



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95436 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

C07K 19/00

C12N 15/12 (2006.01)

C12P 21/00

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ХИМЕРНІ ГІБРИДИ МОНОМЕР-ДИМЕР ІМУНОГЛОБУЛІНУ

1

2

(21) а200511543

(22) 06.05.2004

(24) 10.08.2011

(86) PCT/US2004/014064, 06.05.2004

(31) 60/469,600

(32) 06.05.2003

(33) US

(31) 60/487,964

(32) 17.07.2003

(33) US

(31) 60/539,207

(32) 26.01.2004

(33) US

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) ПЕТЕРС РОБЕРТ Т., US, МЕЗО АДАМ Р., US, РІВЕРА ДЕНІЕЛ С., US, БІТОНТІ АЛАН ДЖ., US, СТАТТЕЛ ДЖЕЙМС М., US, ЛОУ СЬЮЗАН С., US

(73) СІНТОНІКС ФАРМАСЬЮТІКАЛЗ, ІНК., US

(56) US 5605689 (A) 25.02.1997

WO 0018881 (A2) 06.04.2000

US 5910573 (A) 08.06.1999

US 6030613 (A) 29.02.2000

(57) 1. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше тільки частину константної ділянки імуноглобуліну, де тільки перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і де вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину виключно константної ділянки імуноглобуліну.

2. Химерний білок за п. 1, де вказаний другий ланцюг, додатково, містить афінну мітку.

3. Химерний білок за п. 2, де афінною міткою є мітка FLAG.

4. Химерний білок за п. 1, де частиною імуноглобуліну є Fc-фрагмент.

5. Химерний білок за п. 4, де частина імуноглобуліну є FcRn-зв'язувальним партнером.

6. Химерний білок за п. 5, де FcRn-зв'язувальний партнер являє собою пептидний міметик Fc-фрагмента імуноглобуліну.

7. Химерний білок за п. 1 або 5, де імуноглобулін є IgG.

8. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є білок.

9. Химерний білок за п. 7, де IgG є IgG1 або IgG2.

10. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є інгібітор злиття вірусів.

11. Химерний білок за п. 10, де інгібітор злиття вірусів є інгібітором злиття ВІЛ.

12. Химерний білок за п. 11, де інгібітором злиття ВІЛ є T20 (SEQ ID NO:1), T21 (SEQ ID NO:2) або T1249 (SEQ ID NO:3).

13. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є фактор згортання крові.

14. Химерний білок за п. 13, де фактором згортання крові є фактор VII або VIIa.

15. Химерний білок за п. 13, де фактором згортання крові є фактор VIII або фактор VIIIa.

16. Химерний білок за п. 13, де фактором згортання крові є фактор IX.

17. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є біополімерна молекула з молекулярною масою менше 50 кДа.

18. Химерний білок за п. 17, де біологічно активною молекулою є лейпролід.

19. Химерний білок за п. 17, де молекула є антагоністом VLA4.

20. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є інтерферон.

21. Химерний білок за п. 20, де біологічно активною молекулою є інтерферон α .

22. Химерний білок за п. 20, де біологічно активною молекулою є інтерферон β .

23. Химерний білок за п. 20, де інтерферон являє собою інтерферон α і має лінкер з 15-25 амінокислот.

24. Химерний білок за п. 21, де інтерферон α має лінкер з 15-20 амінокислот.

25. Химерний білок за п. 22, де лінкером є (GGGGGS)₃.

26. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є нуклеїнова кислота.

(13) C2

(11) 95436

(19) UA

27. Химерний білок за п. 26, де нуклеїнова кислота є ДНК або РНК.

28. Химерний білок за п. 26, де нуклеїнова кислота є антисмисловою молекулою.

29. Химерний білок за п. 26, де нуклеїнова кислота є рибозимом.

30. Химерний білок за п. 1 або 5, де біологічно активною молекулою є фактор росту.

31. Химерний білок за п. 30, де фактором росту є еритропоетин.

32. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і де вказаний другий ланцюг по суті містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і афінну мітку, де тільки перший ланцюг містить біологічно активну молекулу.

33. Химерний білок за п. 32, де афінною міткою є мітка FLAG.

34. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де

а) вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу, щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і перший домен, що має щонайменше один специфічний зв'язувальний партнер;

б) тільки перший ланцюг містить біологічно активну молекулу; і

с) вказаний другий ланцюг по суті містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і додатково містить другий домен, при цьому вказаний другий домен є специфічним зв'язувальним партнером вказаного першого домену.

35. Химерний білок за п. 34, де вказаний другий ланцюг додатково містить афінну мітку.

36. Химерний білок за п. 34, де афінною міткою є мітка FLAG.

37. Химерний білок за п. 34, де частина імуноглобуліну являє собою Fc-фрагмент.

38. Химерний білок за п. 34 або 37, де імуноглобулін є IgG.

39. Химерний білок за п. 37, де частина імуноглобуліну є FcRn-зв'язувальним партнером.

40. Химерний білок за п. 39, де FcRn-зв'язувальним партнером є пептидний міметик Fc-фрагмента імуноглобуліну.

41. Химерний білок за п. 34 або 39, де перший домен зв'язується з другим доменом нековалентно.

42. Химерний білок за п. 34 або 39, де перший домен являє собою половину подвійної спіралі лейцинового зіпера і вказаний другий домен є комплементарним зв'язувальним партнером вказаної подвійної спіралі лейцинового зіпера.

43. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активною молекулою є білок.

44. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активною молекулою є інтерферон.

45. Химерний білок за п. 44, де біологічно активною молекулою є інтерферон α .

46. Химерний білок за п. 44, де біологічно активною молекулою є інтерферон β .

47. Химерний білок за п. 44, де інтерферон являє собою інтерферон α і має лінкер з 15-25 амінокислот.

48. Химерний білок за п. 47, де інтерферон α має лінкер з 15-20 амінокислот.

49. Химерний білок за п. 43, де біологічно активною молекулою є лейпролід.

50. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активною молекулою є інгібітор злиття вірусів.

51. Химерний білок за п. 50, де інгібітор злиття вірусів є інгібітором злиття ВІЛ.

52. Химерний білок за п. 51, де інгібітором злиття ВІЛ є T20 (SEQ ID NO:1), T21 (SEQ ID NO:2) або T1249 (SEQ ID NO:3).

53. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активною молекулою є фактор згортання крові.

54. Химерний білок за п. 53, де фактором згортання крові є фактор VII або VIIa.

55. Химерний білок за п. 53, де фактором згортання крові є фактор VIII або VIIIa.

56. Химерний білок за п. 53, де фактором згортання крові є фактор IX.

57. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активною молекулою є біополімерна молекула з молекулярною масою менше 50 кДа.

58. Химерний білок за п. 57, де біологічно активною молекулою є антагоніст VLA4.

59. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активна молекула містить нуклеїнову кислоту.

60. Химерний білок за п. 59, де нуклеїнова кислота є ДНК або РНК.

61. Химерний білок за п. 59, де нуклеїнова кислота є антисмисловою нуклеїновою кислотою.

62. Химерний білок за п. 59, де нуклеїнова кислота є рибозимом.

63. Химерний білок за п. 34 або 39, де біологічно активною молекулою є фактор росту або гормон.

64. Химерний білок за п. 63, де фактором росту є еритропоетин.

65. Фармацевтична композиція, що містить химерний білок за будь-яким з пп. 1, 5, 34 або 39 і фармацевтично прийнятний ексципієнт.

66. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де

а) вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу, щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і перший домен, що має щонайменше один специфічний зв'язувальний партнер; і

б) вказаний другий ланцюг містить щонайменше тільки частину імуноглобуліну і другий домен, який є специфічним зв'язувальним партнером вказаного першого домену, і афінну мітку.

67. Химерний білок за п. 66, де афінною міткою є мітка FLAG.

68. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де

а) вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу, щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і перший домен, що має щонайменше один специфічний зв'язувальний партнер; і

б) тільки перший ланцюг містить біологічно активну молекулу; і

с) вказаний другий ланцюг по суті містить щонайменше частину імуноглобуліну, другий домен, де другий домен є специфічним зв'язувальним партнером вказаного першого домену, і афінну мітку.

69. Химерний білок за п. 68, де афінною міткою є мітка FLAG.

70. Спосіб одержання біологічно активного химерного білка за п. 1, в якому здійснюють:

а) трансфекцію першої клітини першою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує перший ланцюг;

б) трансфекцію другої клітини другою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує другий ланцюг;

с) культивування клітин, трансфікованих на етапах

а) і б) в таких умовах, за яких експресується поліпептид, що кодується вказаною першою конструкцією ДНК і вказаною другою конструкцією ДНК.

71. Спосіб за п. 70, де вказана частина константної ділянки імуноглобуліну є FcRn-зв'язувальним партнером.

72. Спосіб за п. 70, в якому додатково здійснюють ізолювання химерного білка методом хроматографії.

73. Спосіб за п. 70 або 71, в якому біологічно активною молекулою є поліпептид.

74. Спосіб за п. 70 або 71, де біологічно активною молекулою є інтерферон.

75. Спосіб за п. 74, де біологічно активною молекулою є інтерферон α .

76. Спосіб за п. 74, де біологічно активною молекулою є інтерферон β .

77. Спосіб за п. 74, де інтерферон являє собою інтерферон α і містить лінкер з 15-25 амінокислот.

78. Спосіб за п. 74, де інтерферон α має лінкер з 15-20 амінокислот.

79. Спосіб за п. 70 або 71, де біологічно активною молекулою є інгібітор злиття вірусів.

80. Спосіб за п. 79, де інгібітор злиття вірусів є інгібітором злиття ВІЛ.

81. Спосіб за п. 80, де інгібітором злиття ВІЛ є T20 (SEQ ID NO:1), T21 (SEQ ID NO:2) або T1249 (SEQ ID NO:3).

82. Спосіб за п. 70 або 71, де біологічно активна молекула містить фактор згортання крові.

83. Спосіб за п. 82, де фактором згортання крові є фактор VII або VIIa.

84. Спосіб за п. 83, де фактором згортання крові є фактор VIII або фактор VIIIa.

85. Спосіб за п. 82, де фактором згортання крові є фактор IX.

86. Спосіб за п. 70 або 71, де біологічно активною молекулою є біополімерна молекула з молекулярною масою менше 50 кДа.

87. Спосіб за п. 70 або 71, в якому біологічно активна молекула містить нуклеїнову кислоту.

88. Спосіб за п. 87, де нуклеїнова кислота є ДНК або РНК.

89. Спосіб за п. 87, де нуклеїнова кислота є антисмисловою молекулою.

90. Спосіб за п. 87, де нуклеїнова кислота є рибозимом.

91. Спосіб за п. 70 або 71, де біологічно активна молекула містить фактор росту або гормон.

92. Спосіб за п. 91, де фактором росту є еритропоетин.

93. Спосіб за п. 70 або 71, де димери виділяють за допомогою хроматографії.

94. Спосіб за п. 70 або 71, де клітина є еукаріотичною клітиною.

95. Спосіб за п. 94, де еукаріотичною клітиною є клітина CHO.

96. Спосіб за п. 70 або 71, де клітина є прокаріотичною клітиною.

97. Спосіб за п. 96, де прокаріотичною клітиною є клітина E. coli.

98. Спосіб лікування пацієнта із захворюванням або станом, що включає введення химерного білка за п. 5 пацієнту, який цього потребує.

99. Спосіб за п. 98, де вказаний химерний білок вводять внутрішньовенним, підшкірним, пероральним, букальним, під'язиковим, назальним, парентеральним, ректальним, вагінальним або легеневим шляхом.

100. Спосіб за п. 98, де вказаною біологічно активною молекулою є фактор VIII або фактор VIIIa.

101. Спосіб за п. 98, де вказаним захворюванням або станом є вірусна інфекція.

102. Спосіб за п. 98, де біологічно активною молекулою є інтерферон.

103. Спосіб за п. 102, де біологічно активною молекулою є інтерферон α .

104. Спосіб за п. 102, де біологічно активною молекулою є інтерферон β .

105. Спосіб за п. 102, де інтерферон являє собою інтерферон α і містить лінкер з 15-25 амінокислот.

106. Спосіб за п. 105, де інтерферон α містить лінкер з 15-20 амінокислот.

107. Спосіб за п. 98, де вказаним захворюванням або станом є ВІЛ-інфекція.

108. Спосіб за п. 98, де вказаною біологічно активною молекулою є інгібітор злиття вірусів.

109. Спосіб за п. 108, де інгібітор злиття вірусів є T20, T21 або T1249.

110. Спосіб за п. 98, де вказаним захворюванням або станом є гемостатичний розлад.

111. Спосіб за п. 98, де вказаним захворюванням або станом є гемофілія A.

112. Спосіб за п. 98, де вказаним захворюванням або станом є гемофілія B.

113. Спосіб за п. 98, де вказаною біологічно активною молекулою є фактор VII або фактор VIIa.

114. Спосіб за п. 98, де вказаною біологічно активною молекулою є фактор IX.

115. Спосіб за п. 98, де вказаним захворюванням або станом є анемія.

116. Спосіб за п. 98, де вказаною біологічно активною молекулою є еритропоетин.

117. Химерний білок формули

$X-L_a-F:F$ або $F:F-L_a-X$,

де X означає біологічно активну молекулу, L означає лінкер, F означає щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і a дорівнює цілому числу або нулю.

118. Химерний білок за п. 117, де F означає FcRn-зв'язувальний партнер.

119. Химерний білок за п. 117, де FcRn є пептидним міметиком Fc-фрагмента імуноглобуліну.

120. Химерний білок за п. 117 або 119, де кожний F хімічно зв'язаний з іншим F.

121. Спосіб за п. 120, де хімічне зв'язування є нековалентною взаємодією.

122. Спосіб за п. 120, де хімічний зв'язок є ковалентним зв'язком.

123. Спосіб за п. 120, де хімічний зв'язок є дисульфідним зв'язком.

124. Химерний білок за п. 117 або 118, де F зв'язаний з F зв'язком, який не є дисульфідним.

125. Химерний білок за п. 117, де F означає константну ділянку імуноглобуліну IgG.

126. Химерний білок за п. 117, де F означає IgG1.

127. Химерний білок за п. 117, де F означає Fc-фрагмент.

128. Химерний білок за п. 117, де X означає білок.

129. Химерний білок за п. 117, де X означає лейкоцит.

130. Химерний білок за п. 117, де X являє собою біополімерну молекулу з молекулярною масою менше 50 кДа.

131. Химерний білок за п. 130, де мала молекула є антагоністом VLA4.

132. Химерний білок за п. 117, де X означає інгібітор злиття вірусів.

133. Химерний білок за п. 132, де інгібітор злиття вірусів є інгібітором злиття ВІЛ.

134. Химерний білок за п. 133, де інгібітором злиття ВІЛ є T20 (SEQ ID NO:1), T21 (SEQ ID NO:2) або T1249 (SEQ ID NO:3).

135. Химерний білок за п. 117 або 118, де X означає фактор згортання крові.

136. Химерний білок за п. 135, де фактором згортання крові є фактор VII або VIIa.

137. Химерний білок за п. 135, де фактором згортання крові є фактор VIII або фактор VIIIa.

138. Химерний білок за п. 135, де фактором згортання крові є фактор IX.

139. Химерний білок за п. 117 або 118, де X означає нуклеїнову кислоту.

140. Химерний білок за п. 139, де нуклеїнова кислота є молекулою ДНК або РНК.

141. Химерний білок за п. 117 або 118, де X означає фактор росту.

142. Химерний білок за п. 141, де фактором росту є еритропоетин.

143. Спосіб лікування захворювання або стану пацієнта, що включає введення химерного білка за будь-яким з пп. 1, 5, 34, 39, 117 або 118 вказаному пацієнту.

144. Спосіб за п. 143, де вказаним захворюванням або станом є вірусна інфекція.

145. Спосіб за п. 143, де біологічно активною молекулою є інтерферон.

146. Спосіб за п. 145, де біологічно активною молекулою є інтерферон α .

147. Спосіб за п. 145, де біологічно активною молекулою є інтерферон β .

148. Спосіб за п. 145, де інтерферон являє собою інтерферон α і містить лінкер з 15-25 амінокислот.

149. Спосіб за п. 148, де інтерферон α містить лінкер з 15-20 амінокислот.

150. Спосіб за п. 144, де вірусною інфекцією є ВІЛ-інфекція.

151. Спосіб за п. 143, де вказаним захворюванням або станом є розлад кровотоку.

152. Спосіб за п. 151, де вказаним розладом кровотоку є гемофілія А.

153. Спосіб за п. 151, де вказаним розладом кровотоку є гемофілія В.

154. Спосіб за п. 143, де вказаним захворюванням або станом є анемія.

155. Спосіб за п. 143, де химерний білок вводять внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, підшкірним, пероральним, букальним, під'язиковим, назальним, ректальним, вагінальним шляхом.

156. Спосіб за п. 155, де химерний білок вводять легеним шляхом.

157. Спосіб за п. 155, де химерний білок вводять перорально.

158. Спосіб за п. 143, де імуноглобулін є IgG.

159. Спосіб за п. 143, де частина імуноглобуліну є Fc-фрагментом.

160. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, нековалентно зв'язану з будь-якою іншою молекулою, за винятком частини імуноглобуліну, що є у вказаному першому поліпептидному ланцюгу, де тільки перший поліпептидний ланцюг містить біологічно активну молекулу.

161. Химерний білок за п. 160, де частина константної ділянки імуноглобуліну є FcRn-зв'язувальним партнером.

162. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, де вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину виключно константної ділянки імуноглобуліну, де тільки перший поліпептидний ланцюг містить біологічно активну молекулу.

163. Химерний білок за п. 162, де частина константної ділянки імуноглобуліну є FcRn-зв'язувальним партнером.

164. Спосіб одержання химерного білка, що містить Fc-фрагмент імуноглобуліну, зв'язаний з біологічно активною молекулою, при цьому у вказаному способі здійснюють

- а) трансфекцію клітини конструкцією ДНК, яка містить послідовність ДНК, що кодує Fc-фрагмент імуноглобуліну, і другу послідовність ДНК, що кодує інтеїн;
- б) культивування вказаної клітини, трансфорованої з етапу а), в таких умовах, за яких експресується Fc-фрагмент та інтеїн;
- в) виділення вказаного Fc-фрагмента та інтеїну з вказаної клітини методом хроматографії;
- г) хімічний синтез біологічно активної молекули, що має N-кінцевий Cys;
- д) взаємодію виділеного інтеїну-Fc за в) з MESNA, з утворенням C-кінцевого тіофіру;
- е) взаємодію біологічно активної молекули за г) з Fc за в) з одержанням химерного білка, що містить Fc, зв'язаного з біологічно активною молекулою.

165. Спосіб одержання химерного білка, що містить Fc-фрагмент імуноглобуліну, зв'язаний з біологічно активною молекулою, при цьому у вказаному способі здійснюють:

а) трансфекцію клітини конструкцією ДНК, яка містить послідовність ДНК, що кодує Fc-фрагмент імуноглобуліну, і другу послідовність ДНК, що кодує сигнальний пептид, де вказаний сигнальний пептид розташований поруч з цистеїном Fc-фрагмента;

б) культивування вказаної клітини, трансфікованої на етапі а) в таких умовах, за яких експресується Fc-фрагмент і сигнальний пептид і Fc-фрагмент секретується з клітини без сигнального пептиду і з N-кінцевим цистеїном;

с) виділення димерів поліпептидів вказаного Fc-фрагмента з N-кінцевим цистеїном, кодованим вказаною першою та другою конструкціями ДНК з а) з вказаної клітини хроматографією;

д) хімічний синтез біологічно активної молекули, що має тіоефір;

е) взаємодію біологічно активної молекули за д) Fc за с) в таких умовах, за яких біологічно активна молекула може зв'язуватися з одним ланцюгом димеру за с) з одержанням химерного білка, що містить Fc, зв'язаного з біологічно активною молекулою.

166. Спосіб за п. 165, де тіоефір є C-кінцевим тіоефіром.

167. Спосіб одержання химерного білка, що містить Fc-фрагмент імуноглобуліну, зв'язаний з біологічно активною молекулою, при цьому у вказаному способі здійснюють:

а) трансфекцію клітини конструкцією ДНК, яка містить послідовність ДНК, що кодує Fc-фрагмент імуноглобуліну, і другу послідовність ДНК, що кодує сигнальний пептид, де вказаний сигнальний пептид розташований поруч з цистеїном Fc-фрагмента;

б) культивування вказаної клітини, трансфікованої з етапу а) в таких умовах, за яких експресується Fc-фрагмент і сигнальний пептид, зв'язані разом, і вказаний сигнальний пептид відщеплюється від Fc-фрагмента в клітині в першому положенні, розташованому поруч з цистеїном, або у другому положенні, розташованому поруч з валіном;

с) виділення димерів поліпептиду вказаних Fc-фрагментів з двома N-кінцевими цистеїнами або двома N-кінцевими валінами або N-кінцевим цистеїном і N-кінцевим валіном, що кодуються вказаними першою і другою конструкціями ДНК за а), з вказаної клітини хроматографією;

д) хімічний синтез біологічно активної молекули, що має тіоефір;

е) взаємодію біологічно активної молекули за д) з димерами за с) з одержанням химерного білка, що містить перший ланцюг, що включає в себе Fc, зв'язаний з біологічно активною молекулою, і другий ланцюг, що включає в себе Fc, не зв'язаний ні з якою біологічно активною молекулою або варіабельною ділянкою імуноглобуліну.

168. Спосіб за п. 167, де тіоефір є C-кінцевим тіоефіром.

169. Спосіб виділення химерного білка за п. 1 з суміші, де суміш містить

а) химерний білок за п. 1;

б) димер, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де перший і другий ланцюги, обидва, містять біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну; і

с) частину константної ділянки імуноглобуліну;

де вказаний спосіб передбачає:

1) приведення в контакт суміші з лігандом-барвником, зв'язаним з твердою підкладкою у відповідних умовах, за яких химерний білок за п. 1 і димер зв'язуються з лігандом-барвником;

2) видалення частини константної ділянки імуноглобуліну, що не зв'язана з лігандом-барвником;

3) зміну відповідних умов 1) для того, щоб зв'язок між химерним білком за п. 1 і лігандом-барвником, зв'язаним з твердою підкладкою, розривався;

4) елювання химерного білка за п. 1.

170. Спосіб за п. 169, де частина імуноглобуліну є Fc-фрагментом.

171. Спосіб за п. 169, де лігандом-барвником є молекула біоміметика.

172. Спосіб за п. 169, де ліганд-барвник вибраний з Mimetic Red 1TM, Mimetic Red 2TM, Mimetic Orange 1TM, Mimetic Orange 2TM, Mimetic Orange 3TM, Mimetic Yellow 1TM, Mimetic Yellow 2TM, Mimetic Green 1TM, Mimetic Blue 1TM і Mimetic Blue 2TM.

173. Спосіб за п. 169, де химерний білок містить Еро.

174. Спосіб за п. 172 або 173, де лігандом-барвником є Mimetic Red 2TM.

175. Спосіб за п. 169, де вказаний химерний білок являє собою фактор VII або VIIa.

176. Спосіб за п. 169, де вказана біологічно активна молекула являє собою фактор VIII або фактор VIIIa.

177. Спосіб за п. 169, де химерний білок містить фактор IX.

178. Спосіб за п. 169, де химерний білок містить інтерферон.

179. Спосіб за п. 178, де химерний білок містить інтерферон α .

180. Спосіб за п. 178, де химерний білок містить інтерферон β .

