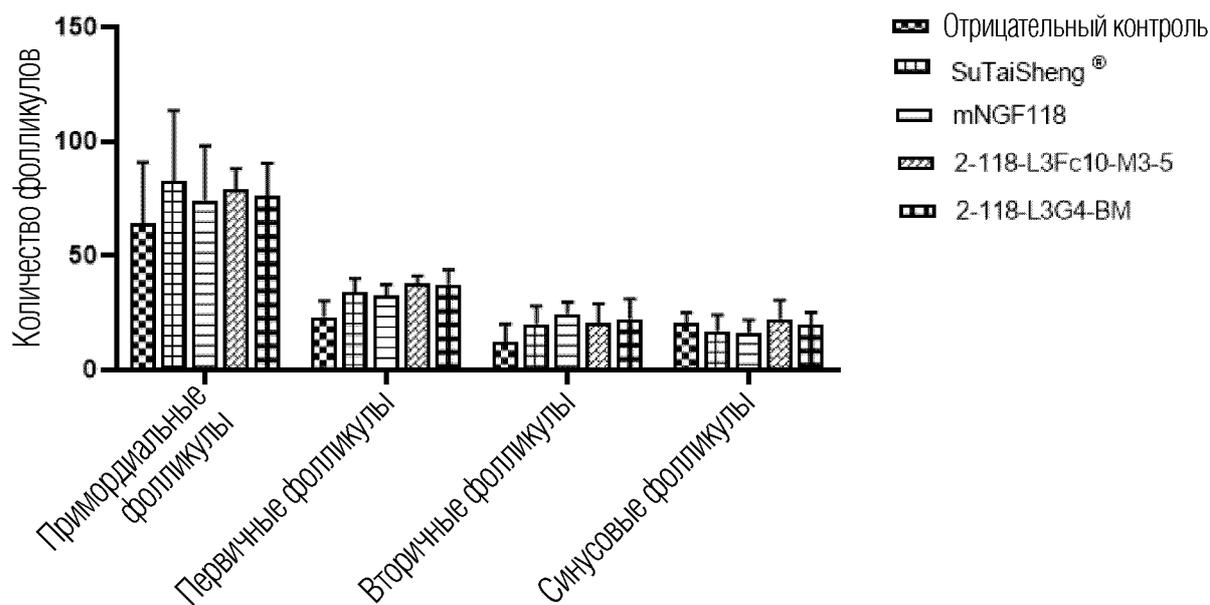
21/22



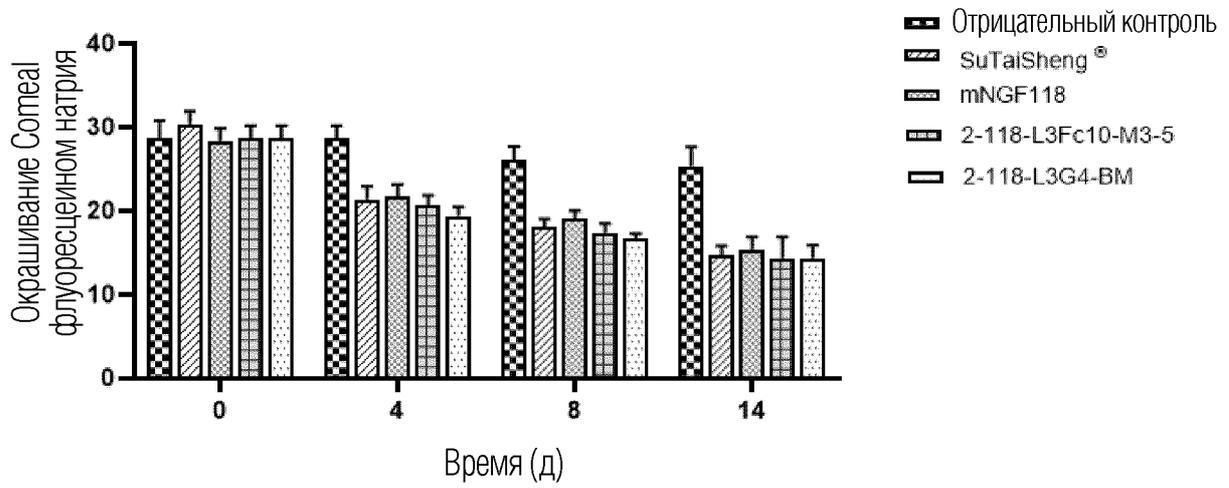
ФИГ. 9А



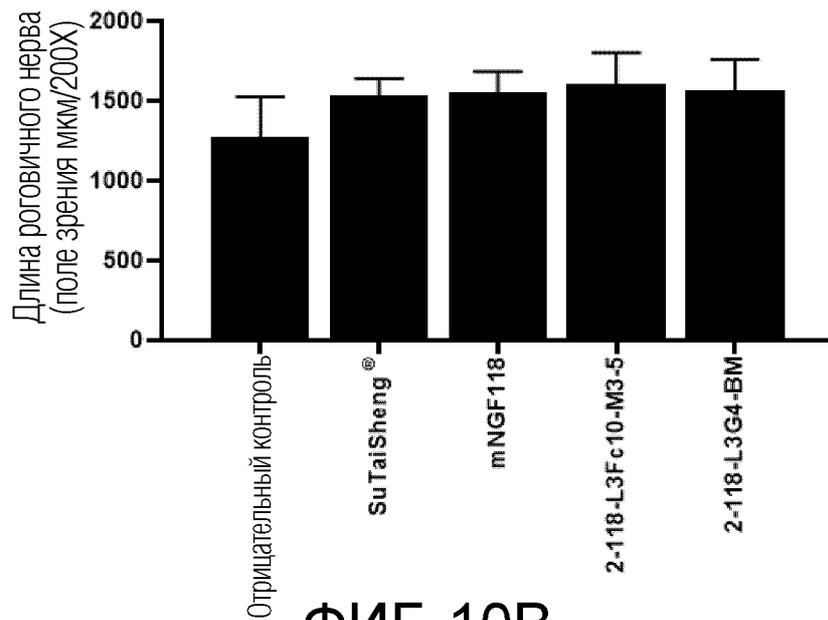
ФИГ. 9В



ФИГ. 9С



ФИГ. 10А



ФИГ. 10В