181. Спосіб за п. 169, де химерний білок містить інгібітор злиття ВІЛ.

182. Спосіб за п. 172 або 178, де лігандом-барвником є Mimetic Green 1TM.

183. Спосіб за п. 169, де відповідні умови включають буфер, який має рН в діапазоні 4-9 включно.

184. Спосіб за п. 183, де зміна відповідних умов полягає в додаванні щонайменше однієї солі до буфера в концентрації, достатній для руйнування зв'язку гібриду мономер-димер з лігандом-барвником з виділенням, таким чином, гібриду мономер-димер.

185. Спосіб за п. 184, де щонайменше однією сіллю є NaCl.

186. Спосіб за п. 183, де буфер має рН 8.

187. Спосіб за п. 186, де концентрація солі становить 400 мМ, і химерний білок містить Еро.

188. Спосіб за п. 184, що додатково включає додавання більш високої концентрації солі у порівнянні з концентрацією солі, яка руйнує зв'язок гібриду мономер-димер з лігандом-барвником так, що більш висока концентрація солі руйнує зв'язок

димеру з лігандом-барвником з виділенням, таким чином, димеру.

189. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший ланцюг містить ЕРО, восьмиамінокислотний лінкер, що містить амінокислотну послідовність EFAGAAAV, і Fc-фрагмент константної ділянки імуноглобуліну, що містить мутацію аспарагіну в аланін у положенні 297; і де вказаний другий ланцюг містить Fc-фрагмент константної ділянки імуноглобуліну, що містить мутацію аспарагіну в аланін у положенні 297.

190. Химерний білок за п. 189, який додатково містить афінну мітку.

191. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший ланцюг містить фактор VIII або фактор VIIIa, восьмиамінокислотний лінкер, що має амінокислотну послідовність EFAGAAAV, і Fc-фрагмент константної ділянки

імуноглобуліну, що містить мутацію аспарагіну в аланін у положенні 297; і де вказаний другий ланцюг містить Fc-фрагмент константної ділянки імуноглобуліну, що містить мутацію аспарагіну в аланін у положенні 297.

192. Химерний білок за п. 191, який додатково містить афінну мітку.

193. Химерний білок, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де вказаний перший ланцюг містить фактор IX, восьмиамінокислотний лінкер, що має амінокислотну послідовність EFAGAAAV, і Fc-фрагмент константної ділянки імуноглобуліну, що містить мутацію аспарагіну в аланін у положенні 297; і де вказаний другий ланцюг містить Fc-фрагмент константної ділянки імуноглобуліну, що містить мутацію аспарагіну в аланін у положенні 297.

194. Химерний білок за п. 193, який додатково містить афінну мітку.

Дана заявка претендує на пріоритет за попередньою заявкою на видачу патенту США № 60/469600, поданою 6 травня 2003 року, попередньою заявкою на видачу патенту США № 60/487964, поданою 17 липня 2003 року, і попередньою заявкою на видачу патенту США № 60/539207, поданою 26 січня 2004 року, всі вказані заявки включені у вигляді посилання в повному об'ємі. Непопередня заявка на видачу патенту США, озаглавлена «Methods for Chemically Synthesizing Immunoglobulin Chimeric Proteins», подана 6 травня 2004 року, включена у вигляді посилання.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Винахід загалом відноситься до терапевтичних химерних білків, що складаються з двох поліпептидних ланцюгів, в яких перший ланцюг складається з терапевтичної біологічно активної молекули, а другий ланцюг не складається з терапевтичної біологічно активної молекули першого ланцюга. Більш конкретно, винахід відноситься до химерних білків, що складаються з двох поліпептидних ланцюгів, в яких обидва ланцюги складаються щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну, де перший ланцюг модифікований так, щоб він, крім того, містив біологічно активну молекулу, а другий ланцюг не модифікований таким чином. Отже, винахід відноситься до химерного білка, який є гібридом мономер-димер, тобто химерного білка, що має димерний аспект і мономерний аспект, при цьому димерний аспект відноситься до того факту, що він складається з двох поліпептидних ланцюгів, кожен з яких складається з частини константної ділянки імуноглобуліну, а мономерний аспект відноситься до того факту, що тільки один з двох ланцюгів складається з терапевтичної біологічно активної молекули. Фіг. 1 ілюструє один приклад гібриду мономер-димер, в якому біологічно активною молекулою є еритропоєтин (ЕРО), а частина константної ділянки імуноглобуліну являє собою Fc-ділянку IgG.

Рівень техніки

Імуноглобуліни складаються з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких ланцюгів і двох легких ланцюгів, які зв'язані за допомогою дисульфідних зв'язків з утворенням тетрамерів. Кожний ланцюг, крім того, складається з однієї варіабельної ділянки однієї константної ділянки. Варіабельні ділянки опосередковують упізнавання і зв'язування антигену, тоді як константні ділянки, зокрема константні ділянки важких ланцюгів, опосередковують множини ефекторних функцій, наприклад, зв'язування комплементу і зв'язування Fc-рецептора (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 5624821, 5116964).

Константна ділянка, крім того, складається з доменів, названих СН-доменами (константна важка) (СН1, СН2 і т.д.). В залежності від ізотипу (наприклад, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) константна ділянка може складатись з трьох або чотирьох СН-доменів. Константні ділянки деяких ізотипів (наприклад, IgG) також містять шарнірну ділянку, Janeway et al. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y.

Створення химерних білків, що складаються з константних ділянок імуноглобуліну, зв'язаних з частиною, яка представляє інтерес, або її фрагментом, описано (дивіться, наприклад, патенти США №№ 5480981 і 5808029; Gascoigne et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936; Capon et al. 1989, Nature 337:525; Traunecker et al. 1989, Nature 339:68; Zettmeissl et al. 1990, DNA Cell Biol. USA 9:347; Byrn et al. 1990, Nature. 344:667; Watson et al. 1990, J. Cell. Biol. 110:2221; Watson et al. 1991, Nature 349:164; Aruffo et al. 1990, Cell 61:1303; Linsley et al. 1991, J. Exp. Med. 173:721; Linsley et al. 1991, J. Exp. Med. 174:561; Stamenkovic et al., 1991, Cell 66:1133; Ashkenazi et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Lesslauer et al. 1991, Eur. J. Immunol. 27:2883; Peppel et al. 1991, J. Exp. Med. 174:1483; Bennett et al. 1991, J. Biol. Chem. 266:23060; Kurschner et al. 1992, J. Biol. Chem. 267:9354; Chalupny et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10360; Ridgway and German, 1991, J. Cell.

Biol. 115, Abstract No. 1448; Zheng et al. 1995, J. Immun. 154:5590). Вказані молекули звичайно володіють як біологічною активністю, асоційованою зі зв'язаною молекулою, яка представляє інтерес, так і ефекторною функцією, або деякими іншими необхідними характеристиками, пов'язаними з константною ділянкою імуноглобуліну (наприклад, біологічною стабільністю, клітинною секрецією).

Fc-частина константної ділянки імуноглобуліну в залежності від ізотипу імуноглобуліну, може включати в себе домени CH2, CH3 і CH4, а також шарнірну ділянку. Химерні білки, що містять Fc-частину імуноглобуліну, набувають декілька необхідних властивостей химерного білка, включаючи підвищену стабільність, збільшений час напівжиття в сироватці (дивіться Capon et al. 1989, Nature 337:525), а також зв'язування з Fc-рецепторами, такими як неонатальний Fc-рецептор (FcRn) (патенти США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

FcRn є активним в епітеліальній тканині дорослих особин і експресується в просвіті кишечника, легеневих дихальних шляхах, назальних поверхнях, вагінальних поверхнях і ректальних поверхнях (патент США № 6485726). Химерні білки, що складаються з FcRn-зв'язувальних партнерів (наприклад, IgG, Fc-фрагментів), можуть бути ефективно переміщені через епітеліальні бар'єри за допомогою FcRn, таким чином забезпечуючи неінвазивні способи системного введення необхідної терапевтичної молекули. Крім того, химерні білки, що містять FcRn-зв'язувальний партнер, піддаються ендцитозу клітинами, експресуючими FcRn. Але замість того, щоб стати мішенню для руйнування, вказані химерні білки знов повертаються в циркуляцію, таким чином збільшуючи час напівжиття вказаних білків *in vivo*.

Частини константних ділянок імуноглобуліну, наприклад, FcRn-зв'язувальні партнери, звичайно зв'язані за допомогою дисульфідних зв'язків та інших неспецифічних взаємодій одного з одним, утворюючи димери і мультимери більш високого порядку. Даний винахід частково заснований на несподіваному відкритті того, що транзитоз химерних білків, що складаються з FcRn-зв'язувальних партнерів, мабуть, обмежений молекулярною масою химерного білка, при цьому форми з більш високою молекулярною масою транспортуються менш ефективно.

Химерні білки, що складаються з біологічно активних молекул, після введення звичайно будуть взаємодіяти з молекулою-мішенню або клітиною. Даний винахід, крім того, частково заснований на несподіваному відкритті того, що гібриди мономер-димер з однією біологічно активною молекулою, але з двома частинами константної ділянки імуноглобуліну, наприклад двома FcRn-зв'язувальними партнерами, функціонують і можуть транспортуватись більш ефективно, ніж гомодимери, також названі в даному описі просто «димери», або мультимери більш високого порядку з двома або більше копіями біологічно активної молекули.

Частково це є наслідком того факту, що химерні білки, які складаються з двох або більше біоло-

гічно активних молекул, які існують у вигляді димерів і мультимерів більш високого порядку, можуть мати стеричні перешкоди для взаємодії з молекулою-мішенню або клітиною внаслідок присутності двох або більше біологічно активних молекул в тісному сусідстві одна з одною, і що біологічна молекула може володіти високою афінністю до себе самої.

Відповідно, один аспект винаходу відноситься до химерних білків, що складаються з біологічно активної молекули, яка транспортується через епітеліальний бар'єр. Додатковий аспект винаходу відноситься до химерних білків, що складаються щонайменше з однієї біологічно активної молекули, яка здатна взаємодіяти зі своєю молекулою-мішенню або клітиною з невеликою стеричною перешкодою або самоагрегацією або за відсутності таких.

Аспекти винаходу відносяться до химерних білків, що містять перший і другий поліпептидні ланцюги, при цьому перший ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, де частина константної ділянки імуноглобуліну була модифікована так, щоб вона включала в себе біологічно активну молекулу, а другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, де частина константної ділянки імуноглобуліну не була модифікована таким чином, щоб вона містила біологічно активну молекулу першого ланцюга.

Суть винаходу

Винахід відноситься до химерного білка, що містить одну біологічно активну молекулу і дві молекули щонайменше частини константної ділянки імуноглобуліну. Химерний білок здатний взаємодіяти з молекулою-мішенню або клітиною з меншою стеричною перешкодою у порівнянні з химерним білком, що складається щонайменше з двох біологічно активних молекул і щонайменше частини двох константних ділянок імуноглобуліну. Винахід також відноситься до химерного білка, що містить щонайменше одну біологічно активну молекулу і дві молекули щонайменше частини константної ділянки імуноглобуліну, який транспортується через епітеліальний бар'єр більш ефективно, ніж відповідний гомодимер, тобто в якому обидва ланцюги зв'язані з однією і тією ж біологічно активною молекулою. Таким чином винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, де вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, а вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, але не містить варіабельної ділянки імуноглобуліну і не містить якої-небудь зв'язаної біологічно активної молекули.

Винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без варіабельної ділянки імуноглобуліну або якої-небудь біологі-

чно активної молекули і де вказаний другий ланцюг нековалентно зв'язаний з будь-якою молекулою, що має молекулярну масу більше 1 кДа, 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа або 20 кДа. В одному варіанті другий ланцюг нековалентно зв'язаний з будь-якою молекулою, що має молекулярну масу більше 0-2 кДа. В одному варіанті другий ланцюг нековалентно зв'язаний з будь-якою молекулою, що має молекулярну масу більше 5-10 кДа. В одному варіанті другий ланцюг нековалентно зв'язаний з будь-якою молекулою, що має молекулярну масу більше 15-20 кДа.

Винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, нековалентно зв'язану з будь-якою іншою молекулою, за винятком частини імуноглобуліну вказаного першого поліпептидного ланцюга.

Винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг складається щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну і необов'язкової афінної мітки.

Винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг по суті складається щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну і необов'язкової афінної мітки.

Винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, зв'язані разом, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без варіабельної ділянки імуноглобуліну або якої-небудь біологічно активної молекули і необов'язково молекулу з молекулярною масою менше 10 кДа, 5 кДа, 2 кДа або 1 кДа. В одному варіанті другий ланцюг містить молекулу менше 15-20 кДа. В одному варіанті другий ланцюг містить молекулу менше 5-10 кДа. В одному варіанті другий ланцюг містить молекулу менше 1-2 кДа.

Винахід відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу, щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і щонайменше перший домен, при цьому вказаний перший домен має щонайменше один специфічний зв'язувальний партнер, і в якому вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і щонайменше другий домен, де вказаний другий домен є специфічним партнером при зв'язуванні з вказаним першим доменом, без якої-

небудь варіабельної ділянки імуноглобуліну або біологічно активної молекули.

Винахід відноситься до способу одержання химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг не однакові, при цьому вказаний спосіб включає в себе трансфекцію клітини першою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує перший поліпептидний ланцюг, що містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і необов'язково лінкер, і другою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує другий поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без якої-небудь біологічно активної молекули або варіабельної ділянки імуноглобуліну і необов'язково лінкер, культивування клітин в таких умовах, за яких експресується поліпептидний ланцюг, що кодується першою конструкцією ДНК, і експресується поліпептидний ланцюг, що кодується другою конструкцією ДНК, і виділення гібридів мономер-димер, які складаються з поліпептидного ланцюга, що кодується першою конструкцією ДНК, і поліпептидного ланцюга, що кодується другою конструкцією ДНК.

Винахід відноситься до способу одержання химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг не однакові і в якому вказаний перший поліпептидний ланцюг містить біологічно активну молекулу, щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і щонайменше перший домен, при цьому вказаний перший домен має щонайменше один специфічний зв'язувальний партнер, і в якому вказаний другий поліпептидний ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і другий домен, де вказаний другий домен є специфічним партнером при зв'язуванні з вказаним першим доменом, без якої-небудь біологічно активної молекули або варіабельної ділянки імуноглобуліну, при цьому вказаний спосіб включає в себе трансфекцію клітини першою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує вказаний перший поліпептидний ланцюг, і другою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує вказаний другий поліпептидний ланцюг, культивування клітин в таких умовах, за яких експресується поліпептидний ланцюг, що кодується першою конструкцією ДНК, і експресується поліпептидний ланцюг, що кодується другою конструкцією ДНК, і виділення гібридів мономер-димер, які складаються з поліпептидного ланцюга, що кодується першою конструкцією ДНК, і поліпептидного ланцюга, що кодується другою конструкцією ДНК.

Винахід відноситься до способу одержання химерного білка згідно з винаходом, при цьому вказаний спосіб включає в себе трансфекцію клітини першою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує перший поліпептидний ланцюг, що містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і необов'язково лінкер, культивування клітини в таких умовах, за яких експресується по-

ліпептидний ланцюг, що кодується першою конструкцією ДНК, виділення поліпептидного ланцюга першою конструкцією, що кодується ДНК, і трансфекцію клітини другою конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує другий поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без якої-небудь біологічно активної молекули або варіабельної ділянки імуноглобуліну, культивування клітини в таких умовах, за яких експресується поліпептидний ланцюг, що кодується другою конструкцією ДНК, виділення поліпептидного ланцюга, що кодується другою конструкцією ДНК, об'єднання поліпептидного ланцюга, що кодується першою конструкцією ДНК, і поліпептидного ланцюга, що кодується другою конструкцією ДНК, в таких умовах, за яких утворюються гібриди мономер-димер, які містять поліпептидний ланцюг, що кодується першою конструкцією ДНК, поліпептидний ланцюг, що кодується другою конструкцією ДНК, і виділення вказаних гібридів мономер-димер.

Винахід відноситься до способу одержання химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг не є однаковими, при цьому вказаний спосіб включає в себе трансфекцію клітини конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, культивування клітин в таких умовах, за яких експресується поліпептидний ланцюг, що кодується конструкцією ДНК, з N-кінцевим цистеїном, так що утворюються димери поліпептидного ланцюга, виділення димерів, що складаються з двох копій поліпептидного ланцюга, що кодується конструкцією ДНК, і хімічну взаємодію виділених димерів з біологічно активною молекулою, при цьому вказана біологічно активна молекула має складний тіоефір на C-кінці, в таких умовах, за яких біологічно активна молекула взаємодіє переважно тільки з одним поліпептидним ланцюгом димеру, тим самим утворюючи гібрид мономер-димер.

Винахід відноситься до способу одержання химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг не є однаковими, при цьому вказаний спосіб включає в себе трансфекцію клітини конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, культивування клітин в таких умовах, за яких експресується поліпептидний ланцюг, що кодується конструкцією ДНК, з N-кінцевим цистеїном, так що утворюються димери поліпептидних ланцюгів, і виділення димерів, що містять дві копії поліпептидного ланцюга, що кодується конструкцією ДНК, і хімічну взаємодію виділених димерів з біологічно активною молекулою, при цьому вказана біологічно активна молекула має складний тіоефір на C-кінці, так що біологічно активна молекула зв'язується з кожним ланцюгом димеру, денатурацію димеру, що складається з частини імуноглобуліну, зв'язаного з

біологічно активною молекулою з утворенням мономерних ланцюгів, об'єднання мономерних ланцюгів з поліпептидним ланцюгом, що містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, яка не має зв'язаної з нею біологічно активної молекули, з утворенням гібридів мономер-димер і виділення гібридів мономер-димер.

Винахід відноситься до способу одержання химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг не є однаковими, при цьому вказаний спосіб включає в себе трансфекцію клітини конструкцією ДНК, що містить молекулу ДНК, яка кодує поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, культивування клітин в таких умовах, за яких експресується поліпептидний ланцюг, що кодується конструкцією ДНК, у вигляді суміші двох поліпептидних ланцюгів, де суміш містить поліпептид з N-кінцевим цистеїном і поліпептид з цистеїном поблизу N-кінця, виділення димерів, що складаються з суміші поліпептидних ланцюгів, які кодується конструкцією ДНК, і хімічну взаємодію виділених димерів з біологічно активною молекулою, при цьому вказана біологічно активна молекула має активний складний тіоефір, так що утворюються щонайменше декілька гібридів мономер-димер, і виділення гібриду мономер-димер з вказаної суміші.

Винахід відноситься до способу лікування захворювання або стану, що включає в себе введення химерного білка згідно з винаходом, завдяки чому лікують захворювання або стан.

Додаткові об'єкти і переваги винаходу будуть вказані частково в описі, який слідує далі, і частково будуть очевидними, виходячи з опису, або можуть бути досліджені при практичному здійсненні винаходу. Об'єкти і переваги винаходу будуть зрозумілі і досягнуті за допомогою елементів і комбінацій, детально вказаних у прикладеній формулі винаходу.

Потрібно розуміти, що і наведений вище загальний опис і докладний опис, який слідує далі, є тільки зразковими і пояснювальними і не обмежують винахід, який заявлений.

Короткий опис креслень

Фіг. 1 є схематичною діаграмою, що порівнює структуру гомодимеру EPO-Fc або димеру і структуру гібриду мономер-димер EPO-Fc.

На Фіг. 2a показана амінокислотна послідовність химерного білка фактор VII-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною, і пропептид (жирним шрифтом), який впізнається вітамін K-залежною γ -карбоксилазою, яка модифікує фактор VII з досягненням повної активності. Послідовність згодом розщеплюється PACE з одержанням фактор VII-Fc.

На Фіг. 2b показана амінокислотна послідовність химерного білка фактор IX-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною, і пропептид (жирним шрифтом), який впізнається вітамін K-залежною γ -карбоксилазою, яка модифікує фактор IX, з досягненням повної активності. Послідовність

згодом розщеплюється РАСЕ з одержанням фактор IX-Fc.

На Фіг. 2c показана амінокислотна послідовність химерного білка IFN α -Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого IFN α -Fc.

На Фіг. 2d показана амінокислотна послідовність химерного білка IFN α -Fc- Δ -лінкер. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого IFN α -Fc- Δ -лінкер.

На Фіг. 2e показана амінокислотна послідовність химерного білка Flag-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого Flag-Fa.

На Фіг. 2f показана амінокислотна послідовність химерного білка Еро-ССА-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого Еро-ССА-Fc. Також жирним шрифтом показаний кислий двоспіральний домен.

На Фіг. 2g показана амінокислотна послідовність химерного білка ССВ-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого ССВ-Fc. Також жирним шрифтом показаний основний двоспіральний домен.

На Фіг. 2h показана амінокислотна послідовність химерного білка Cys-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого Cys-Fc. Коли дана послідовність утворюється в клітинах CHO, деякий процент молекул неправильно розщеплюється сигнальною пептидазою, так що зліва від N-кінця є дві додаткові амінокислоти, тим самим перешкоджаючи зв'язуванню біологічно активної молекули з С-кінцевим тіоефіром (наприклад, за допомогою простого лігування). Коли вказані неправильно розщеплені форми димеризуються з правильно розщепленим Cys-Fc і потім зазнають взаємодії з біологічно активними молекулами з С-кінцевими тіоефірами, утворюються гібриди мономер-димер.

На Фіг. 2i показана амінокислотна послідовність химерного білка IFN α -GS15-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті зрілого IFN α -GS15-Fc.

На Фіг. 2j показана амінокислотна послідовність химерного білка Еро-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною з утворенням в результаті Еро-Fc. Також жирним шрифтом показаний 8-амінокислотний лінкер.

На Фіг. 3a показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка фактор VII-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений) і пропептид (жирним шрифтом), який впізнається вітамін К-залежною γ -карбоксилазою, яка модифікує фактор VII з досягненням повної активності. Послідовність, що транскрибується, потім розщеплюється РАСЕ з одержанням зрілого фактор VII-Fc.

На Фіг. 3b показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка фактор IX-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений) і пропептид (жирним шрифтом), який впізнається вітамін К-залежною γ -карбоксилазою, яка модифікує фактор IX з досягненням повної активності. Послідовність, що транскрибується, потім розщеплюється РАСЕ з одержанням зрілого фактор IX-Fc.

На Фіг. 3c показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка IFN α -Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого IFN α -Fc.

На Фіг. 3d показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка IFN α -Fc-лінкер. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого IFN α -Fc-лінкер.

На Фіг. 3e показана амінокислотна послідовність химерного білка Flag-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого Flag-Fc.

На Фіг. 3f показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка Еро-ССА-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого Еро-ССА-Fc. Також жирним шрифтом показаний кислий двоспіральний домен.

На Фіг. 3g показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка ССВ-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого ССВ-Fc. Також жирним шрифтом показаний основний двоспіральний домен.

На Фіг. 3h показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка Cys-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого Cys-Fc.

На Фіг. 3i показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка IFN α -GS15-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого IFN α -GS15-Fc.

На Фіг. 3j показана послідовність нуклеїнової кислоти химерного білка Еро-Fc. У послідовність включений сигнальний пептид (підкреслений), який відщеплюється клітиною після трансляції з утворенням в результаті зрілого Еро-Fc. Також жирним шрифтом показана послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує 8-амінокислотний лінкер.

Фіг. 4 показує шляхи утворення гібридів мономер-димер за допомогою звичайного лігування.

На Фіг. 5a показана амінокислотна послідовність Fc MESNA (SEQ ID NO:4).

На Фіг. 5b показана послідовність ДНК Fc MESNA (SEQ ID NO:5).

На Фіг. 6 наведено порівняння противірусної активності гомодимеру IFN α (тобто, що складається з 2 молекул IFN α) з активністю гібриду мономер

IFN α -димер (тобто, що складається з 1 молекули IFN α).

На Фіг. 7 наведене порівняння скипаючої активності химерного гібриду мономер-димер фактор VIIa-Fc (одна молекула фактора VII) і химерного гомодимеру фактор VIIa-Fc (дві молекули фактора VII).

На Фіг. 8 наведене порівняння перорального дозування у новонароджених щурів химерного гібриду мономер-димер фактор VIIa-Fc (одна молекула фактора VII) і химерного гомодимеру фактор VIIa-Fc (дві молекули фактора VII).

На Фіг. 9 наведене порівняння перорального дозування у новонароджених щурів химерного гібриду мономер-димер фактор IX-Fc (одна молекула фактора IX) і химерного гомодимеру.

На Фіг. 10 показане тимчасове дослідження, що порівнює химерний гібрид мономер-димер фактор IX-Fc (одна молекула фактора IX), що вводиться перорально новонародженим щурам, з химерним гомодимером, що вводиться перорально.

Фіг. 11 показує фармакокінетику димеру Еро-Fc у порівнянні з гібридом мономер-димер Еро-Fc у макак-крабодів після однократної легеневої дози.

На Фіг. 12 наведене порівняння сироваткової концентрації у мавп підшкірно введеного гібриду мономер-димер Еро-Fc і підшкірно введеного Aranesp® (дарбепетин альфа).

На Фіг. 13 наведене порівняння сироваткової концентрації у мавп внутрішньовенно введеного гібриду мономер-димер Еро-Fc і внутрішньовенно введеного Aranesp® (дарбепетин альфа) і Erogen® (епетин альфа).

На Фіг. 14 показана крива для колонки Mimetic Red 2™ (ProMetic LifeSciences, Inc., Wayne, NJ) і SDS-ПААГ-фракцій з колонки, що містять гібрид мономер-димер ЕроFc, димер ЕроFc і Fc. Гібрид мономер-димер ЕроFc виявлений у фракціях 11, 12, 13 і 14. Димер ЕроFc виявлений у фракції 18. Fc виявлений у фракціях 1/2.

На Фіг. 15 показана фармакокінетика IFN β Fc з 8-амінокислотним лінкером у макак-крабодів після однократної легеневої дози.

На Фіг. 16 показана стимуляція неоптерину у відповідь на гомодимер IFN β -Fc і гібрид мономер-димер IFN β -Fc N297A у макак-крабодів.

На Фіг. 17a показана нуклеотидна послідовність інтерферон β -Fc; на Фіг. 17b показана амінокислотна послідовність інтерферон β -Fc.

На Фіг. 18 показана амінокислотна послідовність T20(a); T21(b) і T1249(c).

Опис варіантів

A. Визначення

Афінна мітка у значенні, що використовується в даному описі, означає молекулу, зв'язану з другою молекулою, яка представляє інтерес, здатну взаємодіяти зі зв'язувальним партнером з метою виділення або ідентифікації вказаної другої молекули, яка представляє інтерес.

Аналоги химерних білків згідно з винаходом або білки, або пептиди, по суті ідентичні химерним білкам згідно з винаходом, у значенні, що викорис-

товується в даному описі, означають, що відповідна амінокислотна послідовність білка або пептиду щонайменше на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% або 100% ідентична даним послідовності. Як приклад такі послідовності можуть бути варіантами, одержаними з різних видів, або вони можуть бути одержані з даної послідовності за допомогою укорочення, делеції, заміни або додавання амінокислот. Процент ідентичності між двома амінокислотними послідовностями визначають з використанням стандартних алгоритмів вирівнювання, наприклад, за допомогою Basic Local Alignment Tool (BLAST), описаного в Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410, алгоритму Needleman et al. 1970, J. Mol. Biol., 48:444-453; алгоритму Meyers et al. 1988, Comput. Appl. Biosci., 4:11-17; або Tatusova et al. 1999, FEMS Microbiol. Lett., 174:247-250, і т.д. Такі алгоритми включені в програми BLASTN, BLASTP і «BLAST 2 Sequences» (дивіться

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). При використанні таких програм можна використати параметри за умовчанням. Наприклад, для нуклеотидних послідовностей можна використати наступні установки у випадку «BLAST 2 Sequences»: програма BLASTN, нагорода за збіг 2, штраф за неспівпадіння -2, штрафи за відкриття пропуску і подовження пропуску 5 і 2, відповідно, gap x_dropoff 50, очікування 10, розмір слова 11, фільтр ON. Для амінокислотних послідовностей можна використати наступні установки у випадку «BLAST 2 Sequences»: програма BLASTP, матриця BLOSUM62, штрафи за відкриття пропуску і подовження пропуску 11 і 1, відповідно, gap x_dropoff 50, очікування 10, розмір слова 3, фільтр ON.

Біодоступність у значенні, що використовується в даному, описі означає міру і швидкість, з якою речовина поглинається в живій системі або стає доступною у місці фізіологічної активності.

Біологічно активна молекула у значенні, що використовується в даному описі, означає неімунноглобулінову молекулу або її фрагмент, що забезпечує лікування захворювання або стану, або локалізацію або напрям молекули до місця захворювання або стану в організмі за допомогою здійснення функції або дії або стимулювання або відповіді на функцію, дію або реакцію в біологічному контексті (наприклад, в організмі, клітині або її моделі in vitro). Біологічно активні молекули можуть включати в себе щонайменше одну з наступних речовин: поліпептиди, нуклеїнові кислоти, малі молекули, такі як малі органічні або неорганічні молекули.

Химерний білок у значенні, що використовується в даному описі, відноситься до будь-якого білка, що складається з першої амінокислотної послідовності, одержаної з першого джерела, зв'язаної ковалентно або нековалентно з другою амінокислотою послідовністю, одержаною з другого джерела, де перше і друге джерела не є однаковими. Перше джерело і друге джерело, які не є однаковими, можуть включати два різних біологічних об'єкти або два різних білки з одного і того ж біологічного об'єкта або біологічний об'єкт і небіологічний об'єкт. Химерний білок може включати,

наприклад, білок, одержаний щонайменше з 2 різних біологічних джерел. Біологічне джерело може включати будь-яку несинтетично одержану послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислотну послідовність (наприклад, послідовність геномної або кДНК, плазмідний або вірусний вектор, нативний віріон або мутант або аналог, які описані далі в даному описі, будь-якого з вказаних вище). Синтетичне джерело може включати послідовність білка або нуклеїнової кислоти, одержану хімічно, а не в біологічній системі (наприклад, твердофазний синтез амінокислотних послідовностей). Химерний білок також може включати білок, одержаний щонайменше з 2 різних синтетичних джерел, або білок, одержаний щонайменше з одного біологічного джерела і щонайменше з одного синтетичного джерела. Химерний білок також може містити першу амінокислотну послідовність, одержану з першого джерела, ковалентно або нековалентно зв'язану з нуклеїновою кислотою, одержаною з будь-якого джерела, або малою органічною або неорганічною молекулою, одержаною з будь-якого джерела. Химерний білок може містити молекулу лінкера між першою і другою амінокислотними послідовностями або між першою амінокислотною послідовністю і нуклеїновою кислотою, або між першою амінокислотною послідовністю і малою органічною або неорганічною молекулою.

Фактор скипання у значенні, що використовується в даному описі, означає будь-яку молекулу або її аналог, природного походження або одержаної рекомбінантно, яка запобігає або знижує тривалість епізоду кровотечі у суб'єкта з гемостатичним порушенням. Іншими словами фактор скипання означає будь-яку молекулу, що володіє скипаючою активністю.

Скипаюча активність у значенні, що використовується в даному описі, означає здатність брати участь в каскаді біохімічних реакцій, який завершується утворенням згустка фібрину і/або зменшувати тяжкість, тривалість або частоту геморагії або епізоду кровотечі.

Димер у значенні, що використовується в даному описі, відноситься до химерного білка, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому і перший і другий ланцюги містять біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну. Гомодимер відноситься до димеру, в якому обидві біологічно активні молекули є однією і тією ж молекулою.

Димерно зв'язаний гібрид мономер-димер відноситься до химерного білка, що складається щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну, наприклад, фрагмента Fc імуноглобуліну, біологічно активної молекули і лінкера, який зв'язує їх разом, так що одна біологічно активна молекула зв'язана з 2 поліпептидними ланцюгами, кожна з яких містить частину константної ділянки імуноглобуліну. На Фіг. 4 показаний приклад димерно зв'язаного гібриду мономер-димер.

Конструкція ДНК у значенні, що використовується в даному описі, означає молекулу ДНК або клон такої молекули, або одонитковий, або двонитковий, яка була модифікована внаслідок втручання людини так, що вона містить ділянки ДНК,

об'єднані таким чином, щоб вони як ціле не могли б існувати в природі в іншому випадку. Конструкції ДНК містять інформацію, необхідну для керування експресією поліпептидів, що представляють інтерес. Конструкції ДНК можуть містити промотори, енансери і термінатори транскрипції. Конструкції ДНК, що містять інформацію, необхідну для керування секрецією поліпептиду, також будуть містити щонайменше одну сигнальну послідовність секреції.

Домен у значенні, що використовується в даному описі, означає ділянку поліпептиду (включаючи білки, в тому вигляді, як даний термін визначений), що має деяку відмітну фізичну властивість або роль, включаючи, наприклад, структуру із незалежним укладанням, що складається з ділянки поліпептидного ланцюга. Домен може містити послідовність з відмітною фізичною ознакою поліпептиду або може містити фрагмент з фізичною ознакою, яка зберігає свої зв'язувальні властивості (тобто він може зв'язуватись з другим доменом). Домен може бути зв'язаний з іншим доменом. Іншими словами, перший домен може в природних умовах зв'язуватись з другим доменом.

Фрагмент у значенні, що використовується в даному описі, відноситься до пептиду або поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 2 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 5 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 10 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 15 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 20 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 25 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 40 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 50 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, щонайменше 100 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним або щонайменше 200 амінокислотних залишків, які ідуть один за одним, або будь-яку делецію або укорочення білка, пептиду або поліпептиду.

Гемостаз у значенні, що використовується в даному описі, означає зупинення кровотечі або геморагії; або зупинення потоку крові через кровоносну судину або частину тіла.

Гемостатичний розлад у значенні, що використовується в даному описі, означає генетично успадкований або набутий стан, що характеризується тенденцією до геморагії, або спонтанно або внаслідок травми, або нездатністю утворювати згусток фібрину.

Зв'язана у значенні, що використовується в даному описі, відноситься до першої послідовності нуклеїнової кислоти, ковалентно зв'язаної з другою послідовністю нуклеїнової кислоти. Перша послідовність нуклеїнової кислоти може бути безпосередньо зв'язана або поміщена поряд з другою послідовністю нуклеїнової кислоти або, альтернативно, проміжна послідовність може ковалентно зв'язувати першу послідовність з другою послідовністю. Зв'язана у значенні, що використовується в даному описі, також може відноситися до першої амінокислотної послідовності, ковалентно зв'язаної з другою амінокислотною послідовністю.

тно або нековалентно зв'язаної з другою амінокислотною послідовністю. Перша амінокислотна послідовність може бути безпосередньо зв'язана або поміщена поряд з другою амінокислотною послідовністю або, альтернативно, проміжна послідовність може ковалентно зв'язувати першу амінокислотну послідовність з другою амінокислотною послідовністю.

Оперативно зв'язана у значенні, що використовується в даному описі, означає, що перша послідовність нуклеїнової кислоти зв'язана з другою послідовністю нуклеїнової кислоти так, що обидві послідовності здатні експресуватись у вигляді біологічно активного білка або пептиду.

Поліпептид у значенні, що використовується в даному описі, відноситься до полімеру амінокислот і не має відношення до конкретної довжини продукту; таким чином, пептиди, олігопептиди і білки включені у визначення поліпептиду. Даний термін не виключає постекспресійні модифікації поліпептиду, наприклад, глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування, пегілювання, додавання ліпідного залишку або додавання будь-якої органічної або неорганічної молекули. У визначення включені, наприклад, поліпептиди, що містять один або декілька аналогів амінокислоти (включаючи, наприклад, неприродні амінокислоти), і поліпептиди із заміщеними зв'язками, а також іншими модифікаціями, відомими в даній галузі, як такі, що зустрічаються в природі, так і такі, що не зустрічаються в природі.

Висока жорсткість у значенні, що використовується в даному описі, включає умови, що легко визначаються фахівцем в даній галузі на основі, наприклад, довжини ДНК. Загалом такі умови визначені в Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), і включають застосування розчину для попереднього промивання нітроцелюлозних фільтрів 5×SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), умови гібридизації в 50% формаміді, 6×SSC при 42°C (або іншому схожому розчині для гібридизації, такому як розчин Старка, в 50% формаміді при 42°C), і з промиванням приблизно при 68°C, 0,2×SSC, 0,1% SDS. Фахівцеві в даній галузі буде відомо, що температуру і концентрацію солі в розчині для промивання можна коректувати так, як це необхідно відповідно до таких факторів, як довжина зонду.

Помірна жорсткість у значенні, що використовується в даному описі, включає умови, які можуть бути легко визначені фахівцем в даній галузі на основі, наприклад, довжини ДНК. Основні умови наведені в Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), і включають застосування розчину для попереднього промивання нітроцелюлозних фільтрів 5×SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), умови гібридизації у 50% формаміді, 6×SSC при 42°C (або іншому схожому розчині для гібридизації, такому як розчин Старка, в 50% формаміді при 42°C), і умови промивання при 60°C, в 0,5×SSC, 0,1% SDS.

Мала неорганічна молекула у значенні, що використовується в даному описі, означає молекулу,

що не містить атомів вуглецю і має розмір не більше 50 кДа.

Мала органічна молекула у значенні, що використовується в даному описі, означає молекулу, що містить щонайменше один атом вуглецю і має розмір не більше 50 кДа.

Лікувати, лікування, здійснення лікування у значенні, що використовується в даному описі, означає будь-яке з наступного: зменшення тяжкості захворювання або стану; зменшення тривалості перебігу захворювання; ослаблення одного або декількох симптомів, пов'язаних із захворюванням або станом; надання благотворної дії на суб'єкта із захворюванням або станом без обов'язкового зцілення захворювання або стану, профілактику одного або декількох симптомів, пов'язаних із захворюванням або станом.

В. Удосконалення, що пропонуються деякими варіантами здійснення винаходу

У винаході пропонуються химерні білки (гібриди мономер-димер), що містять перший і другий поліпептидні ланцюги, в яких вказаний перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і вказаний другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без якої-небудь біологічно активної молекули або варіабельної ділянки імуноглобуліну. На Фіг. 1 зіставлені традиційні злиті білкові димери з одним прикладом гібриду мономер-димер згідно з винаходом. У даному варіанті біологічно активною молекулою є EPO і частина імуноглобуліну являє собою Fc-ділянку IgG.

Подібно іншим химерним білкам, що складаються щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну, винахід відноситься до химерних білків, які забезпечують підвищену стабільність і підвищену біодоступність химерного білка у порівнянні з окремою біологічно активною молекулою. Однак крім того, оскільки тільки один з двох ланцюгів містить біологічно активну молекулу, химерний білок має меншу молекулярну масу, ніж химерний білок, в якому всі ланцюги містять біологічно активну молекулу, і не бажаючи при цьому бути прив'язаними до якої-небудь теорії, це може приводити до химерного білка, що більш легко піддається трансцитозу через епітеліальний бар'єр, наприклад, за допомогою зв'язування з рецептором FcRn, таким чином підвищуючи час напівжиття химерного білка. Таким чином, в одному варіанті винахід відноситься до поліпшеного неінвазивного способу (наприклад, через будь-яку поверхню слизової оболонки, а саме пероральним, букальним, під'язиковим, назальним, ректальним, вагінальним або легеневим або очним шляхами) введення терапевтичного химерного білка згідно з винаходом. Таким чином, винахід відноситься до способів досягнення терапевтичних рівнів химерних білків згідно з винаходом з використанням менш частих і більш низьких доз у порівнянні з раніше описаними химерними білками (наприклад, химерними білками, що складаються щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну і біологічно активної молекули, в яких всі

ланцюги химерного білка містять біологічно активну молекулу).

В іншому варіанті винахід відноситься до інвазивного способу, наприклад, підшкірного, внутрішньовенного введення терапевтичного химерного білка згідно з винаходом. Інвазивне введення терапевтичного химерного білка згідно з винаходом забезпечує підвищений час напівжиття терапевтичного химерного білка, що в результаті приводить до застосування менш частих і більш низьких доз у порівнянні з раніше описаними химерними білками (наприклад, химерними білками, що складаються щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну і біологічно активної молекули, в яких всі ланцюги химерного білка містять біологічно активну молекулу).

Ще однією перевагою химерного білка, в якій тільки один з ланцюгів містить біологічно активну молекулу, є підвищена доступність біологічно активної молекули для її клітини-мішені або молекули-мішені, виникаюча внаслідок зменшених стеричних перешкод, зменшених гідрофобних взаємодій, зменшених іонних взаємодій або зниженої молекулярної маси у порівнянні з химерним білком, в якому всі ланцюги містять біологічно активну молекулу.

С. Химерні білки

Винахід відноситься до химерних білків, що містять одну біологічно активну молекулу, щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і необов'язково щонайменше один лінкер. Частина імуноглобуліну буде мати N- або амінокінець і C- або карбоксильний кінець. Химерний білок може мати біологічно активну молекулу, зв'язану з N-кінцем частини імуноглобуліну. Альтернативно, біологічно активна молекула може бути зв'язана з C-кінцем частини імуноглобуліну. В одному варіанті зв'язок є ковалентним зв'язком. В іншому варіанті зв'язок є нековалентним зв'язком.

Химерний білок необов'язково може містити щонайменше один лінкер; таким чином, біологічно активна молекула не повинна бути безпосередньо зв'язана з частиною константної ділянки імуноглобуліну. Лінкер може розташовуватись між біологічно активною молекулою і частиною константної ділянки імуноглобуліну. Лінкер може бути зв'язаний з N-кінцем частини константної ділянки імуноглобуліну або C-кінцем частини константної ділянки імуноглобуліну. Якщо біологічно активна молекула складається щонайменше з однієї амінокислоти, то біологічно активна молекула буде мати N-кінець і C-кінець, і лінкер може бути зв'язаний з N-кінцем біологічно активної молекули або C-кінцем біологічно активної молекули.

Винахід відноситься до химерного білка формули $X-L_a-F:F$ або $F:F-L_a-X$, де X означає біологічно активну молекулу, L означає необов'язковий лінкер, F означає щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і a є будь-яким цілим числом або нулем. Винахід також відноситься до химерного білка формули $T_a-X-L_a-F:F$ або $T_a-F:F-L_a-X$, де X означає біологічно активну молекулу, L означає необов'язковий лінкер, F означає щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, а є будь-яким цілим числом або нулем, T озна-

чає другий лінкер або, альтернативно, мітку, яка може бути використана для полегшення очищення химерного білка, наприклад, FLAG-мітка, гістидинова мітка, GST-мітка, мітка у вигляді зв'язуючого мальтозу білка і (:) означає хімічну асоціацію, наприклад, щонайменше один непептидний зв'язок. У деяких варіантах хімічна асоціація, тобто (:) є ковалентним зв'язком. В інших варіантах хімічна асоціація, тобто (:), є нековалентною взаємодією, наприклад, іонною взаємодією, гідрофобною взаємодією, гідрофільною взаємодією, взаємодією Ван-дер-Ваальса, водневим зв'язком. Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що коли a дорівнює нулю, X буде безпосередньо зв'язаний з F. Таким чином, наприклад, a може дорівнювати 0, 1, 2, 3, 4, 5 або бути більше 5.

В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2a (SEQ ID NO:6). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2b (SEQ ID NO:8). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2c (SEQ ID NO:10). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2d (SEQ ID NO:12). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2e (SEQ ID NO:14). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2f (SEQ ID NO:16). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2g (SEQ ID NO:18). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2h (SEQ ID NO:20). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2i (SEQ ID NO:22). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 2j (SEQ ID NO:24). В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить амінокислотну послідовність, показану на Фіг. 17b (SEQ ID NO:27).

1. Варіанти химерних білків

Розглядаються похідні химерних білків згідно з винаходом, антитіла проти химерних білків згідно з винаходом і антитіла проти зв'язувальних партнерів химерних білків згідно з винаходом, і вони можуть бути одержані зміною їх амінокислотних послідовностей за допомогою заміни, приєднання і/або делецій/укорочень або за допомогою введення хімічної модифікації, яка приводить до функціонально еквівалентних молекул. Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що деякі амінокислоти в послідовності будь-якого білка можуть бути замінені іншими амінокислотами без несприятливого впливу на активність білка.

Отже, можуть бути здійснені різні зміни в амінокислотних послідовностях химерних білків згідно з винаходом або в кодуючих послідовностях ДНК без суттєвої втрати їх біологічної активності, функції або застосовності. Похідні, аналоги або мутанти, які виникають внаслідок таких змін, і застосу-

вання таких похідних входить в об'єм даного винаходу. У конкретному варіанті похідне є функціонально активним, тобто здатним виявляти одну або декілька активностей, зв'язаних з химерними білками згідно з винаходом, наприклад, зв'язування FcRn, інгібування вірусів, гемостаз, продукція червоних кров'яних клітин. Багато аналізів, що дозволяють тестувати активність химерного білка, який містить біологічно активну молекулу, відомі в даній галузі. У тому випадку, коли біологічно активна молекула є інгібітором ВІЛ, активність можна тестувати вимірюванням активності оберненої транскриптази, використовуючи відомі способи (дивіться, наприклад, Barre-Sinoussi et al. 1983, Science 220:868; Gallo et al. 1984, Science 224:500). Альтернативно, активність можна виміряти за допомогою вимірювання фузогенної активності (дивіться,

наприклад, Nussbaum et al. 1994, J. Virol. 68 (9):5411). У тому випадку, коли біологічною активністю є гемостаз, може бути здійснений аналіз StaClot FVIIa-rTF, щоб оцінити активність похідних фактора VIIa (Johannessen et al. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11:5159).

Замінники амінокислот в послідовності можуть бути вибрані з інших представників класу, до якого відноситься амінокислота (дивіться таблицю 1). Крім того, різні амінокислоти звичайно замінюють нейтральними амінокислотами, наприклад, аланіном, лейцином, ізолейцином, валіном, проліном, фенілаланіном, триптофаном і метіоніном (дивіться, наприклад, MacLennan et al. 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki et al. 1998, Adv. Biophys. 35:1-24).

Таблиця 1

Вихідний залишок	Зразкові заміни	Типові заміни
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Leu
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин, He, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-діаміномасляна кислота, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин	Leu

2. Біологічно активні молекули

Винахід передбачає застосування будь-якої біологічно активної молекули як терапевтичної молекули згідно з винаходом. Біологічно активною молекулою може бути поліпептид. Біологічно активною молекулою може бути одна амінокислота. Біологічно активна молекула може включати в себе модифікований поліпептид.

Біологічно активна молекула може включати в себе ліпідну молекулу (наприклад, стероїд або холестерин, жирну кислоту, триацилгліцерин, гліцерофосфоліпід або сфінголіпід). Біологічно активна молекула може включати в себе молекулу цукру (наприклад, глюкозу, сахарозу, манозу). Біологічно активна молекула може включати в себе молекулу нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК, РНК). Біологічно активна молекула може включати в себе малу органічну молекулу або малу неорганічну молекулу.

а. Цитокіни і фактори росту

В одному варіанті біологічно активною молекулою є фактор росту, гормон або цитокін або їх аналог або фрагмент. Біологічно активною молекулою може бути будь-який агент, здатний індукувати зростання і проліферацію клітин. У конкретному варіанті біологічно активною молекулою є будь-який агент, який може індукувати проліферацію еритроцитів. Таким чином, один з прикладів біологічно активної молекули, що пропонується у винаході, є ЕРО. Біологічно активна молекула також може включати, без обмеження, RANTES, MIP1 α , MIP1 β , IL-2, IL-3, GM-CSF, гормон росту, фактор некрозу пухлин (наприклад, TNF α або β).

Біологічно активна молекула може включати інтерферон α , одержаний або синтетично, або рекомбінантно, включаючи, без обмеження, будь-який з приблизно двадцяти п'яти структурно споріднених підтипів, як, наприклад, інтерферон- α 2a, новий комерційно доступний для клінічного застосування (Roferon®, Roche) та інтерферон- α 2b, також схвалений для клінічного застосування (Intron®, Schering), а також генетично сконструйовані варіанти різних підтипів, включаючи, але не обмежуючи вказаним, комерційно доступний консенсусний інтерферон α (Infergen®, Intermune,

розроблений Amgen) і консенсусний інтерферон лейкоцитів людини, дивіться, наприклад, патенти США №№ 4695623, 4897471, інтерферон β , епідеміальний фактор росту, гонадотролін-рилізінг гормон (GnRH), лейпролід, фолікулостимулюючий гормон, прогестерон, естроген або тестостерон.

Список цитокінів і факторів росту, які можуть бути використані в химерному білку згідно з винаходом, описаний раніше (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

б. Протівірусні агенти

В одному варіанті біологічно активною молекулою є протівірусний агент, включаючи його фрагменти і аналоги. Протівірусний агент може включати будь-яку молекулу, яка інгібує або запобігає реплікації вірусів, або інгібує або запобігає проникненню вірусу в клітину, або інгібує або запобігає виходу вірусу з клітини. В одному варіанті протівірусним агентом є інгібітор злиття. В одному варіанті протівірусним агентом є цитокін, який інгібує реплікацію вірусів. В іншому варіанті протівірусним агентом є інтерферон α .

Інгібітором злиття вірусів для застосування в химерному білку може бути будь-яка молекула, яка знижує або запобігає проникненню вірусу через клітинну мембрану клітини-мішені. Інгібітором злиття вірусів може бути будь-яка молекула, яка зменшує або запобігає утворенню синцитіїв щонайменше між двома чутливими клітинами. Інгібітором злиття вірусів може бути будь-яка молекула, яка знижує або запобігає зв'язуванню ліпідної бішарової мембрани еукаріотичної клітини і ліпідного бішару вірусу, що має оболонку. Приклади вірусу, покритого оболонкою, включають, але не обмежують вказаним ВІЛ-1, ВІЛ-2, SIV, вірус грипу, парагрипу, вірус Епштейн-Барра, CMV, вірус простого герпесу 1, вірус простого герпесу 2 і респіраторно-синцитіальний вірус.

Інгібітором злиття вірусів може бути будь-яка молекула, яка зменшує або запобігає злиттю вірусів, включаючи, без обмеження, поліпептид, малу органічну молекулу або малу неорганічну молекулу. В одному варіанті інгібітором злиття є поліпептид. В одному варіанті інгібітором злиття вірусів є поліпептид довжиною 3-36 амінокислот. В іншому варіанті інгібітором злиття вірусів є поліпептид довжиною 3-50 амінокислот, 10-65 амінокислот, 10-75 амінокислот. Поліпептид може складатись з амінокислотної послідовності (наприклад, фрагмент gp41), що зустрічається в природі, включаючи її аналоги і мутанти, або поліпептид може складатись з амінокислотної послідовності, що не зустрічається в природі, за умови, що поліпептид виявляє активність інгібітору злиття вірусів.

В одному варіанті інгібітором злиття вірусів є поліпептид, ідентифікований як інгібітор злиття вірусів з використанням щонайменше одного комп'ютерного алгоритму, наприклад, ALLMOTI5, 107×178×4 і PLZIP (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6013263, 6015881, 6017536, 6020459, 606065, 6068973, 6093799 і 6228983).

В одному варіанті інгібітором злиття вірусів є інгібітор злиття ВІЛ. В одному варіанті ВІЛ являє собою ВІЛ-1. В іншому варіанті ВІЛ являє собою

ВІЛ-2. В одному варіанті інгібітором злиття ВІЛ є поліпептид, що складається з фрагмента білка оболонки gp41 ВІЛ-1. Інгібітор злиття ВІЛ може містити, наприклад, T20 (SEQ ID NO:1) або його аналог, T21 (SEQ ID NO:2) або його аналог, T1249 (SEQ ID NO:3) або його аналог, N_{CCG}gp41 (Louis et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:(31) 29485) або його аналог або 5-helix (Root et al. 2001, Science 291:884) або його аналог.

Аналізи, відомі в даній галузі, можна використати для того, щоб тестувати інгібуючу злиття вірусів активність поліпептиду, малої органічної молекули або малої неорганічної молекули. Такі аналізи включають аналіз оберненої транскриптази, аналіз p24 або аналіз утворення синцитіїв (дивіться, наприклад, патент США № 5464933).

Список протівірусних агентів, які можна використати в химерному білку згідно з винаходом, описаний раніше (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

с. Гемостатичні агенти

В одному варіанті біологічно активною молекулою є фактор скипання або інший агент, який стимулює гемостаз, включаючи його фрагменти і аналоги. Фактор скипання крові може включати будь-яку молекулу, яка володіє скипаючою активністю або активує молекулу, що володіє скипаючою активністю. Фактор скипання крові може складатись з поліпептиду. Фактором скипання крові може бути, наприклад, без обмеження, фактор VIII, фактор IX, фактор XI, фактор XII, фібрिनотен, протромбін, фактор V, фактор VII, фактор X, фактор XIII або фактор фон Віллебранда. В одному варіанті фактором скипання крові є фактор VII або фактор VIIa, фактором скипання крові може бути фактор, який бере участь у зовнішньому шляху скипання крові. Фактором скипання крові може бути фактор, який бере участь у внутрішньому шляху скипання крові. Альтернативно, фактором скипання крові може бути фактор, який бере участь як у зовнішньому, так і у внутрішньому шляху.

Фактором скипання крові може бути фактор скипання крові людини або фактор скипання крові тварини, яка відрізняється від людини, наприклад, одержаний від приматів, які відрізняються від людини, свині або будь-якого ссавця. Фактором скипання крові може бути химерний фактор скипання крові, наприклад, фактор скипання крові може містити частину фактора скипання крові людини і частину фактора скипання крові свині або частину першого фактора скипання крові тварини, яка відрізняється від людини, і частину другого фактора скипання крові тварини, яка відрізняється від людини.

Фактором скипання крові може бути активований фактор скипання крові. Альтернативно, фактором скипання крові може бути неактивна форма фактора скипання крові, наприклад, зимоген. Неактивний фактор скипання крові може зазнавати активації після зв'язування щонайменше з частиною константної ділянки імуноглобуліну. Неактивний фактор скипання крові може бути активований після введення суб'єкту. Альтернативно, неактив-

ний фактор скипання крові може бути активований перед введенням.

У деяких варіантах може бути використана ендопептидаза, наприклад, фермент, що розщеплює спарені основні амінокислоти (PACE), або будь-який представник сімейства PACE, такий як PCSK1-9, включаючи його укорочені варіанти, або його дріжджовий еквівалент Kex2 з *S. cerevisiae* і укорочені варіанти Kex2 (Kex2 1-675) (дивіться, наприклад, патенти США №№ 5077204, 5162220, 5234830, 5885821, 6329176), щоб відщепити пропептид з утворення зрілого химерного білка згідно з винаходом (наприклад, фактора VII, фактора IX).

d. Інші білкові біологічно активні молекули

В одному варіанті біологічно активною молекулою є рецептор або його фрагмент або аналог. Рецептор може бути експресований на поверхні клітини або, альтернативно, рецептор може бути експресований всередині клітини. Рецептор може бути вірусним рецептором, наприклад, CD4, CCR5, CXCR4, CD21, CD46. Біологічно активною молекулою може бути бактеріальний рецептор. Біологічно активною молекулою може бути білок позаклітинного матриксу або його фрагмент або аналог, важливий для колонізації бактерій та інфекції (дивіться, наприклад, патенти США №№ 5648240, 5189015, 5175096) або білок поверхні бактерій, важливий для адгезії та інфекції (дивіться, наприклад, патент США № 5648240). Біологічно активною молекулою може бути рецептор фактора росту, гормону або цитокіну або його фрагмент або аналог, наприклад, рецептор TNF α , рецептор еритропоетину, CD25, CD122 або CD132.

Список інших білкових молекул, які можна використати в химерному білку згідно з винаходом, описаний раніше (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 6485726, 6030613, WO 03/077834; US2003-0235536A1).

e. Нуклеїнові кислоти

В одному варіанті біологічно активною молекулою є нуклеїнова кислота, наприклад, ДНК, РНК. В одному конкретному варіанті біологічно активною молекулою є нуклеїнова кислота, яка може бути використана в інтерференції РНК (RNAi). Молекула нуклеїнової кислоти може являти собою як приклад, але не обмежуючи вказаним, антисмислову молекулу або рибозим або аптамер.

Молекули антисмислової РНК і ДНК діють, прямо блокуючи трансляцію мРНК за допомогою гібридизації з мРНК-мішенню і запобігаючи трансляції білка. Способи на основі антисмислових послідовностей полягають в конструюванні олігонуклеотидів, які комплементарні мРНК гена-мішені. Антисмислові олігонуклеотиди будуть зв'язуватись з комплементарними мРНК-транскриптами гена-мішені і запобігати трансляції. Абсолютна комплементарність не потрібна.

Послідовність «комплементарна» частині РНК, у значенні, що використовується в даному описі, означає послідовність, що володіє достатньою комплементарністю, щоб бути здатною гібридуватись з РНК, утворюючи стабільний дуплекс; таким чином у випадку двониткових антисмислових

нуклеїнових кислот може бути тестована одна нитка ДНК-дуплексу або може бути досліджене утворення триплексу. Здатність гібридуватись буде залежати як від міри комплементарності, так і від довжини антисмислової нуклеїнової кислоти. Загалом, чим довше нуклеїнова кислота, яка гібридується, тим більше основ, що помилково паруються з РНК, вона може містити і все ще утворювати стабільний дуплекс (або триплекс, в залежності від обставин). Фахівець в даній галузі може з'ясувати прийнятну міру помилкового спарювання, використовуючи стандартні способи визначення точки плавлення гібридизованого комплексу.

Антисмислові нуклеїнові кислоти повинні мати щонайменше шість нуклеотидів в довжину і переважно є олігонуклеотидами довжиною в межах від 6 до приблизно 50 нуклеотидів. У конкретних аспектах олігонуклеотид має щонайменше 10 нуклеотидів, щонайменше 17 нуклеотидів, щонайменше 25 нуклеотидів або щонайменше 50 нуклеотидів.

Олігонуклеотиди можуть бути ДНК або РНК або їх химерними сумішами або похідними або модифікованими варіантами, одонитковими або двонитковими. Олігонуклеотид може бути модифікований по залишку основи, залишку цукру або фосфатному кістяку, наприклад, щоб підвищити стабільність молекули, гібридизацію і т.д. Олігонуклеотид може включати в себе інші бічні групи, такі як поліпептиди (наприклад, для націлювання на рецептори клітин-хазяїнів *in vivo*), або агенти, які сприяють транспорту через клітинну мембрану (дивіться, наприклад, Letsinger et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553; Lemaitre et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648; WO 88/09810), або гематоенцефалічний бар'єр (дивіться, наприклад, WO 89/10134), агенти для розщеплення, що запускається гібридизацією (дивіться, наприклад, Krol et al. 1988, BioTechniques 6:958) або інтеркалюючі агенти (дивіться, наприклад, Zon 1988, Pharm. Res. 5:539). З цією метою олігонуклеотид може бути кон'югований з іншою молекулою, наприклад, поліпептидом, агентом для перехресного зшивання, що запускається гібридизацією, транспортуючим агентом або агентом розщеплення, що запускається гібридизацією.

Молекули рибозимів, сконструйовані для каталітичного розщеплення транскриптів мРНК гена-мішені, також можна використати для того, щоб запобігти трансляції мРНК гена-мішені і, отже, експресії продукту гена-мішені (дивіться, наприклад, WO 90/11364; Sarver et al. 1990, Science 247, 1222-1225).

Рибозими є молекулами ферментної РНК, здатними каталізувати специфічне розщеплення РНК (дивіться Rossi 1994, Current Biology 4:469). Механізм дії рибозимів полягає у специфічній для послідовності гібридизації молекули рибозиму з комплементарною РНК-мішенню з подальшою подією ендонуклеолітичного розщеплення. До складу молекул рибозимів можуть входити одна або декілька послідовностей, комплементарних мРНК гена-мішені, і повинна входити добре відома каталітична послідовність, відповідальна за роз-

щеплення мРНК. Відносно вказаної послідовності дивіться, наприклад, патент США № 5093246.

В одному варіанті рибозими, які розщеплюють мРНК в сайт-специфічно упізнаних послідовностях, можна використати для руйнування мРНК генів-мішеней. В іншому варіанті передбачається застосування рибозимів типу «головки молота». Рибозими типу «головки молота» розщеплюють мРНК в положеннях, продиктованих фланкуючими ділянками, які утворюють комплементарні пари основ з мРНК-мішенню. Єдиною вимогою є, щоб мРНК-мішень мала наступну послідовність з двох основ: 5'-UG-3'. Конструювання і одержання рибозимів типу «головки молота» добре відоме в даній галузі і описане більш повно в Myers 1995, *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, New York, і в Haseloff and Gerlach 1988, *Nature*, 334:585.

f. Малі молекули

Винахід також передбачає застосування будь-якої терапевтичної малої молекули або лікарського засобу як біологічно активної молекули в химерному білку згідно з винаходом. Список малих молекул і лікарських засобів, які можна використати в химерному білку згідно з винаходом, описаний раніше (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 6485726, 6030613, WO 03/077834, US2003-0235536A1).

2. Імуноглобуліни

Химерні білки згідно з винаходом містять щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну. Імуноглобуліни складаються з чотирьох білкових ланцюгів, які зв'язані ковалентно - двох важких ланцюгів і двох легких ланцюгів. Кожний ланцюг, крім того, складається з однієї варіабельної ділянки і однієї константної ділянки. В залежності від ізотипу імуноглобуліну константна ділянка важкого ланцюга складається з 3 або 4 доменів константної ділянки (наприклад, CH1, CH2, CH3, CH4). Деякі ізотипи, крім того, містять шарнірну ділянку.

Частина константної ділянки імуноглобуліну може бути одержана від будь-якого ссавця. Частина константної ділянки імуноглобуліну може входити в частину константної ділянки імуноглобуліну людини, константної ділянки імуноглобуліну приматів, які відрізняється від людини, константної ділянки бичачого імуноглобуліну, константної ділянки імуноглобуліну свині, константної ділянки імуноглобуліну миші, константної ділянки імуноглобуліну вівці або константної ділянки імуноглобуліну щура.

Частина константної ділянки імуноглобуліну може бути одержана рекомбінантно або шляхом синтезу. Імуноглобулін може бути виділений з бібліотеки кДНК. Частина константної ділянки імуноглобуліну може бути виділена з фагової бібліотеки (дивіться, наприклад, McCafferty et al. 1990, *Nature* 348:552; Rang et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363; EP 0589877 B1). Частина константної ділянки імуноглобуліну може бути одержана перетасуванням генів з відомими послідовностями (Mark et al. 1992, *BioTechnol.* 10:779). Частина константної ділянки імуноглобуліну може бути ви-

ділена за допомогою рекомбінації *in vivo* (Waterhouse et al. 1993, *Nucl. Acid Res.* 21:2265). Імуноглобулін може бути гуманізованим імуноглобуліном (патент США № 5585089, Jones et al. 1986, *Nature* 332:323).

Частина константної ділянки імуноглобуліну може включати в себе частину IgG, IgA, IgM, IgD або IgE. В одному варіанті імуноглобулін є IgG. В іншому варіанті імуноглобулін є IgG1. В іншому варіанті імуноглобулін є IgG2.

Частина константної ділянки імуноглобуліну може включати в себе повну константну ділянку важкого ланцюга або її фрагмент або аналог. В одному варіанті константна ділянка важкого ланцюга може містити домен CH1, домен CH2, домен CH3 і/або шарнірну ділянку. В іншому варіанті константна ділянка важкого ланцюга може містити домен CH1, домен CH2, домен CH3 і/або домен CH4.

Частина константної ділянки імуноглобуліну може містити фрагмент Fc. Фрагмент Fc може складатись з доменів CH2 і CH3 імуноглобуліну і шарнірної ділянки імуноглобуліну. Фрагмент Fc може являти собою фрагмент Fc IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. В одному конкретному варіанті частина константної ділянки імуноглобуліну являє собою фрагмент Fc IgG1. В іншому варіанті частина константної ділянки імуноглобуліну являє собою фрагмент Fc IgG2.

В іншому варіанті частину константної ділянки імуноглобуліну являє собою зв'язувальний партнер неонатального рецептора Fc (FcRn). FcRn-зв'язувальним партнером є будь-яка молекула, яка може бути специфічно зв'язана рецептором FcRn з подальшим активним транспортом рецептором FcRn FcRn-зв'язувального партнера. Специфічно зв'язаний відноситься до двох молекул, які утворюють комплекс, який є відносно стабільним у фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування характеризується високою афінністю і від низької до помірної місткістю, що відрізняються від неспецифічного зв'язування, яке звичайно має низьку афінність при місткості від помірної до високої. Звичайно зв'язування вважають специфічним, коли константа афінності K_d вище 10^6 M^{-1} або більше, переважно вище 10^8 M^{-1} . За необхідності неспецифічне зв'язування може бути зменшене без істотного впливу на специфічне зв'язування варіюванням умов зв'язування. Відповідні умови зв'язування, такі як концентрація молекул, іонна сила розчину, температура, час, дозволений для зв'язування, концентрація блокуючого агента (наприклад, сироваткового альбуміну, казеїну молока) і т.д., можуть бути оптимізовані фахівцем в даній галузі з використанням звичайних способів.

Рецептор FcRn був виділений з декількох видів ссавців, включаючи людину. Послідовності FcRn людини, FcRn мавп, FcRn щурів і FcRn мишей відомі (Story et al. 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). Рецептор FcRn зв'язує IgG (але не інші класи імуноглобулінів, такі як IgA, IgM, IgD і IgE) при відносно низькому рН, активно транспортує IgG трансклітинним шляхом в просвіт в напрямі серозної оболонки і потім вивільняє IgG при відносно більш високому рН, виявленому в інтерстиція-

льних рідинах. Він експресується в епітеліальній тканині дорослого організму (патенти США №№ 6485726, 6030613, 6086875, WO 03/077834; US2003-0235536A1), включаючи епітелій легень і кишечника (Israel et al. 1997, *Immunology* 92:69), епітелій проксимальних ниркових каналців (Kobayashi et al. 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), а також епітелій носа, вагінальні поверхні і поверхні жовчного дерева.

FcRn-зв'язувальні партнери згідно з даним виходом охоплюють будь-яку молекулу, яка може бути специфічно зв'язана рецептором FcRn, включаючи цілий IgG, Fc-фрагмент IgG та інші фрагменти, які містять повну ділянку зв'язування рецептора FcRn. Ділянка Fc-частини IgG, яка зв'язується з рецептором FcRn, була описана рентгенівською кристалографією (Burmeister et al. 1994, *Nature* 372:379). Основна ділянка контакту Fc з FcRn розташована поблизу з'єднання доменів CH2 і CH3. Всі контакти Fc-FcRn знаходяться в одному важкому ланцюгу Ig. FcRn-зв'язувальні партнери включають повний IgG, Fc-фрагмент IgG та інші фрагменти IgG, які містять повну ділянку зв'язування FcRn. Основні місця контакту включають в себе амінокислотні залишки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 і 314 домену CH2 і амінокислотні залишки 385-387, 428 і 433-436 домену CH3. Всі посилення, зроблені на нумерацію амінокислот імуноглобулінів або фрагментів імуноглобулінів або ділянок, засновані на Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda, MD.

Fc-ділянка IgG може бути модифікована відповідно до добре відомих способів, таких як сайт-направлений мутагенез і тому подібні, щоб одержати модифікований IgG або його Fc-фрагменти або частини, які будуть зв'язуватись рецептором FcRn. Такі модифікації включають модифікації, віддалені від сайтів контакту FcRn, а також модифікації в сайтах контакту, які зберігають або навіть посилюють зв'язування з FcRn. Наприклад, наступні одиночні залишки амінокислот в Fc(Fcyl) IgG1 людини можуть бути замінені без істотної втрати афінності зв'язування Fc у відношенні FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A і K447A, де, наприклад, P238A означає пролін дикого типу, що замінюється аланіном в положенні номер 238. Як приклад один конкретний варіант включає мутацію N297A, що видаляє високо консервативний сайт

N-глікозилювання. Крім аланіну, інші амінокислоти можуть бути використані для заміни амінокислот дикого типу у вказаних вище положеннях. Мутації можуть бути окремо введені у Fc з утворенням більше ста FcRn-зв'язувальних партнерів, які відрізняються від нативного Fc. Крім того, комбінації з двох, трьох або більше вказаних окремих мутацій можуть бути введені разом, приводячи до утворення ще сотень FcRn-зв'язувальних партнерів. Крім того, один з FcRn-зв'язувальних партнерів в гібриді мономер-димер може бути мутований, а інший FcRn-зв'язувальний партнер взагалі не мутований, або вони можуть бути мутовані обидва, але різними мутаціями. Будь-яку з наведених в даному описі мутацій, включаючи N297A, можна використати для модифікації Fc, незалежно від біологічно активної молекули (наприклад, EPO, IFN, фактор IX, T20).

Деякі з вказаних вище мутацій можуть додавати нової функціональності FcRn-зв'язувальному партнеру. Наприклад, один варіант включає N297A, що видаляє високо консервативний сайт N-глікозилювання. Вплив мутації полягає у зменшенні імуногенності і при цьому збільшенні часу напівжиття в циркуляції FcRn-зв'язу вального партнера, і у наданні FcRn-зв'язу вальному партнеру нездатності зв'язуватись з FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB і FcγRIIIA, не піддаючи ризику афінності у відношенні FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591). Як наступний приклад нової функціональності, виникаючої внаслідок мутацій, описаних вище, може бути збільшена афінність у відношенні FcRn, в деяких випадках вище ніж афінність дикого типу. Вказана підвищена афінність може відображати підвищену швидкість утворення комплексу, знижену швидкість розпаду комплексу або і підвищену швидкість утворення комплексу і знижену швидкість розпаду комплексу разом. Мутації, які можливо надають підвищену афінність у відношенні FcRn, включають T256A, T307A, E380A і N434A (Shields et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591).

Крім того, щонайменше три рецептори Fc гамма людини, мабуть, впізнають сайт зв'язування на IgG в ділянці нижче шарніра, звичайно амінокислоти 234-237. Отже, інший приклад нової функціональності і можливої зниженої імуногенності може виникати внаслідок мутацій даної ділянки, наприклад, при заміні амінокислот 233-236 IgG1 людини «ELLG» на відповідну послідовність з IgG2 «PVA» (з делецією однієї амінокислоти). Показано, що FcγRI, FcγRII і FcγRIII, які опосередковують різні ефекторні функції, не будуть зв'язуватись з IgG1, коли введені такі мутації. Ward і Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 і Armour et al. 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613.

В одному варіанті FcRn-зв'язу вальним партнером є поліпептид, що містить послідовність PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:26) і необов'язково, крім того, що містить послідовність, вибрану з HQSLGTQ (SEQ ID NO:27), HQNLSDGK (SEQ ID NO:28), HQNISDGK (SEQ ID NO:29) або VISSHLGQ (SEQ ID NO:30) (патент США № 5739277).

Два рецептори FcRn можуть зв'язувати одну молекулу Fc. Кристалографічні дані свідчать, що кожна молекула FcRn зв'язує один поліпептид гомодимеру Fc. В одному варіанті зв'язування FcRn-зв'язувального партнера, наприклад, Fc-фрагмента IgG, з біологічно активною молекулою забезпечує засоби доставки біологічно активної молекули пероральним, букальним, під'язиковим, ректальним, вагінальним шляхом, у вигляді аерозолі, що вводиться назально, або через легеневий шлях або очним шляхом. В іншому варіанті химерний білок може бути введений інвазивно, наприклад, підшкірно, внутрішньовенно.

Фахівцям в даній галузі буде зрозуміло, що частини константної ділянки імуноглобуліну для застосування в химерному білку згідно з винаходом можуть включати його мутанти або аналоги, або можуть включати хімічно модифіковані константні ділянки імуноглобуліну (наприклад, пегільовані) або її фрагменти (дивіться, наприклад, Aslam and Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, London). В одному випадку мутант може забезпечувати підвищене зв'язування FcRn-зв'язувального партнера по відношенню до FcRn. Також для застосування в химерному білку згідно з винаходом пропонуються пептидоміметики щонайменше частини константної ділянки імуноглобуліну, наприклад, пептидоміметик Fc-фрагмента або пептидоміметик FcRn-зв'язувального партнера. В одному варіанті пептидоміметик ідентифікують, використовуючи фаговий дисплей, або за допомогою скринінгу хімічної бібліотеки (дивіться, наприклад, McCafferty et al. 1990, Nature 348:552, Kang et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EPO 589 877B1).

3. Необов'язкові лінкери

Химерний білок згідно з винаходом необов'язково може містити щонайменше одну лінкерну молекулу. Лінкер може складатись з будь-якої органічної молекули. В одному варіанті лінкер являє собою поліетиленгліколь (ПЕГ). В іншому варіанті лінкер складається з амінокислот. Лінкер може містити 1-5 амінокислот, 1-10 амінокислот, 1-20 амінокислот, 10-50 амінокислот, 50-100 амінокислот, 100-200 амінокислот. В одному варіанті лінкер являє собою восьмиамінокислотний лінкер EFAGAAAV (SEQ ID NO:31). Будь-який з лінкерів, наведених в даному описі, може бути використаний в химерному білку згідно з винаходом, наприклад, гібрид мономер-димер, що містить EFAGAAAV, незалежно від біологічно активної молекули (наприклад, EPO, IFN, фактор IX).

Лінкер може містити послідовність G_n . Лінкер може містити послідовність $(GA)_n$ (SEQ ID NO:32). Лінкер може містити послідовність $(GGS)_n$ (SEQ ID NO:33). Лінкер може містити послідовність $(GGS)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:34). У вказаних випадках n може бути цілим числом від 1 до 10, тобто 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Приклади лінкерів включають, але не обмежені вказаним, GGG (SEQ ID NO:35), SGGSGGS (SEQ ID NO:36), GGGSGGS (SEQ ID NO:37), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:38), GGGSGGS (SEQ ID NO:39). Лін-

кер не виключає або не зменшує біологічну активність химерного білка. Необов'язково лінкер посилює біологічну активність химерного білка, наприклад, додатково зменшуючи вплив стеричних перешкод і роблячи біологічно активну молекулу більш доступною для сайту мішені, який зв'язує її.

В одному конкретному варіанті лінкер для інтерферону α має довжину 15-25 амінокислот. В іншому конкретному варіанті лінкер для інтерферону α має довжину 15-20 амінокислот. В іншому конкретному варіанті лінкер для інтерферону α має довжину 10-25 амінокислот. В іншому конкретному варіанті лінкер для інтерферону α має довжину 15 амінокислот. В одному варіанті лінкер для інтерферону α являє собою $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:40), де G означає гліцин, S означає серин і n є цілим числом від 1 до 10. У конкретному варіанті n дорівнює 3.

Лінкер також може включати в себе залишок, здатний розщеплюватись або хімічно (наприклад, гідроліз ефірного зв'язку), ферментативно (наприклад, включення послідовності розщеплення протеазою) або фотолітично (наприклад, хромофор, такий як 3-аміно-3-(2-нітрофеніл)пропіонова кислота (ANP)), для того, щоб вивільняти біологічно активну молекулу з Fc-білка.

4. Димеризація химерних білків з використанням специфічних зв'язувальних партнерів

В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить перший поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше перший домен, при цьому вказаний перший домен має щонайменше один специфічний зв'язувальний партнер, і другий поліпептидний ланцюг, що містить щонайменше другий домен, де вказаний другий домен є специфічним зв'язувальним партнером вказаного першого домену. Таким чином, химерний білок містить поліпептид, здатний димеризуватись з іншим поліпептидом внаслідок взаємодії першого домену і другого домену. Способи димеризації антитіл з використанням гетерологічних доменів відомі в даній галузі (патенти США №№ 5807706 і 5910573; Kostelny et al. 1992, J. Immunol. 148 (5): 1547).

Димеризація може відбуватись внаслідок утворення ковалентного зв'язку або, альтернативно, нековалентного зв'язку, наприклад, гідрофобної взаємодії, сил Ван-дер-Ваальса, взаємного розташування амфіфільних пептидів, такого як, без обмеження, альфа-спіралі, взаємодії зарядів амінокислот, які несуть протилежні заряди, таких як, без обмеження, лізин і аспарагінова кислота, аргінін і глутамінова кислота. В одному варіанті домен являє собою спіральний мотив, що містить спіраль, поворот та іншу спіраль. В іншому варіанті домен є лейциновим zipером, що містить пептид, який має декілька амінокислот, що повторюються, в якому кожна сьома амінокислота є залишком лейцину. В одному варіанті специфічним зв'язувальним партнером є fos/jun (дивіться Branden et al. 1991, Introduction To Protein Structure, Garland Publishing, New York).

В іншому варіанті зв'язування опосередковане хімічним зв'язуванням (дивіться, наприклад, Brennan et al. 1985, Science 229:81). В даному варіанті інтактні імуноглобуліни або химерні білки,

що складаються щонайменше з частини константної ділянки імуноглобуліну, розщеплюють, щоб створити фрагменти важкого ланцюга. Вказані фрагменти відновлюють у присутності агента для утворення комплексів дитіолів арсеніту натрію, щоб стабілізувати сусідні дитіоли і запобігти утворенню міжмолекулярних дисульфідів. Створені фрагменти потім перетворюють в похідні тіонітробензоату (TNB). Одне з похідних TNB потім знов перетворюють в тіол фрагмента важкого ланцюга відновленням меркаптоетиламіном і потім змішують з еквімолярною кількістю іншого похідного TNB з утворенням химерного димеру.

D. Нуклеїнові кислоти

Винахід відноситься до першої конструкції нуклеїнової кислоти і другої конструкції нуклеїнової кислоти, кожна з яких містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує щонайменше частину химерного білка згідно з винаходом. В одному варіанті перша конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує частину константної ділянки імуноглобуліну, операційно зв'язану з другою послідовністю ДНК, що кодує біологічно активну молекулу, і вказана друга конструкція ДНК містить послідовність ДНК, що кодує константну ділянку імуноглобуліну, без другої послідовності ДНК, що кодує біологічно активну молекулу.

Біологічно активна молекула може, наприклад, включати, але не як обмеження, інгібітор злиття, вірусів, фактор скипання крові, фактор росту або гормон або рецептор, або аналог або фрагмент будь-якого з вказаних вище. Послідовності нуклеїнових кислот також можуть включати в себе додаткові послідовності або елементи, відомі в даній галузі (наприклад, промотори, енансери, полі А-послідовності, афінні мітки). В одному варіанті послідовність нуклеїнової кислоти другої конструкції необов'язково може включати в себе послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує лінкер, поміщений між послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує біологічно активну молекулу і частину константної ділянки імуноглобуліну. Послідовність нуклеїнової кислоти другої конструкції ДНК необов'язково може включати в себе лінкерну послідовність, поміщену перед або після послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує біологічно активну молекулу і/або частину константної ділянки імуноглобуліну.

В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти складається з ДНК. В іншому варіанті конструкція нуклеїнової кислоти складається з РНК. Конструкція нуклеїнової кислоти може являти собою вектор, наприклад, вірусний вектор або плазмиду. Приклади вірусних векторів включають, але не обмежені вказаним, аденовірусний вектор, вектор на основі аденоасоційованого вірусу або вектор на основі вірусу лейкозу мишей. Приклади плазмід включають, але не обмежені вказаним, pUC, pGEM і pGEX.

В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3a (SEQ ID NO:7). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3b (SEQ ID NO:9). В одному варіанті конструкція нук-

леїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3c (SEQ ID NO:11). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3d (SEQ ID NO:13). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3e (SEQ ID NO:15). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3f (SEQ ID NO:17). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3g (SEQ ID NO:19). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3h (SEQ ID NO:21). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3i (SEQ ID NO:23). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 3j (SEQ ID NO:25). В одному варіанті конструкція нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, показану на Фіг. 17a (SEQ ID NO:27).

Внаслідок відомої виродженості генетичного коду, в якому більше ніж один кодон може кодувати одну і ту ж амінокислоту, послідовність ДНК може змінюватись у порівнянні з послідовностями, показаними в SEQ ID NO:7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 або 27, але все ще кодувати поліпептид, що має відповідну амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 або 26, відповідно. Такі варіанти послідовності ДНК можуть виникати внаслідок мовчазних мутацій (наприклад, що відбуваються під час ПЛР-ампліфікації) або можуть бути продуктом навмисного мутагенезу нативної послідовності. Таким чином винахід відноситься до ізолюваних послідовностей ДНК, що кодують поліпептиди згідно з винаходом, вибраних з: (a) ДНК, що містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 або 27; (b) ДНК, що кодує поліпептиди SEQ ID NO:6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 або 26; (c) ДНК, здатної гібридизуватись з ДНК за (a) або (b) в умовах помірної жорсткості, і яка кодує поліпептиди згідно з винаходом; (d) ДНК, здатної гібридизуватись з ДНК за (a) або (b) в умовах високої жорсткості і яка кодує поліпептиди згідно з винаходом, і (e) ДНК, яка є виродженою внаслідок генетичного коду у порівнянні з ДНК, визначеною в (a), (b), (c) або (d), і яка кодує поліпептиди згідно з винаходом. Звичайно, поліпептиди, що кодуються такими послідовностями ДНК, входять в об'єм винаходу.

В іншому варіанті молекули нуклеїнової кислоти, що містять послідовність, яка кодує химерний білок згідно з винаходом, також можуть містити нуклеотидні послідовності, які щонайменше на 80% ідентичні нативній послідовності. Також передбачаються варіанти, в яких молекули нуклеїнової кислоти, що містять послідовність, яка кодує химерний білок згідно з винаходом, містять послідовність, яка щонайменше на 90% ідентична, щонайменше на 95% ідентична, щонайменше на 98% ідентична, щонайменше на 99% ідентична або

щонайменше на 99,9% ідентична нативній послідовності. Нативна послідовність може включати будь-яку послідовність ДНК, не змінену штучно людиною. Процент ідентичності можна визначити візуальним переглядом і математичним розрахунком. Альтернативно, процент ідентичності двох послідовностей нуклеїнової кислоти можна визначити порівнянням інформації про послідовність з використанням комп'ютерної програми GAP, версія 6.0, описаної Devereux et al. 1984, Nucl. Acids Res. 12:387, і доступної з University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Переважні параметри, що використовуються за умовчанням, у випадку програми GAP включають: (1) матрицю унарного порівняння (що містить значення 1 для ідентичності і 0 для неідентичності) нуклеотидів, і матрицю зважуючого порівняння Gribkov and Burgess 1986, Nucl. Acids Res. 14:6745, які описані Schwartz and Dayhoff, eds. 1979, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358; (2) штраф 3,0 за кожний пропуск і додатковий штраф 0,10 за кожний символ в кожному пропуску; і (3) відсутність штрафу за кінцеві пропуски. Також можна використати інші програми, що використовуються фахівцем в галузі порівняння послідовностей.

Е. Синтез химерних білків

Химерні білки, що містять щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і біологічно активну молекулу, можуть бути синтезовані з використанням способів, відомих в даній галузі. Наприклад, химерні білки згідно з винаходом можуть бути синтезовані рекомбінантно в клітинах (дивіться, наприклад, Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. і Ausubel et al. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). Альтернативно, химерні білки згідно з винаходом можуть бути синтезовані з використанням відомих способів синтезу, таких як твердофазний синтез. Способи синтезу добре відомі в даній галузі (дивіться, наприклад, Merrifield, 1973, Chemical Polypeptides, (Katsoyannis and Panayotis eds.) pp. 335-61; Merrifield 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Davis et al. 1985, Biochem. Intl. 10:394; Finn et al. 1976, The Proteins (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, The Proteins (3d ed.) 2:257; патент США № 3941763. Альтернативно, химерні білки згідно з винаходом можуть бути синтезовані з використанням комбінації способів на основі рекомбінації і способів синтезу. У деяких застосуваннях може бути корисним застосування або способу на основі рекомбінації, або комбінації способу на основі рекомбінації і способу синтезу.

Нуклеїнові кислоти, що кодують біологічно активну молекулу, можуть бути легко синтезовані з використанням способів рекомбінації, добре відомих в даній галузі. Альтернативно, пептиди як такі можуть бути синтезовані хімічним шляхом. Нуклеїнові кислоти згідно з винаходом можуть бути синтезовані стандартними способами, відовими в даній галузі, наприклад, за допомогою застосування автоматизованого синтезатора ДНК (такого як комерційно доступні з Biosearch, Applied

Biosystems, і т.д.). Як приклади фосфоротіоатні олігонуклеотиди можуть бути синтезовані способом Stein et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16:3209, метилфосфонатні олігонуклеотиди можуть бути одержані внаслідок застосування підкладок з полімерного скла з розміром пор, що контролюється, як описано в Sarin et al. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448. Додаткові способи синтезу нуклеїнових кислот відомі в даній галузі (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6015881, 6281331, 6469136).

Послідовності ДНК, що кодують константні ділянки імуноглобуліну або його фрагменти, можуть бути клоновані з різних бібліотек геномної або кДНК, відомих в даній галузі. Способи виділення таких послідовностей ДНК з використанням основаних на зондах способів є звичайними методиками і добре відомі фахівцям в даній галузі. Зонди для виділення таких послідовностей ДНК можуть бути основані на опублікованих послідовностях ДНК (дивіться, наприклад, Hieter et al. 1980, Cell 22:197-207). Можна використати спосіб полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), описаний Mullis et al. (патент США № 4683195) і Mullis (патент США № 4683202). Вибір бібліотеки і підбір зондів для виділення таких послідовностей ДНК здійснюється фахівцем в даній галузі. Альтернативно, послідовності ДНК, що кодують імуноглобуліни або їх фрагменти, можна одержати з векторів, які як відомо в даній галузі, містять імуноглобуліни або їх фрагменти.

Для рекомбінантного одержання першу полінуклеотидну послідовність, що кодує частину химерного білка згідно з винаходом (наприклад, частину константної ділянки імуноглобуліну), і другу полінуклеотидну послідовність, що кодує частину химерного білка згідно з винаходом (наприклад, частину константної ділянки імуноглобуліну і біологічно активну молекулу), вбудовують у відповідні носії для експресії, наприклад, вектори, які містять необхідні елементи для транскрипції і трансляції вбудованої кодуючої послідовності, або у випадку вектора на основі РНК-вірусу необхідні елементи для реплікації і трансляції. Нуклеїнові кислоти, що кодують химерний білок, вбудовують у вектор в правильній рамці читування.

Експресуючими носіями потім трансфікують або котрансфікують відповідну клітину-мішень, яка буде експресувати поліпептиди. Способи трансфекції, відомі в даній галузі, включають, але не обмежені вказаним, осадження фосфатом кальцію (Wigler et al. 1978, Cell 14:725) і електропорацію (Neumann et al. 1982, EMBO, J. 1:841), і реагенти на основі ліпосом. Може бути використана множина систем хазяїн-експресуючий вектор, щоб експресувати химерні білки, вказані в даному описі, включаючи як прокаріотичні, так і еукаріотичні клітини. Системи включають, але не обмежені вказаним, мікроорганізми, такі як бактерії (наприклад, E. coli), трансформовані експресуючими векторами на основі рекомбінантної ДНК бактеріофага або плазмідної ДНК, що містять відповідну кодуючу послідовність; дріжджі або нитчасті гриби, трансформовані рекомбінантними експресуючими векторами дріжджів або грибів, що містять відповідну

кодуючу послідовність; системи клітин комах, інфікованих рекомбінантними вірусними експресуючими векторами (наприклад, бакуловірусом), що містять відповідну кодуючу послідовність; системи клітин рослин, інфікованих рекомбінантними вірусними експресуючими векторами (наприклад, на основі вірусу мозаїки цвітної капусти або вірусу мозаїки тютюну) або трансформованими рекомбінантними плазмідними експресуючими векторами (наприклад, Ti-плазмідом), що містять відповідну кодуючу послідовність; або системи клітин тварин, включаючи клітини ссавців (наприклад, клітини CHO, Cos, HeLa).

У тому випадку, коли химерний білок згідно з винаходом синтезують рекомбінантно в прокаріотичній клітині, може бути бажаним укладання химерного білка. Химерний білок, одержаний таким способом, може бути підданий рефолдингу до біологічно активної конформації з використанням умов, відомих в даній галузі, наприклад, денатурацією у відновлювальних умовах і потім повільним діалізом в PBS.

В залежності від системи експресії, що використовується, експресований химерний білок потім виділяють способами, добре розробленими в даній галузі (наприклад, афінною хроматографією, ексклюзійною хроматографією за розміром, іонообмінною хроматографією).

Експресуючі вектори можуть кодувати мітки, які дають можливість легко очищати рекомбінантно одержаний химерний білок. Приклади включають, але не обмежені вказаним, вектор pUR278 (Ruther et al. 1983, EMBO J. 2:1791), в якому послідовності, що кодують химерний білок, вказаний в даному описі, можуть бути лігovanі у вектор в рамці з ділянкою, що кодує lac z, так що виходить гібридний білок; вектори pGEX можуть бути використані для експресії химерних білків згідно з винаходом з міткою у вигляді глутатіон-S-трансферази (GST). Вказані білки звичайно розчинні і можуть бути легко очищені з клітин за допомогою адсорбції на глутатіон-агарозних кульках з подальшим елюванням у присутності вільного глутатіону. Вектори містять сайти розщеплення (тромбін або протеаза фактора Ха або протеаза PreScission™ (Pharmacia, Peapack, N.J.) для простого видалення мітки після очищення.

Щоб підвищити ефективність одержання, можуть бути сконструйовані полінуклеотиди, що кодують множинні одиниці химерного білка згідно з винаходом, розділені сайтами розщеплення ферментами. Одержаний в результаті поліпептид може бути розщеплений (наприклад, обробкою відповідним ферментом), щоб одержати поліпептидні одиниці. Це може підвищити вихід поліпептидів, керований одним промотором. При використанні у відповідних вірусних системах експресії керування трансляцією кожного поліпептиду, що кодується мРНК, здійснюється всередині транскрипту, наприклад, за допомогою внутрішнього сайту приєднання рибосоми, IRES. Таким чином поліцистронна конструкція направляє трансляцію однієї великої поліцистронної мРНК, яка в свою чергу направляє трансляцію множини окремих поліпептидів. Такий підхід виключає продукування і фер-

ментативний процесинг полібілків і може значно збільшити вихід поліпептиду під керуванням одного промотору.

Вектори, що використовуються для трансформації, звичайно будуть містити селектований маркер, який використовується для того, щоб ідентифікувати трансформанти. У бактеріальних системах він може включати ген резистентності до антибіотика, такого як ампіцилін або канаміцин. Селектовані маркери для застосування в клітинах ссавців, що культивуються, включають гени, які надають резистентності до лікарських засобів, таких як неоміцин, гіроміцин і метотрексат. Селектований маркер може бути ампліфікованим селектованим маркером. Одним з ампліфікованих селектованих маркерів є ген DHFR. Іншим ампліфікованим маркером є кДНК DHFR (Simonsen and Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495). Огляд селектованих маркерів наведений Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA) і вибір селектованих маркерів може здійснити фахівець в даній галузі.

Селектовані маркери можуть бути введені в клітину в окремій плазміді в один і той же час з геном, який представляє інтерес, або вони можуть бути введені в одній і тій же плазміді. При введенні в одній і тій же плазміді селектований маркер і ген, який представляє інтерес, можуть бути під контролем різних промоторів або одного і того ж промотору, у випадку останнього розташування продукується дицистронний месенджер. Конструкції такого типу відомі в даній галузі (наприклад, патент США № 4713339).

Елементи експресії експресуючих систем варіюють за своєю довжиною і специфічністю. В залежності від системи хазяїн/вектор, що використовується, в експресуючому векторі можна використати будь-який з ряду відповідних елементів транскрипції і трансляції, включаючи конститутивні та індуковані промотори. Наприклад, при клонуванні в бактеріальних системах можна використати індуковані промотори, такі як pL бактеріофага λ , p_{lac}, p_{trp}, p_{tac} (гібридний промотор p_{trp}-p_{lac}) і тому подібні; при клонуванні в системах клітин комах можна використати такі промотори, як промотор поліедрину бакуловірусу; при клонуванні в системах клітин рослин можна використати промотори, одержані з геному рослинних клітин (наприклад, промотори теплового шоку; промотор для малої субодиниці RUBISCO; промотор для білка, який зв'язує хлорофіл a/b) або з вірусів рослин (наприклад, промотор 35S PHK CaMV; промотор білка оболонки TMV); при клонуванні в системах клітин ссавців можна використати промотори, одержані з геному клітин ссавців (наприклад, промотор металотіонеїну) або з вірусів ссавців (наприклад, пізній промотор аденовірусу; промотор 7,5 K вірусу вакцинії); при створенні ліній клітин, які містять множинні копії продукту експресії, можна використати вектори, основані на SV40, BPV і EBV з відповідним селектованим маркером.

У тих випадках, коли використовують експресуючі вектори рослин, експресія послідовностей, що кодують лінійні або нециклічні форми химерних

білків згідно з винаходом, може керуватись будь-яким з ряду промоторів. Наприклад, можна використати вірусні промотори, такі як промотори 35S PHK і 19S PHK CaMV (Brisson et al. 1984, Nature 310:511-514), або промотор білка оболонки TMV (Takamatsu et al. 1987, EMBO J. 6:307-311); альтернативно, можна використати промотори рослин, такі як промотор малої субодиниці RUBISCO (Coruzzi et al. 1984, EMBO J. 3:1671-1680; Broglie et al. 1984, Science 224:838-843) або промотор теплового шоку, наприклад, hsp17.5-E або hsp17.3-B сої (Gurley et al. 1986, Mol. Cell. Biol. 6:559-565). Вказані конструкції можуть бути введені в клітини рослин з використанням Ti-плазмід, Ri-плазмід, векторів на основі вірусів рослин, прямою трансформацією ДНК, мікроін'єкцією, електропорацією і т.д. Огляд таких способів дивіться, наприклад, у Weissbach and Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; і Grierson and Corey 1988, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

В одній системі експресії комах, яку можна використати для одержання химерних білків згідно з винаходом, використовують вірус ядерного поліедрозу *Autographa californica* (AcNPV) як вектор для експресії чужорідних генів. Вірус росте в клітинах *Spodoptera frugiperda*. Кодуюча послідовність може бути клонована в несуттєвих ділянках (наприклад, в гені поліедрину) вірусу і поміщена під контроль промотору AcNPV (наприклад, промотор поліедрину). Успішне вбудовування кодуючої послідовності приведе до інактивації гена поліедрину і продукції «невкрапленого» рекомбінантного вірусу (тобто вірусу, у якого відсутня білкова оболонка, що кодується геном поліедрину). Потім вказані рекомбінантні віруси використовують для інфекції клітин *Spodoptera frugiperda*, в яких вбудований ген експресується (дивіться, наприклад, Smith et al. 1983, J. Virol. 46:584; патент США № 4215051). Додаткові приклади такої системи експресії можна знайти в Ausubel et al., eds. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. and Wiley Interscience.

Іншою системою, яку можна використати для експресії химерних білків згідно з винаходом, є система експресії гена глутамінсинтети, також названа «системою експресії GS» (Lonza Biologies PLC, Berkshire UK). Вказана система експресії детально описана в патенті США № 5981216.

У клітинах-хазяїнах ссавців можна використати ряд основаних на вірусах систем експресії. У тих випадках, коли як експресуючий вектор використовують аденовірус, кодуюча послідовність може бути лігована з комплексом регуляції транскрипції/трансляції аденовірусу, наприклад, пізнім промотором і лідерною послідовністю, що складається з трьох частин. Потім вказаний химерний ген може бути вбудований в аденовірусний геном за допомогою рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Інсерція в несуттєву ділянку вірусного геному (наприклад, ділянка E1 або E3) в результаті приведе до рекомбінантного вірусу, який є життєздатним і здатний експресувати пептид у інфікованих хазяїнів (дивіться, наприклад, Logan and Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655). Альтернативно, мо-

жна використати промотор 7.5 K вакцинії (дивіться, наприклад, Mackett et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857; Panicali et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927).

У тих випадках, коли як експресуючий вектор використовують аденовірус, кодуюча послідовність може бути лігована з комплексом регуляції транскрипції/трансляції аденовірусу, наприклад, пізнім промотором і лідерною послідовністю, що складається з трьох частин. Потім вказаний химерний ген може бути вбудований в аденовірусний геном за допомогою рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Інсерція в несуттєву ділянку вірусного геному (наприклад, ділянка E1 або E3) в результаті приведе до рекомбінантного вірусу, який є життєздатним і здатний експресувати пептид у інфікованих хазяїнів (дивіться, наприклад, Logan and Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655). Альтернативно, можна використати промотор 7.5 K вакцинії (дивіться, наприклад, Mackett et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7415; Mackett et al. 1984, J. Virol. 49:857; Panicali et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4927).

Клітини-хазяїни, що містять конструкції ДНК химерного білка, вирощують у відповідному середовищі для зростання. У значенні, що використовується в даному описі, термін «відповідне середовище для зростання» означає середовище, що містить поживні речовини, необхідні для зростання клітин. Поживні речовини, необхідні для зростання клітин, можуть включати джерело вуглецю, джерело азоту, незамінні амінокислоти, вітаміни, мінерали і фактори росту. Необов'язково середовище можуть містити сироватку теляти або фетальну сироватку теляти. В одному варіанті середовище по суті не містить IgG. Середовище для зростання, як правило, буде вибиратись для клітин, що містять конструкцію ДНК, наприклад, за допомогою лікарської селекції або з використанням дефіциту незамінної поживної речовини, які комплементуються селектованим маркером в конструкції ДНК або котрансфікованим разом з конструкцією ДНК. Клітини ссавців, що культивуються, звичайно вирощують в комерційно доступному середовищі, що містить сироватку, або у безсироватковому середовищі (наприклад, MEM, DMEM). Вибір середовища, придатного для конкретної лінії клітин, що використовується, може здійснити фахівець в даній галузі.

Рекомбінантно одержаний химерний білок згідно з винаходом може бути виділений з культурального середовища. Культуральне середовище від відповідним чином вирощених трансформованих або трансфікованих клітин-хазяїнів відділяють від клітинного матеріалу і показують присутність химерних білків. Одним зі способів виявлення химерних білків, наприклад, є зв'язування химерних білків або частин химерних білків зі специфічним антитілом, що упізнає химерний білок згідно з винаходом. Антитіло проти химерного білка може бути моноклональним або поліклональним антитілом, що виробляється проти химерного білка, який розглядається. Наприклад, химерний білок містить щонайменше частину константної ділянки імуно-

лобуліну. Антитіла, що упізнають константну ділянку багатьох імуноглобулінів, відомі в даній галузі і є комерційно доступними. Антитіло може бути використане для здійснення ELISA або для вестерн-блоту, щоб виявити наявність химерного білка згідно з винаходом.

Химерний білок згідно з винаходом може бути синтезований в трансгенній тварині, такий як гризун, корова, свиня, вівця або коза. Термін «трансгенній тварині» відноситься до тварин, які відрізняються від людини, в геном яких був введений чужорідний ген. Оскільки даний ген присутній в зародкових тканинах, він передається від батьків потомству. Екзогенні гени вводять в одноклітинні ембріони (Brinster et al. 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438). Способи одержання трансгенних тварин відомі в даній галузі, включаючи трансгенні організми, які продукують молекули імуноглобуліну (Wagner et al. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6376; McKnight et al. 1983, Cell 34:335; Brinster et al. 1983, Nature 306:332; Ritchie et al. 1984, Nature 312:517; Baldassarre et al. 2003, Theriogenology 59:831; Robl et al. 2003, Theriogenology 59:107; Malassagne et al. 2003, Xenotransplantation 10(3):267).

Химерний білок згідно з винаходом також може бути одержаний при комбінуванні способів хімічного синтезу і способів рекомбінації. Наприклад, частина константної ділянки імуноглобуліну може бути експресована рекомбінантно, як описано вище. Біологічно активна молекула може бути одержана з використанням відомих способів хімічного синтезу (наприклад, твердофазним синтезом).

Частина константної ділянки імуноглобуліну може бути лігована з біологічно активною молекулою з використанням хімічного лігування і потім об'єднана з частиною константної ділянки імуноглобуліну, яка не була лігована з біологічно активною молекулою, з утворенням химерного білка згідно з винаходом. В одному варіанті частина константної ділянки імуноглобуліну являє собою Fc-фрагмент. Fc-фрагмент може бути одержаний рекомбінантно, щоб утворити Cys-Fc, і підданий взаємодії з біологічно активною молекулою, що має тіоефір, щоб одержати гібрид мономер-димер. В іншому варіанті одержують Fc-тіоефір і піддають взаємодії з біологічно активною молекулою, що має N-кінцевий цистеїн (Фіг. 4).

В одному варіанті частина константної ділянки імуноглобуліну, лігована з біологічно активною молекулою, буде утворювати гомодимери. Гомодимери можуть бути зруйновані при впливі на гомодимери денатуруючих і відновлювальних умов (наприклад, бета-меркаптоетанол і 8M сечовина) і потім об'єднані з частиною константної ділянки імуноглобуліну, не зв'язаного з біологічно активною молекулою, з утворенням гібридів мономер-димер. Потім гібриди мономер-димер піддають ренатурації і рефолдингу за допомогою діалізу в PBS і виділяють, наприклад, ексклюзивною хроматографією за розміром або афінною хроматографією.

В іншому варіанті частина константної ділянки імуноглобуліну буде утворювати гомодимери перед зв'язуванням з біологічно активною молеку-

лою. У даному варіанті умови реакції для зв'язування біологічно активної молекули з гомодимером можна коректувати так, щоб зв'язування біологічно активної молекули відбувалось переважно з одним ланцюгом гомодимеру (наприклад, коректуючи молярні еквіваленти кожної реагуючої речовини).

Біологічно активна молекула може бути хімічно синтезована з N-кінцевим цистеїном. Послідовність, що кодує частину константної ділянки імуноглобуліну, може бути субклонована у векторі, що кодує інтеїн, зв'язаний з хітин-зв'язувальним доменом (New England Biolabs, Beverly, MA). Інтеїн може бути зв'язаний з C-кінцем частини константної ділянки імуноглобуліну. В одному варіанті частина імуноглобуліну з інтеїном, зв'язаним з її C-кінцем, може бути експресована в прокаріотичній клітині. В іншому варіанті частина імуноглобуліну з інтеїном, зв'язаним з її C-кінцем, може бути експресована в еукаріотичній клітині. Частина константної ділянки імуноглобуліну, зв'язана з інтеїном, може бути піддана взаємодії з MESNA. В одному варіанті частину константної ділянки імуноглобуліну, зв'язану з інтеїном, зв'язують з колонкою, наприклад, колонкою з хітином, і потім елюють, використовуючи MESNA. Біологічно активна молекула і частина імуноглобуліну можуть бути піддані взаємодії одна з одною так, щоб відбувалось нуклеофільне перегруповання і біологічно активна молекула ковалентно зв'язувалась з частиною імуноглобуліну за допомогою амідного зв'язку (Dawson et al. 2000, Annu. Rev. Biochem. 69:923). Синтезований таким чином химерний білок необов'язково може містити лінкерний пептид між частиною імуноглобуліну і біологічно активною молекулою. Лінкер можна, наприклад, синтезувати на N-кінці біологічно активної молекули. Лінкери можуть включати пептиди і/або органічні молекули (наприклад, поліетиленгліколь і/або короткі амінокислотні послідовності). Вказаний комбінований рекомбінантний і хімічний синтез дозволяє провести швидкий скринінг біологічно активних молекул і лінкерів, щоб оптимізувати необхідні властивості химерного білка згідно з винаходом, наприклад, інгібування вірусів, гемостаз, продукція червоних кров'яних клітин, біологічний час напівжиття, стабільність, зв'язування з білками сироватки або деякі інші властивості химерного білка. Спосіб також дозволяє вводити амінокислоти, що не зустрічаються в природі, в химерний білок згідно з винаходом, які можуть бути застосовні для оптимізації необхідного химерного білка згідно з винаходом. За бажання химерний білок, одержаний таким способом, може бути підданий рефолдингу до біологічно активної конформації з використанням умов, відомих в даній галузі, наприклад, відновлювальних умов, і потім повільно діалізований в PBS.

Альтернативно, N-кінцевий цистеїн може бути на частині константної ділянки імуноглобуліну, наприклад, Fc-фрагменті. Fc-фрагмент може бути створений з N-кінцевим цистеїном, беручи до уваги той факт, що нативний Fc має цистеїн в положенні 226 (дивіться Rabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda, MD).

Щоб експресувати кінцевий цистеїн, Fc-фрагмент може бути експресований рекомбінантно. В одному варіанті Fc-фрагмент експресують в прокаріотичній клітині, наприклад, *E. coli*. Послідовність, що кодує Fc-частину, починаючи з Cys 226 (нумерація EU), можна вмістити відразу після послідовності, що кодує сигнальний пептид, наприклад, OmpA, PhoA, STII. Прокаріотичну клітину можна піддати осмотичному шоку, щоб вивільнити рекомбінантний Fc-фрагмент. В іншому варіанті Fc-фрагмент продукують в еукаріотичній клітині, наприклад, клітині CHO, клітині BHK. Послідовність, що кодує фрагмент Fc-частини, можна вмістити прямо після послідовності, що кодує сигнальний пептид, наприклад, сигнальної послідовності легкого ланцюга Igκ миші або сигнальної послідовності Kb MHC класу I так, щоб коли рекомбінантний химерний білок синтезувався еукаріотичною клітиною, сигнальна послідовність відщеплювалась, залишаючи при цьому N-кінцевий цистеїн, потім білок може бути виділений і підданий хімічній взаємодії з молекулою, яка несе тіоефір (наприклад, C-кінцевий тіоефір, якщо молекула складається з амінокислот).

N-кінцевий цистеїн на Fc-фрагменті також може бути створений з використанням ферменту, який розщеплює свій субстрат біля його N-кінця, наприклад, фактор Ха, ентерокінази, і продукт може бути виділений і підданий взаємодії з молекулою, що має тіоефірну групу.

Рекомбінантно експресований Fc-фрагмент може бути використаний для одержання гомодимерів або гібридів мономер-димер.

У конкретному варіанті Fc-фрагмент експресують з сигнальним пептидом інтерферону людини, розташованим поруч з Cys у положенні 226. Коли конструкцію, що кодує даний поліпептид, експресують в клітинах CHO, клітини CHO відщеплюють сигнальний пептид в двох різних положеннях (у Cys 226 і у Val в сигнальному пептиді на 2 амінокислоти вище в напрямі N-кінця). Це приводить до утворення суміші двох видів Fc-фрагментів (один з N-кінцевим Val і один з N-кінцевим Cys). Це в свою чергу приводить до суміші димерних видів (гомодимери з кінцевим Val, гомодимери з кінцевим Cys і гетеродимери, в яких один ланцюг має кінцевий Cys, а інший ланцюг має кінцевий Val). Fc-фрагменти можуть бути піддані взаємодії з біологічно активною молекулою, що має C-кінцевий тіоефір і одержаний в результаті гібрид мономер-димер може бути виділений з суміші (наприклад, ексклюзійною хроматографією за розміром). Передбачається, що при використанні інших послідовностей сигнального пептиду для експресії Fc-фрагментів в клітинах CHO буде утворюватись суміш видів Fc-фрагментів щонайменше з двома різними N-кінцями.

В іншому варіанті рекомбінантно одержаний Cys-Fc може утворювати гомодимер. Гомодимер може бути підданий взаємодії з пептидом, який має розгалужений лінкер на C-кінці, при цьому розгалужений лінкер має два C-кінцевих тіоефіри, які можуть бути піддані взаємодії з Cys-Fc. В іншому варіанті біологічно активна молекула має один некінцевий тіоефір, який може бути підданий

взаємодії з Cys-Fc. Альтернативно, розгалужений лінкер може мати два C-кінцевих цистеїни, які можуть взаємодіяти з тіоефіром Fc. В іншому варіанті розгалужений лінкер має дві функціональні групи, які можуть бути піддані взаємодії з тіоефіром Fc, наприклад, 2-меркаптоамін. Біологічно активна молекула може складатись з амінокислот. Біологічно активна молекула може включати малу органічну молекулу або малу неорганічну молекулу.

F. Способи застосування химерних білків

Химерні білки згідно з винаходом мають багато застосувань, які будуть відомі фахівцям в даній галузі, включаючи, але не обмежуючи вказаним, способи лікування суб'єкта при захворюванні або патологічному стані. Захворювання або стан може включати, без обмеження, вірусну інфекцію, гемостатичний розлад, анемію, злоякісну пухлину, лейкоз, запальний стан або аутоімунне захворювання (наприклад, артрит, псоріаз, системний червоний вовчак, множинний склероз), або бактеріальну інфекцію (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 6030613, 6485726; WO 03/077834; US2003-0235536A1).

1. Способи лікування суб'єкта з недостатністю червоних кров'яних клітин

Винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, що має недостатність червоних кров'яних клітин, наприклад, анемію, що включає в себе введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного химерного білка, при цьому химерний білок містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де перший ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і щонайменше один агент, здатний індукувати проліферацію червоних кров'яних клітин, наприклад, ЕРО, і другий поліпептидний ланцюг містить щонайменше частину імуноглобуліну без агента, здатного індукувати проліферацію червоних кров'яних клітин, який є в першому ланцюгу.

2. Способи лікування суб'єкта з вірусною інфекцією

Винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, що має вірусну інфекцію або підданого впливу вірусу, що включає в себе введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного химерного білка, при цьому химерний білок містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де перший ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і щонайменше один противірусний агент, наприклад, інгібітор злиття або інтерферон α , і другий поліпептидний ланцюг містить щонайменше частину імуноглобуліну без противірусного агента, що є в першому ланцюгу. В одному варіанті суб'єкт інфікований вірусом, який можна лікувати IFN α , наприклад, вірусом гепатиту С. В одному варіанті суб'єкт інфікований ВІЛ, таким як ВІЛ-1 або ВІЛ-2.

В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом інгібує реплікацію вірусів. В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом запобігає або інгібує проникнення вірусу в клітини-мішені, тим самим зупиняючи, запобігаючи або обмежуючи поширення вірусної інфекції у суб'єкта і зменшуючи вірусне навантаження інфікованого суб'єкта. Завдяки зв'язуванню частини імуноглобуліну з

інгібітором злиття вірусів винахід забезпечує химерний білок активністю, яка інгібує злиття вірусів, з більш високою стабільністю і більш високою біодоступністю у порівнянні з інгібіторами злиття, що використовуються окремо, наприклад, T20, T21, T1249. Таким чином в одному варіанті інгібітор злиття вірусів зменшує або запобігає ВІЛ-інфекції клітини-мішені, наприклад, інфекції ВІЛ-1.

а. Стани, які можна лікувати

Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування або запобігання інфекції клітини-мішені вірусом гепатиту, наприклад, вірусом гепатиту С. Химерний білок може містити противірусний агент, який інгібує реплікацію вірусів.

В одному варіанті химерний білок згідно з винаходом містить інгібітор злиття. Химерний білок згідно з винаходом можна використати для інгібування або запобігання інфекції будь-якої клітини-мішені будь-яким вірусом (дивіться, наприклад, патенти США №№ 6086875, 6030613, 6485726; WO 03/077834; US2003-0235536A1). В одному варіанті вірус є вірусом, покритим оболонкою, таким як, без обмеження, ВІЛ, SIV, вірус кору, грипу, вірус Епштейн-Барра, респіраторно-синцитіальний вірус або вірус парагрипу. В іншому варіанті вірус є вірусом, не покритим оболонкою, таким як риновірус або вірус поліомієліту.

Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування суб'єкта, вже інфікованого вірусом. Суб'єкт може мати гостру вірусну інфекцію. Альтернативно, суб'єкт може бути хронічно інфікований вірусом. Химерний білок згідно з винаходом також можна використати для профілактичного лікування суб'єкта, для якого існує ризик зараження вірусною інфекцією, наприклад, суб'єкта, який як відомо або приблизно близько контактує з вірусом, або суб'єкта, який приблизно інфікований або несе вірус. Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування суб'єкта, який зазнавав впливу вірусу, але який ще не має позитивного діагнозу.

В одному варіанті винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, інфікованого HCV, що включає в себе введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості химерного білка, при цьому химерний білок містить Fc-фрагмент IgG і цитокін, наприклад IFN α .

В одному варіанті винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, інфікованого ВІЛ, що включає в себе введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості химерного білка, при цьому химерний білок містить Fc-фрагмент IgG та інгібітор злиття вірусу містить T20.

3. Способи лікування суб'єкта, що має гемостатичний розлад

Винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, що має гемостатичний розлад, що включає в себе введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного химерного білка, при цьому химерний білок містить перший і другий ланцюги, де перший ланцюг містить щонайменше один фактор скипання крові і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну.

Химерний білок згідно з винаходом лікує або запобігає гемостатичному розладу, стимулюючи утворення згустка фібрину. Химерний білок згідно з винаходом може активувати будь-який член каскаду коагуляції. Фактор скипання крові може бути учасником зовнішнього шляху, внутрішнього шляху або обох шляхів. В одному варіанті фактором скипання крові є фактор VII або фактор VIIa. Фактор VIIa може активувати фактор X, який взаємодіє з фактором Va, розщеплюючи протромбін до тромбіну, який в свою чергу розщеплює фібриноген до фібрину. В іншому варіанті фактором скипання крові є фактор IX або фактор IXa. У ще одному варіанті фактором скипання крові є фактор VIII або фактор VIIIa. У ще одному варіанті фактором скипання крові є фактор фон Віллебрандта, фактор XI, фактор XII, фактор V, фактор X або фактор XIII.

а. Стани, які можна лікувати

Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування будь-якого гемостатичного розладу. Гемостатичні розлади, які можна лікувати введенням химерного білка згідно з винаходом, включають, але не обмежені вказаним, гемофілію A, гемофілію B, хворобу фон Віллебрандта, недостатність фактора XI (недостатність РТА), недостатність фактора XII, а також недостатність або структурні аномалії фібриногену, протромбіну, фактора V, фактора VII, фактора X або фактора XIII.

В одному варіанті гемостатичний розлад є спадковим розладом. В одному варіанті суб'єкт має гемофілію A, і химерний білок містить фактор VIII або фактор VIIIa. В іншому варіанті суб'єкт має гемофілію A, і химерний білок містить фактор VII або фактор VIIa. В іншому варіанті суб'єкт має гемофілію B, і химерний білок містить фактор IX або фактор IXa. В іншому варіанті суб'єкт має гемофілію B, і химерний білок містить фактор VII або фактор VIIa. В іншому варіанті суб'єкт має інгібуючі антитіла до фактора VIII або фактора VIIIa, і химерний білок містить фактор VII або фактор VIIa. У ще одному варіанті суб'єкт має інгібуючі антитіла проти фактора IX або фактора IXa, і химерний білок містить фактор VII або фактор VIIa.

Химерний білок згідно з винаходом можна використати для профілактичного лікування суб'єкта з гемостатичним розладом. Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування гострого епізоду кровотечі у суб'єкта з гемостатичним розладом.

В одному варіанті гемостатичний розлад є результатом недостатності фактора скипання крові, наприклад, фактора IX, фактора VIII. В іншому варіанті гемостатичний розлад може бути результатом дефектного фактора скипання крові, наприклад, фактора фон Віллебрандта.

В іншому варіанті гемостатичний розлад може являти собою набутий розлад. Набутий розлад може бути результатом вторинного захворювання або стану, який лежить в основі. Неспорідним станом може бути, наприклад, без обмеження, злоякісна пухлина, аутоімунне захворювання або вагітність. Набутий розлад може бути результатом немолодого віку або медикаментозного лікування

вторинного розладу, який лежить в основі (наприклад, хіміотерапії злоякісної пухлини).

4. Способи лікування суб'єкта, потребує загального гемостатичного агента

Винахід також відноситься до способів лікування суб'єкта, який не має гемостатичного розладу або вторинного захворювання або стану, що приводить до набуття гемостатичного розладу. Таким чином, винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, потребує загального гемостатичного агента, що включає в себе введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного химерного білка, при цьому химерний білок містить перший і другий поліпептидні ланцюги, де перший поліпептидний ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну і щонайменше один фактор скипання крові, і другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без фактора скипання крові, що є в першому поліпептидному ланцюгу.

а. Стани, які можна лікувати

В одному варіанті суб'єкта, потребує загального гемостатичного агента, піддають або мають намір піддати хірургічній операції. Химерний білок згідно з винаходом можна вводити перед або після операції як профілактичний засіб. Химерний білок згідно з винаходом можна вводити під час або після операції, щоб контролювати гострий епізод кровотечі. Хірургічна операція може включати, але не обмежена вказаним, трансплантацію печінки, резекцію печінки або трансплантацію стовбурових клітин.

Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування суб'єкта, що має гострий епізод кровотечі, який не має гемостатичного розладу. Гострий епізод кровотечі може бути результатом важкої травми, наприклад, хірургічної операції, автомобільної аварії, поранення, вогнепального поранення або будь-якої іншої травматичної події, що призводить до кровотечі, яка не контролюється.

5. Засоби лікування

Химерний білок згідно з винаходом можна вводити внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньом'язово або через будь-яку поверхню слизової оболонки, наприклад, пероральним, під'язиковим, букальним, назальним, ректальним, вагінальним способом або через легеневий шлях. Химерний білок може бути імплантований в тверду підкладку на основі біополімеру або зв'язаний з підкладкою, яка забезпечує можливість повільного вивільнення химерного білка в необхідному місці.

Доза химерного білка згідно з винаходом буде варіювати в залежності від суб'єкта і конкретного шляху введення, що використовується. Дози можуть бути в діапазоні від 0,1 до 100000 мкг/кг маси тіла. В одному варіанті межі доз становлять 0,1-1000 мкг/кг. Білок може вводитись безперервно або з конкретними часовими інтервалами. Можна використати аналізи *in vitro*, щоб визначити оптимальні межі доз і/або схеми введення. В даній галузі відомо багато аналізів *in vitro*, в яких вимірюють інфекційність вірусу. Наприклад, можна використати аналіз оберненої транскриптази або ОТ-ПЛР-аналіз або аналіз розгалуженої ДНК, щоб

виміряти концентрації ВІЛ. Можна використати аналіз StaClot, щоб виміряти скипаючу активність. Крім того, ефективні дози можна екстраполювати на основі кривих доза-відповідь, одержаних в моделях на тваринах.

Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, що містить інгібітор злиття вірусу, щонайменше частину імуноглобуліну і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт. Приклади відповідних фармацевтичних носіїв описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin. Приклади ексципієнтів можуть включати крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, крейду, силікагель, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропілен, гліколь, воду, етанол і тому подібне. Композиція також може містити реагенти для рН-буферів і зволожувачі або емульгатори.

Для перорального введення фармацевтична композиція може мати форму таблеток або капсул, одержаних звичайними способами. Композиція також може бути одержана у вигляді рідини, наприклад, сиропу або суспензії. Рідина може містити суспендуючі агенти (наприклад, сироп сорбіту, похідні целюлози або гідрогенізовані харчові жири), емульгатори (лецитин або акацієву камедь), неводні наповнювачі (наприклад, мигдалеву олію, маслянисті складні ефіри, етиловий спирт або фракціоновані олії) і консерванти (наприклад, метил- або пропіл-пара-гідроксибензоати або сорбінову кислоту). Препарати також можуть містити коригенти, барвники і підсолонювачі. Альтернативно, композиція може бути одержана у вигляді сухого продукту для приготування з водою або іншим відповідним наповнювачем.

Для букального і під'язикового введення композиції можна надавати форму таблеток, коржиків або плівок, що швидко розчиняються, згідно зі звичайними протоколами.

У випадку введення шляхом інгаляції сполуки для застосування згідно з даним винаходом звичайно доставляють у формі аерозольного спрею з упаковки під тиском або розпилювача (наприклад, в PBS) з відповідним газом-витискувачем, наприклад, дихлордифторметаном, трихлорфторметаном, дихлортетрафторметаном, вуглекислим газом або іншим відповідним газом. У випадку аерозолі під тиском одиницю дозування можна визначати, забезпечуючи клапаном для доставки кількості, що вимірюється. Можуть бути приготувані капсули і картриджі, наприклад, з желатину, для застосування в інгаляторі або інсуфляторі, що містять порошкоподібну суміш сполуки і відповідної порошкоподібної основи, такої як лактоза або крохмаль.

Фармацевтична композиція може бути приготована для парентерального введення (наприклад, внутрішньовенного або внутрішньом'язового) за допомогою ін'єкції болюсу. Препарати для ін'єкції можуть бути представлені в дозованих лікарській формі, наприклад, в ампулах або контейнерах, що містять декілька доз з додаванням консерванта. Композиції можуть мати такі форми, як суспензії або емульсії в масляних або водних наповню-

вачах, і містити агенти для приготування лікарського засобу, такі як суспензуючі, стабілізуючі і/або диспергуючі агенти. Альтернативно, активний інгредієнт може бути у формі порошку для перерозчинення з використанням відповідного наповнювача, наприклад, апірогенної води.

Фармацевтична композиція також може бути приготована для ректального введення у вигляді супозиторію або утримуючої клізми, наприклад, що містять звичайні для супозиторіїв основи, такі як масло какао або інші гліцериди.

6. Комбінована терапія

Химерний білок згідно з винаходом можна використати для лікування суб'єкта із захворюванням або станом в комбінації щонайменше з одним іншим відомим засобом для лікування вказаного захворювання або стану.

В одному варіанті винахід відноситься до способу лікування суб'єкта, інфікованого ВІЛ, що включає в себе введення терапевтично ефективною кількістю щонайменше одного химерного білка, що містить перший і другий ланцюги, в якому перший ланцюг містить інгібітор злиття ВІЛ і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і другий ланцюг містить щонайменше частину імуноглобуліну без інгібітору злиття ВІЛ, що є в першому ланцюгу, в комбінації щонайменше з одним іншим агентом проти ВІЛ. Вказаним іншим агентом проти ВІЛ може бути будь-який терапевтичний засіб, для якого показана анти-ВІЛ-активність. Вказаний інший агент проти ВІЛ як приклад може включати, але не обмежений вказаним, інгібітор протеази (наприклад, Amprenavir®, Crixivan®, Ritonavir®), нуклеозидний аналог оберненої транскриптази (наприклад, AZT, DDI, D4T, 3TC, Ziagen®), нуклеозидний аналог-інгібітор оберненої транскриптази (наприклад, Sustiva®), інші інгібітори злиття ВІЛ, нейтралізуюче антитіло, специфічне по відношенню до ВІЛ, антитіло, специфічне по відношенню до CD4, міметик CD4, наприклад, злитий білок CD4-IgG2 (заявка на видачу патенту США 09/912824) або антитіло, специфічне по відношенню до CCR5 або CXCR4, або специфічний зв'язувальний партнер CCR5 або CXCR4.

В іншому варіанті винахід відноситься до способу лікування суб'єкта з гемостатичним розладом, що включає в себе введення терапевтично ефективною кількістю щонайменше одного химерного білка, що містить перший і другий ланцюги, в якому перший ланцюг містить щонайменше один фактор скипання крові і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без фактора скипання крові, що є в першому ланцюгу, в комбінації щонайменше з одним іншим фактором скипання крові або агентом, який стимулює гемостаз. Вказаним іншим фактором скипання крові або агентом, який стимулює гемостаз, може бути будь-який терапевтичний засіб з показаною скипаючою активністю. Як необмежувальний приклад фактор скипання крові або гемостатичний агент може включати фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протромбін або фібриноген або активовані форми будь-якого з

вказаних вище. Фактор скипання крові або гемостатичний агент також може включати антифібринолітичні лікарські засоби, наприклад, епсилон-амінокапронову кислоту, транексамову кислоту.

7. Способи інгібування злиття вірусів з клітиною-мішенню

Винахід також відноситься до способу *in vitro* інгібування злиття ВІЛ з клітиною ссавця, що включає в себе комбінування клітини ссавця щонайменше з одним химерним білком, при цьому химерний білок містить перший і другий ланцюги, де перший ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну та інгібітор ВІЛ, і другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без інгібітору ВІЛ, що є в першому ланцюгу.

Клітина ссавця може включати будь-яку клітину або лінію клітин, чутливу до інфекції ВІЛ, включаючи, без обмеження, первинні Т-клітини CD4⁺ людини або макрофаги, клітини MOLT-4, клітини CEM, клітини AA5 або клітин HeLa, які експресують CD4 на клітинній поверхні.

Г. Способи виділення химерних білків

Звичайно, коли одержують химерні білки згідно з винаходом, вони знаходяться в суміші інших молекул, таких як інші білки або фрагменти білків. Таким чином, винахід відноситься до способів виділення будь-якого з химерних білків, описаних вище, з суміші, що містить химерні білки. Визначено, що химерні білки згідно з винаходом зв'язуються з лігандами-барвниками у відповідних умовах і що зміна вказаних умов після зв'язування може розривати зв'язок між лігандом-барвником і химерним білком, тим самим забезпечуючи спосіб виділення химерного білка. У деяких варіантах суміш може містити гібрид мономер-димер, димер і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, наприклад, Fc. Таким чином, в одному варіанті винахід відноситься до способу виділення гібриду мономер-димер. В іншому варіанті винахід відноситься до способу виділення димеру.

Відповідно, в одному варіанті винахід відноситься до способу виділення гібриду мономер-димер з суміші, коли суміш містить

a) гібрид мономер-димер, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший ланцюг містить біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну, і в якому другий ланцюг містить щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну без біологічно активної молекули або варіабельної ділянки імуноглобуліну;

b) димер, що містить перший і другий поліпептидні ланцюги, в якому перший і другий ланцюги обидва містять біологічно активну молекулу і щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну; і

c) частину константної ділянки імуноглобуліну; при цьому вказаний спосіб включає в себе:

1) здійснення контакту суміші з лігандом-барвником, зв'язаним з твердою підкладкою у відповідних умовах, так що і гібрид мономер-димер і димер зв'язуються з лігандом-барвником;

2) видалення незв'язаної частини константної ділянки імуноглобуліну;

3) зміну відповідних умов 1) так, що зв'язок між гібридом мономер-димер і лігандом-барвником, зв'язаним з твердою підкладкою, розривається;

4) виділення гібриду мономер-димер.

У деяких варіантах перед здійсненням контакту суміші з лігандом-барвником суміш може бути піддана контакту з речовиною для хроматографії, такою як білок А-сефароза або тому подібним. Суміш елюють з речовини для хроматографії, використовуючи відповідний елюючий буфер (наприклад, буфер з низьким значенням рН) і елюат, що містить суміш, потім піддають контакту з лігандом-барвником.

Відповідні умови для контактування суміші з лігандом-барвником можуть включати буфер для підтримання суміші при відповідному рН. Відповідне значення рН може становити 3-10, 4-9, 5-8. В одному варіанті відповідне значення рН дорівнює 8,0. Можна використати будь-який буферний агент, відомий в даній галузі, за умови, що він підтримує рН у відповідному діапазоні, наприклад, Трис, HEPES, PIPES, MOPS. Відповідні умови також можуть включати буфер для промивання, щоб елювати незв'язані форми з ліганду-барвника. Буфером для промивання може бути будь-який буфер, який не руйнує зв'язування зв'язаної форми. Наприклад, буфером для промивання може бути такий же буфер, який використовують на стадії контактування.

Після того, як химерний білок зв'язують з лігандом-барвником, химерний білок виділяють, змінюючи відповідні умови. Зміна відповідних умов може включати додавання солі до буфера. Можна використати будь-яку сіль, наприклад, NaCl, KCl. Сіль потрібно додавати в концентрації, яка є досить високою, щоб зруйнувати зв'язування між лігандом-барвником і необхідною формою, наприклад, гібридом мономер-димер.

У деяких варіантах, коли суміш складається з Fc, гібриду мономер-димер і димеру, виявлено, що Fc не зв'язується з лігандом-барвником і, отже, елюється прохідним потоком. Димер зв'язується більш міцно з лігандом-барвником, ніж гібрид мономер-димер. Таким чином, потрібна більш висока концентрація солі, щоб зруйнувати зв'язок (наприклад, елюювати) між димером і лігандом-барвником у порівнянні з концентрацією солі, необхідною для руйнування зв'язку між лігандом-барвником і гібридом мономер-димер.

У деяких варіантах можна використати NaCl, щоб виділити гібрид мономер-димер з суміші. У деяких варіантах відповідна концентрація солі, яка руйнує зв'язок між лігандом-барвником і гібридом мономер-димер, становить 200-700 mM, 300-600 mM, 400-500 mM. В одному варіанті концентрація NaCl, необхідна для руйнування зв'язування між лігандом-барвником і гібридом мономер-димер, становить 400 mM.

NaCl також можна використати для виділення димеру з суміші. Звичайно гібрид мономер-димер виділяють з суміші до виділення димеру. Димер виділяють додаванням відповідної концентрації солі до буфера, таким чином руйнуючи зв'язування між лігандом-барвником і димером. У деяких варіантах відповідна концентрація солі, яка руйнує

зв'язок між лігандом-барвником і димером, складає від 800 mM до 2 M, від 900 mM до 1,5 M, від 950 mM до 1,2 M. В одному конкретному варіанті використовують 1 M NaCl, щоб зруйнувати зв'язування між лігандом-барвником і димером.

Лігандом-барвником може бути біоміметик. Біоміметик являє собою штучно одержану речовину, пристрій або систему, яка імітує природну. Таким чином, в деяких варіантах ліганд-барвник імітує молекули лігандів, що зустрічаються в природі. Ліганд-барвник може бути вибраний з Mimetic Red 1TM, Mimetic Red 2TM, Mimetic Orange 1TM, Mimetic Orange 2TM, Mimetic Orange 3TM, Mimetic Yellow 1TM, Mimetic Yellow 2TM, Mimetic Green 1TM, Mimetic Blue 1TM і Mimetic Blue 2TM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ). В одному конкретному варіанті лігандом-барвником є Mimetic Red 2TM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ). У деяких варіантах ліганд-барвник зв'язують з твердою підкладкою, наприклад, з Mimetic Red 1 A6XLTM, Mimetic Red 2 A6XLTM, Mimetic Orange 1 A6XLTM, Mimetic Orange 2 A6XLTM, Mimetic Orange 3 A6XLTM, Mimetic Yellow 1 A6XLTM, Mimetic Yellow 2 A6XLTM, Mimetic Green 1 A6XLTM, Mimetic Blue 1 A6XLTM і Mimetic Blue 2 A6XLTM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ).

Ліганд-барвник може бути зв'язаний з твердою підкладкою. Твердою підкладкою може бути будь-яка тверда підкладка, відома в даній галузі (дивіться, наприклад, www.seperationsNOW.com). Приклади твердих підкладок можуть включати кульку, гель, мембрану, наночастинку або мікросферу. Тверда підкладка може містити будь-який матеріал, який може бути зв'язаний з лігандом-барвником (наприклад, агарозу, полістирол, сефарозу, сефадекс). Тверді підкладки можуть містити будь-який синтетичний органічний полімер, такий як поліакриловий, вініловий полімери, акрилат, поліметакрилат і поліакриламід. Тверді підкладки також можуть містити вуглеводний полімер, наприклад, агарозу, целюлозу або декстран. Тверді підкладки можуть містити неорганічні оксиди, такі як діоксид кремнію, діоксид цирконію, діоксид титану, оксид церію, оксид алюмінію, магнезій (тобто оксид магнію) або оксид кальцію. Тверді підкладки також можуть містити комбінації деяких з вказаних вище підкладок, включаючи, без обмеження, декстран-акриламід.

Приклади

Приклад 1: Молекулярна маса впливає на трансцитоз, опосередкований FcRn Химерні білки, що складаються з різних білків, які представляють інтерес, і IgG Fc, одержували рекомбінантно (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) або у випадку контактин-Fc, MAB-β-gal (комплекс моноклонального антитіла, зв'язаного з β-gal) (Biodesign International, Saco, ME) і MAB-GH (комплекс моноклонального антитіла і гормону росту) (Research Diagnostics, Inc. Flanders, NJ) придбавали з комерційних джерел. Коротко, гени, що кодують білок, який представляє інтерес, клонували за допомогою ПЛР і потім субклонували в плазміді, яка експресує злиття Fc. Плазмідами

трансфікували клітини DG44 CHO і відбирали стабільні трансфектанти і розмножували з метотрексатом. Гомодимери химерного білка очищали на колонці з білком А. Тестовані білки включали інтерферон α , гормон росту, еритропоетин, фолікуло-стимулюючий гормон, фактор IX, бета-галактозидазу, контактин і фактор VIII. Зв'язування білків з частинами імуноглобуліну, включаючи партнер, який зв'язує рецептор FcRn, або використання комерційно доступних комплексів повне антитіло (включаючи FcRn-зв'язувальну ділянку)-антиген дозволило дослідити трансгеноз як функцію молекулярної маси (дивіться патент США № 6030613). Химерні білки вводили щурам перорально і вимірювали рівні в сироватці через 2-4 години після введення, використовуючи ELISA для рекомбінантно одержаних химерних білків і використовуючи вестерн-блот і ELISA для комерційно одержаних комплексів антитіл і химерних білків. Крім того, всі комерційно одержані білки або комплекси, а також контролю фактор VTII-Fc, фактор IX-Fc і Epo-Fc йодували, використовуючи кульки IODO (Pierce, Pittsburgh, PA). Результати показали, що рівні в сироватці Fc і химерних білків моноклональних антитіл, введених щурам перорально, безпосередньо пов'язані з розміром білка. Вірогідна точка відсікання для химерних білків Fc, що вводяться

перорально, знаходиться між 200 і 285 кДа (таблиця 2).

Таблиця 2

Білок	Розмір (кДа)	Трансцитоз
IFN α -Fc	92	++++
GH-Fc	96	+++
Epo-Fc	120	+++
FSH-Fc	170	+++
MAB:GH	172-194	+++
FIX-Fc	200	+
MAB: β Gal	285-420	-
Контактин-Fc	300	-
FVIII -Fc	380	-

Приклад 2: Клонування рсДНК 3.1-Flag-Fc

Послідовність для пептиду FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys), звичайної афінної мітки, що використовується для ідентифікації або очищення білків, клонували в плазміді рсДНК 3.1-Fc, яка містить сигнальну послідовність Igк миші, за якою слідує Fc-фрагмент IgG1 людини (амінокислоти 221-447, нумерація EU). Конструкцію створювали ПЛР з перекриванням, використовуючи наступні праймери:

FlagFc-F1: 5'- GCTGGCTAGCCACCATGGA -3'(SEQ ID NO:41)

FlagFc-R1: 5'- CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTCA

CCAGTGGAACCTGGAAC -3' (SEQ ID NO:42)

FlagFc-F2: 5'- GACTACMGG ACGACGATGA CAAGGACAAA

ACTCACACAT GCCCACCCTG CCCAGCTCCG GAACTCC -3' (SEQ ID NO:43)

FlagFc-R2: 5- TAGTGGATCCTCATTTACCCG -3' (SEQ ID NO:44)

Потім додавали матрицю рсДНК 3.1-Fc до двох окремих реакційних сумішей для ПЛР, що містить 50 пмоль кожні з пар праймерів FlagFc-F1/R1 або FlagFc-F2/R2 в 50 мкл реакційної суміші, використовуючи ДНК-полімеразу Pfu Ultra (Stratagene, CA) згідно зі стандартним протоколом виробника, в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 95°C 2 хвилини; 30 циклів (95°C 30 секунд, 52°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), потім 72°C протягом 10 хвилин. Потім продукти вказаних двох реакцій змішували в іншій реакції ПЛР (2 мкл кожний) з 50 пмоль праймерів FlagFc-F1 і FlagFc-R2 в 50 мкл реакційної суміші, використовуючи ДНК-полімеразу Pfu Ultra (Stratagene, CA) згідно зі стандартним протоколом виробника, в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 95°C 2 хвилини; 30 циклів (95°C 30 секунд, 52°C 30 секунд, 72°C 45 секунд) потім 72°C про-

тягом 10 хвилин. Одержаний в результаті фрагмент очищали з гелю, розщеплювали і вбудовували в плазміді рсДНК 3.1-Fc в сайт NheI-BamHI. Одержана в результаті плазміді містить сигнальну послідовність Igк миші, продукуючи білок FlagFc.

Приклад 3: Клонування конструкції фактор VII-Fc

Кодуючу послідовність фактора VII одержували в ОТ-ПЛР з РНК фетальної печінки людини (Clontech, Palo Alto, CA). Клонована ділянка містила послідовність кДНК від 36 п.н. до 1430 п.н., що закінчується безпосередньо перед стоп-кодоном. У N-кінець вводили сайт SbfI. Сайт BspEI вводили в C-кінець. Конструкцію клонували за допомогою ПЛР, використовуючи праймери:

Антисмисловий:

5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG
3'(SEQ ID NO:45)

Смисловий:

5' CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTT
TGTCCGGAAAT GG 3' (SEQ ID NO:46)

і наступні умови: 95°C протягом 5 хвилин, потім 30 циклів (95°C протягом 30 секунд, 55°C протягом 30 секунд, 72°C протягом 1 хвилини і 45 секунд) і кінцевий цикл подовження 72°C протягом 10 хвилин.

Фрагмент розщеплювали SbfI-BspEI і вбудовували в pED.dC-Fc, плазмиду, що кодує Fc-фрагмент IgG1.

natFIX-F: 5'-TTACTGCAGAAGGTTATGCAGCGCGTGAACATG- 3'(SEQ ID NO:47)

F9-R: 5'-TTTTTCGAATTCAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC- 3'(SEQ ID NO:48)

20 нг РНК печінки дорослої людини (Clontech, Palo Alto, CA) і 25 пмоль кожного праймера додавали до реакційної суміші для ОТ-ПЛР, використовуючи одностадійну ОТ-ПЛР Superscript™ з системою Taq PLATINUM® (Invitrogen, Carlsbad, CA) згідно з протоколом виробника. Реакцію здійснювали в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 50°C 30 хвилин; 94°C 2 хвилини; 35 циклів (94°C 30 секунд, 58°C 30 секунд, 72°C 1 хвилина), і кінцевий 72°C 10 хвилин. Фрагмент

PACE-F1: 5'- GGTAAGCTTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC -3'(SEQ ID NO:49)

PACE-R1: 5'- GTTTTCAATCTCTAGGACCCACTCGCC -3'(SEQ ID NO:50)

PACE-F2: 5'- GCCAGGCCACATGACTACTCCGC -3'(SEQ ID NO:51)

PACE-R2: 5'- GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC -3'(SEQ ID NO:52)

Праймер PACE-F1 додає сайт HindIII до 5'-кінця послідовності PACE, починаючи з 3 нуклеотиду перед стартовим кодоном, тоді як праймер PACE-R2 додає стоп-кодон після амінокислоти 715, яка має місце на кінці позаклітинного домену PACE, а також додає сайт EcoRI до 3'-кінця стоп-кодону. Праймери PACE-R1 і -F2 випаляються з 3'- і 5'-сторони від внутрішнього сайту BamHI, відповідно. Потім готували дві реакційні суміші для ОТ-ПЛР, використовуючи 25 пмоль кожної з пар праймерів PACE-F1/R1 або PACE-F2/R2 з 20 нг РНК печінки дорослої людини (Clontech; Palo Alto, CA) в 50 мкл реакційної суміші для ОТ-ПЛР, використовуючи одностадійну ОТ-ПЛР Superscript™ з системою Taq PLATINUM® (Invitrogen, Carlsbad, CA) згідно з протоколом виробника. Реакцію здійснювали в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 50°C 30 хвилин; 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 58°C 30 секунд, 72°C 2 хвилини), потім 72°C 10

Приклад 4: Клонування конструкції фактор IX-Fc

Кодуючу послідовність фактора IX, включаючи послідовність препропептиду, одержували ампліфікацією в ОТ-ПЛР з РНК печінки дорослої людини, використовуючи наступні праймери:

очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю Qiagen (Qiagen, Valencia, CA), і розщеплювали PstI-EcoRI, очищали з гелю і клонували у відповідним чином розщеплений плазмід рED.dC.XFc.

Приклад 5: Клонування конструкції PACE

Кодуючу послідовність ендопротеази PACE людини (фермент, що розщеплює спарені основні амінокислоти) одержували за допомогою ОТ-ПЛР. Використовували наступні праймери:

хвилин. Кожний з таких фрагментів лігували у вектор pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) і повністю секвенували. Потім фрагмент F2-R2 субклонували в рсДНК6 V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA), використовуючи сайти BamHI/EcoRI, і потім фрагмент F1-R1 клонували в даній конструкції, використовуючи сайти HindIII/BamHI. Кінцева плазміда рсДНК6-PACE продукувала розчинну форму PACE (амінокислоти 1-715), оскільки трансмембранна ділянка була делетована. Послідовність PACE в рсДНК6-PACE по суті така, як описано в Harrison et al. 1998, Seminars in Hematology 35:4.

Приклад 6: Клонування конструкції IFN α -Fc-восьмиаминокислотний лінкер

Кодуючу послідовність інтерферону α 2b людини (hIFN α), включаючи сигнальну послідовність, одержували за допомогою ПЛР з геномної ДНК людини, використовуючи наступні праймери:

IFNa-Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-
3'(SEQ ID NO:53)

IFNa-EcoR-R: 5'-CGTTGAATTCTTCCTTACTTCTTAACTTTCTTGC-
3'(SEQ ID NO:54)

Геномну ДНК одержували з лінії клітин астрцитом людини 373MG згідно зі стандартними способами (Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Коротко, приблизно 2×10^5 клітин осаджували центрифугуванням, ресуспендували в 100 мкл фосфатно-сольового буфера, pH 7,4, потім змішували з рівним об'ємом лізуючого буфера (100 мМ Трис pH 8,0/200 мМ NaCl/2% SDS/5 мМ EDTA). Додавали протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл і зразок розщеплювали при 37°C протягом 4 годин, час від часу обережно перемішуючи. Потім зразок двічі екстрагували сумішшю фенол:хлороформ, ДНК преципітували додаванням ацетату натрію pH 7,0 до 100 мМ і рівного об'єму ізопропанолу, і осаджували центрифугуванням протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Надосад видаляли і осад один раз промивали холодним 70% етанолом і давали можливість висохти на повітрі перед ресуспендуванням в TE (10 мМ Трис pH 8,0/1 мМ EDTA).

Потім 100 нг одержаної геномної ДНК використовували в реакції ПЛР в об'ємі 25 мкл з 25

пмоль кожного праймера, використовуючи систему високоточної Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника, в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 50°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), і на решті 72°C 10 хвилин. Смуку очікуваного розміру (-550 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia, CA), розщеплювали PstI/EcoRI, знов очищали в гелі і клонували в сайт PstI/EcoRI pED.dC.XFc, яка містить 8-амінокислотний лінкер (EFAGAAAV), за яким слідує ділянка Fc IgG1 людини.

Приклад 7: Клонування конструкції IFN α -Fc-лінкер Δ

1 мкг очищеної ДНК pED.dC.-нативний IFN α -Fc людини з прикладу 6 потім використовували як матрицю в реакції ПЛР в об'ємі 25 мкл з 25 пмоль кожного праймера IFN α -Sig-F і наступного праймера:

CACGTGTGAGTTTTGTCTTCCTTACTTCTTAACTTTTGCAAGTTTG- 3'(SEQ ID NO:55)

Реакцію ПЛР здійснювали, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT), денатуруючи при 94°C протягом 2 хвилин з подальшими 18 циклами (95°C протягом 15 секунд, 55°C протягом 0 секунд і 72°C протягом 1 хвилини), з нахилом 6, з подальшим подовженням при 72°C протягом 10 хвилин. ПЛР-продукт правильного розміру (-525 п.н.) очищали в гелі, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia, CA), розщеплювали ферментами рестрикції PstI і BspEI, очищали в гелі і субклонували у відповідних сайтах модифікованої pED.dC.XFc,

де амінокислоти 231-233 Fc-ділянки були змінені з використанням виродженості генетичного коду так, щоб включити сайт BspEI, зберігаючи при цьому амінокислотну послідовність дикого типу.

Приклад 8: Клонування конструкції IFN α -Fc-лінкер GS15

Створювали вектор з новим кістяком, використовуючи Fc, що є в конструкції з лінкером Δ (що містить сайти BspEI і RsrII в 5'-кінцевій ділянці, використовуючи виродженість генетичного коду, щоб зберегти амінокислотну послідовність), використовуючи вказану ДНК як матрицю для реакції ПЛР з наступними праймерами:

5' B2xGGGGS: 5' gtcaggatccggcggtggagggagcgacaaaactcacacgtgccc
3'(SEQ ID NO:56)

3' GGGGS: 5' tgacgcggccgctcatttaccggagacaggg 3'(SEQ ID NO:57)

Реакцію ПЛР здійснювали з 25 пмоль кожного праймера, використовуючи фермент Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA) згідно зі стандартним протоколом виробника, в термоциклері MJ, використовуючи наступний спосіб: 95°C 2 хвилини; 30 циклів (95°C 30 секунд, 54°C 30 секунд, 72°C 2 хвилини), 72°C 10 хвилин. Смуку очікуваного розміру (-730 п.н.) очищали з гелю, використовуючи

набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), розщеплювали BamHI/NotI; знов очищали в гелі і клонували в розщепленому BamHI/NotI векторі pсДНК6 ID, варіанті pсДНК6 з послідовністю IRES і геном dhfr, вбудованим в сайт NotI/XbaI.

Потім 500 нг очищеної ДНК рED.dC.-нативний
IFN α Fc людини використовували як матрицю в

ПЛР в об'ємі 25 мкл з наступними праймерами:

5' IFN α for GGGGS: 5' ccgctagcctgcaggccaccatggccttgacc 3'(SEQ ID NO:58)

3' IFN α for GGGGS: 5' ccggatccgccgccaccttccttactacgtaaac 3'(SEQ ID NO:59)

Реакцію ПЛР здійснювали з 25 пмоль кожного праймера, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника, в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 95°C 2 хвилини; 14 циклів (94°C 30 секунд, 48°C 30 секунд, 72°C 1 хвилина), 72°C 10 хвилин. Смуго очікуваного розміру (~600 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), розщеплювали

NheI/BamHI, знов очищали в гелі і клонували в сайтi NheI/BamHI вектора рсДНК6 ID/Fc, вказаному вище, щоб створити злиття Fc IFN α з 10-амінокислотним лінкером Gly/Ser (2×GGGS), рсДНК6 ID/IFN α -GS10-Fc.

Потім здійснювали реакцію ПЛР, використовуючи 500 нг вказаної рсДНК6 ID/ IFN α -GS10-Fc з наступними праймерами:

5' B3XGGGGS:5'(SEQ ID NO:60)

gtcaggatccgggtggaggcgggtccggcgggtggaggagcgacaaaactcacacgtgccc 3'(SEQ ID NO:61)

fcciv-R: 5' atagaagcctttgaccaggc 3'(SEQ ID NO:62)

Реакцію ПЛР здійснювали з 25 пмоль кожного праймера, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника, в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 95°C 2 хвилини; 14 циклів (94°C 30 секунд, 48°C 30 секунд, 72°C 1 хвилина), 72°C 10 хвилин. Смуго очікуваного розміру (504 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), розщеплювали BamHI/BspEI, смугу 68 п.н. очищали з гелю і клонували в сайтi BamHI/BspEI вектора рсДНК6

ID/IFN α -GS10-Fc, вказаному вище, щоб створити злиття Fc IFN α з 15-амінокислотним лінкером Gly/Ser (3×GGGS), рсДНК6 ID/IFN α -GS15-Fc.

Приклад 9: Клонування конструкції основного пептиду

Шарнірну ділянку Fc-фрагмента IgG1 людини з амінокислот 221-229 (нумерація EU) замінювали основним пептидом (CCB).

Використали чотири олігонуклеотиди, що перекриваються (IDT, Coralville, IA):

1. CCB-Fc Смысловий 1:

5' GCC GGC GAA TTC GGT GGT GAG TAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG GTG GCC CAG CTG AAG GCC AAG AAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG 3'(SEQ ID NO:63)

2. CCB-Fc Смысловий 2:

5' GTG GCC CAG CTG AAG CAC AAG GGC GGC GGC CCC GCC CCA GAG CTC CTG GGC GGA CCG A 3'(SEQ ID NO:64)

3. CCB-Fc Антисмысловий 1:

5' CGG TCC GCC CAG GAG CTC TGG GGC GGC GCC GCC CTT GTG CTT CAG CTG GGC CAC CTT CTT CTT CAG GGC CTG GTT CTT G 3'(SEQ ID NO:65)

4. CCB-Fc Антисмысловий 2:

5' GCC TTC AGC TGG GCC ACC TTC TTC TTC AGG GCC TGG TAC TCA CCA CCG AAT TCG CCG GCA 3'(SEQ ID NO:66)

Олігонуклеотиди перерозчиняли до концентрації 50 мкМ в дН₂O. 5 мкл кожного олігонуклеотиду випалювали один з одним, об'єднуючи в

тонкостінній пробірці для ПЛР з 2,2 мкл буфера для реакції № 2 (тобто кінцева концентрація 10 мМ Трис-HCl pH 7,9, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1

мМ дитіотреїтол) (New England Biolabs, Beverly, MA) і нагрівачи до 95°C протягом 30 секунд, і потім давали можливість випалюватись, повільно охолоджуючи протягом 2 годин до 25°C. 5 пмоль підданих відпалу олігонуклеотидів лігували у вектор pGEM T-Easy згідно з інструкцією, прикладеною до набору (Promega, Madison WI). Суміш для лігування додавали до 50 мкл DH5α-компетентних клітин E. coli (Invitrogen, Carlsbad, CA) на льоду протягом 2 хвилин, інкубували при 37°C протягом 5 хвилин, інкубували на льоду протягом 2 хвилин і потім висівали на чашки з агаром, що містить LB+100 мкг/л ампіциліну, і вміщували в 37°C на 14 годин. Збирали окремі бактеріальні колонії і вміщували в 5 мл LB+100 мкг/л ампіциліну і давали можливість рости протягом 14 годин. Пробірки центрифугували при 2000 g, 4°C протягом 15 хвилин і векторну ДНК

1. Еро-ССА-Fc Смысловий 1:

5' CCG GTG ACA GGG AAT TCG GTG GTG AGT ACC AGG CCC TGG AGA AGG
AGG TGG CCC AGC TGG AG 3'(SEQ ID NO:67)

2. Еро-ССА-Fc Смысловий 2:

5' GCC GAG AAC CAG GCC CTG GAG AAG GAG GTG GCC CAG CTG GAG
CAC GAG GGT GGT CCC GCT CCA GAG CTG CTG GGC GGA CA 3'(SEQ
ID NO:68)

3. Еро-ССА-Fc Антисмысловий 1:

5' GTC CGC CCA GCA GCT CTG GAG CGG GAC CAC CAC CCT CGT GCT CCA
GCT GGG CCA C 3'(SEQ ID NO:69)

4. Еро-ССА-Fc Антисмысловий 2:

5' CTC CTT CTC CAG GGC CTG GTT CTC GGC CTC CAG CTG GGC CAC CTC
CTT CTC CAG GGC CTG GTA CTC ACC ACC GAA TTC CCT GTC ACC GGA
3'(SEQ ID NO:70)

Олігонуклеотиди перерозчиняли до концентрації 50 мкМ в дН₂O. 5 мкл кожного олігонуклеотиду випалювали один з одним, об'єднуючи в тонкостінній пробірці для ПЛР з 2,2 мкл буфера для реакції № 2 (New England Biolabs, Beverly, MA) і нагрівачи до 95°C протягом 30 секунд, і потім давали можливість випалюватись, повільно охолоджуючи протягом 2 годин до 25°C. 5 пмоль підданих відпалу олігонуклеотидів лігували у вектор pGEM T-Easy згідно з інструкцією, прикладеною до набору (Promega, Madison WI). Суміш для лігування додавали до 50 мкл DH5α-компетентних клітин E. coli (Invitrogen, Carlsbad, CA) на льоду протягом 2 хвилин, інкубували при 37°C протягом 5 хвилин, інкубували на льоду протягом 2 хвилин і потім висівали на чашки з агаром, що містить LB+100 мкг/л ампіциліну, і вміщували в 37°C на 14 годин. Збирали окремі бактеріальні колонії і вміщували в 5 мл LB+100 мкг/л ампіциліну і давали можливість рости протягом 14 годин. Пробірки центрифугували при 2000 g, 4°C протягом 15 хвилин і векторну ДНК

виділяли, використовуючи набір Qiagen miniprep (Qiagen, Valencia, CA), як указано в керівництві, прикладеному до набору. 2 мкг ДНК розщеплювали NgoM IV-Rsr-II. Фрагмент очищали в гелі способом Qiaquick, як указано в керівництві, прикладеному до набору (Qiagen, Valencia, CA), і лігували з pED.dcEpoFc, розщепленою NgoM IV/Rsr II. Продуктом лігування трансформували DH5α-компетентні клітини E. coli і одержували ДНК, як описано для вектора pGEM T-Easy.

Приклад 10: Клонування конструкції еритропоетин-кислий пептид-Fc

Шарнірну ділянку Fc-фрагмента IgG1 людини в EPO-Fc з амінокислот 221-229 (нумерація EU) замінювали кислим пептидом (ССА).

Використали чотири олігонуклеотиди, що перекриваються (IDT, Coralville, IA):

(Qiagen, Valencia, CA), як указано в керівництві, прикладеному до набору. 2 мкг ДНК розщеплювали Age I-Rsr-II. Фрагмент очищали в гелі способом Qiaquick, як указано в керівництві, прикладеному до набору (Qiagen, Valencia, CA), і лігували з pED.Epo Fc.1, розщепленою Age I-Rsr II. Продуктом лігування трансформували DH5α-компетентні клітини E. coli і одержували ДНК, як описано вище.

Приклад 11: Клонування конструкції Cys-Fc

Використовуючи ПЛР і стандартні способи молекулярної біології (Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press), створювали експресуючу конструкцію ссавців так, щоб кодуєча послідовність сигнального пептиду IFNα людини безпосередньо вливалась в кодуєчу послідовність Fc, що починається з першого залишку цистеїну (Cys 226, нумерація EU). Таким чином, після розщеплення сигнальною пептидазою і секреції з клітин ссавців створювали білок Fc з N-кінцевим залишком цистеїну. Коротко, праймери

IFN α -Sig-F (IFN α -Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTT
TGCTTTAC-3')(SEQ ID NO:71) i Cys-Fc-R
(5'-CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGA
GAGCCCACAGAGCAGCTTG-3') (SEQ ID NO:72)

використовували в реакції ПЛР, щоб створити фрагмент, який зв'яже сигнальну послідовність IFN α з N-кінцем Fc, що починається з Cys 226. 500 нг рED.dC-нативний hIFN α -лінкер Δ додавали до 25 пмоль кожного праймера в реакції ПЛР з використанням високоточної системи Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника. Реакцію здійснювали в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 50°C 30 секунд, 72°C 45 секунд) і нарешті 72°C 10 хвилин. Смугу очікуваного розміру (~112 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen,

Valencia, CA), розщеплювали PstI і BspEI, очищали в гелі і субклонували у відповідних сайтах рED.dC-нативний hIFN α -лінкер Δ , щоб створити рED.dC.Cys-Fc (Fig. 5).

Приклад 12: Експресії білка і одержання Fc-MESNA

Кодуючу послідовність Fc (константна ділянка IgG1 людини) одержували за допомогою ПЛР-ампліфікації з Fc-вмісної плазмиди, використовуючи стандартні умови і реагенти, слідуючи способу, рекомендованому виробником, щоб субклонувати Fc-кодуючу послідовність NdeI/SapI. Коротко, праймери

5'- GTGGTCATA

TGGGCATTGAAGGCAGAGGCGCCGCTGCGGTGCG - 3'(SEQ ID NO:73) i 5'-
GGTGGTTGC TCTCCGCAAAAACCCGGAGACAGGGAGAGACTCTTCTGCG - 3'
(SEQ ID NO:74)

використовували, щоб ампліфікувати послідовність Fc з 500 нг плазмиди рED.dC.EPO-Fc, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Basel Switzerland) в термоциклері RapidCycler (Idaho Technology Salt Lake City, Utah), денатуруючи при 95°C протягом 2 хвилин з подальшими 18 циклами при 95°C протягом 0 секунд, 55°C протягом 0 секунд і 72°C протягом 1 хвилини, з нахилом 4, з подальшим подовженням при 72°C протягом 10 хвилин. Продукт ПЛР субклонували в проміжному клонуючому векторі і повністю секвенували, і потім субклонували, використовуючи сайти NdeI і SapI у векторі pTWIN1, слідуючи стандартним способом, Sambrook, J., Fritsch, E. F. і Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Потім вказаною плазмидою трансформували клітини BL21(DE3)pLysS, використовуючи стандартні способи (там же). 1 літр культури клітин вирощували до реєстрації оптичної щільності 0,8 од. ОП при 31°C, індукували 1 mM ізопропіл-бета-D-1-тіогалактопіранозидом і вирощували протягом ночі при 25°C. Клітини осаджували центрифугуванням, лізували в 20 mM Трис 8,8/1% NP40/0,1 mM фенілметансульфонілфториду/1 мкг/мл бензонази (Novagen Madison, WI) і зв'язували з хітиновими кульками (New England Biolabs; Beverly, MA) протягом ночі при 4°C. Потім кульки промивали декількома об'ємами колонки 20 mM Трис 8,5/500 mM NaCl/1 mM EDTA і потім зберігали при -80°C. Очищений Fc-MESNA одержували елюванням білка з кульок в 20 mM Трис 8,5/500 mM NaCl/1 mM EDTA/500 mM 2-

меркаптоетансульфоновій кислоті (MESNA) і елюат використовували в реакції зв'язування, описаній нижче.

Приклад 13: Експресія і очищення гібриду мономер-димер фактор VII-Fc

Створювали клітини CHO DG-44, які експресують фактор VII-Fc. Клітини CHO DG-44 вирощували при 37°C, 5% CO₂, в MEM-альфа плюс нуклеозид і рибонуклеозиди і з додаванням 5% інактивованої нагріванням фетальної бичачої сироватки до трансфекції.

Клітини DG44 висівали в чашки Петрі для культури тканини діаметром 100 мм і вирощували до злиття в моношар на 50%-60%. Всього 10 мкг ДНК використали для трансфекції клітин на одній чашці діаметром 100 мм: 7,5 мкг рED.dC.FVII-Fc + 1,5 мкг рсДНК3/Flag-Fc + 1 мкг рсДНК6-PACE. Клітини трансфікували, як описано в керівництві до реагенту для трансфекції Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Середовище видаляли з суміші для трансфекції через 48 годин і замінювали MEM-альфа без нуклеозидів плюс 5% діалізованої фетальної бичачої сироватки і 10 мкг/мл бластицидину (Invitrogen, Carlsbad, CA) і 0,2 мг/мл генетицину (Invitrogen, Carlsbad, CA). Через 10 днів клітини знімали з чашки 0,25% трипсином і переносили у флакони для культури тканини T25 і селекцію продовжували протягом 10-14 днів доки клітини не починали добре рости, оскільки були створені стабільні лінії клітин. Потім експресію білка збільшували за допомогою додавання 25 нМ метотрексату.

Приблизно 2x10⁷ клітин використовували для інокуляції в 300 мл середовища для зростання у

флаконах, що обертаються, об'ємом 1700 см² (Corning, Corning, NY) з додаванням 5 мкг/мл вітаміну К₃ (бісульфіт менадіону натрію) (Sigma, St Louis, MO). Флакони, що обертаються, інкубували, в 5% CO₂ при 37°C протягом 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 10 мкг/мл гентаміцину) з додаванням 5 мкг/л вітаміну К₃. Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожний день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор. Об'єднане середовище спочатку освітлювали, використовуючи фільтр з скловолнока Sartoclean (3,0 мкм + 0,2 мкм) (Sartorius Corp. Göttingen, Germany), потім фільтр Acropack 500 (0,8 мкм + 0,2 мкм) (Pall Corp., East Hills, NY). Потім освітлене середовище концентрували приблизно в 20 разів, використовуючи касети для фільтрації в тангенціальному потоку Pellicon (межа відсікання за молекулярною масою 10 кДа) (Millipore Corp., Billerica, MA).

Потім Fc-хімери вловлювали з концентрованого середовища пропусканням через колонку з білок А-сефарозою 4 Fast Flow (AP Biotech, Piscataway, NJ). На колонку 5×5 см (100 мл) навантажували ≤5 мг білка Fc на мл об'єму колонки при лінійній швидкості потоку 100 см/год., щоб добитись часу витримування 3 хвилин. Потім колонку промивали >5 об'ємами колонки 1×DPBS, щоб видалити неспецифічно зв'язані білки. Зв'язані білки елюювали 100 мМ гліцином pH 3,0. Елюйовані фракції, що містять пік білка, потім нейтралізували додаванням 1 частини 1 М Трис-HCl, pH 8 на 10 частин елюйованої фракції.

Щоб видалити гомодимери FLAG-Fc (тобто химерні димери Fc з пептидом FLAG, експресованим у вигляді злиття з обома молекулами Fc) з препарату об'єднані фракції з швидкого потоку через білок А-сефарозу 4 пропускали через катіонообмінну колонку Unosphere S (BioRad Corp., Richmond, CA). При робочих умовах для колонки гібрид мономер-димер FLAG-Fc стає незарядженим (теоретична рi FLAG-Fc = 6,19) і проходить через колонку, тоді як конструкції hFVII-Fc є позитивно зарядженими і, отже, зв'язуються з колоною і елюються при більш високій іонній силі. Об'єднані фракції з швидкого потоку через білок А-сефарозу 4 спочатку діалізували в 20 мМ MES, 20 мМ NaCl, pH 6,1. Потім діалізований матеріал наносили на колонку 1,1×11 см (9,9 мл) зі швидкістю 150 см/год. Під час промивання і елювання швидкість потоку збільшували до 500 см/год. Колонку послідовно промивали 8 об'ємами колонки 20 мМ MES, 20 мМ NaCl, pH 6,1 і 8 об'ємами колонки 20 мМ MES, 40 мМ NaCl, pH 6,1. Зв'язаний білок елюювали 20 мМ MES, 750 мМ NaCl, pH 6,1. Елюйовані фракції, що містять пік білка, об'єднували і стерильно фільтрували через фільтрувальний диск 0,2 мкм перед зберіганням при -80°C.

Афінну колонку з мАт проти FLAG використали для відділення химерних димерів Fc з hFVII,

злитим з обома молекулами Fc, від химерних димерів з одним пептидом FLAG і одним злиттям hFVII. Об'єднані елюйовані фракції з Unosphere S розбавляли 1:1 20 мМ Трис, 50 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, pH 8 і наносили на колонку 1,6×5 см, що містить анти-FLAG-сефарозу M2 (Sigma Corp., St. Louis, MO) з лінійною швидкістю потоку 60 см/год. Мета полягала в нанесенні <2,5 мг гібриду мономер-димер/мл об'єму колонки. Після нанесення колонку промивали 5 об'ємами колонки 20 мМ Трис, 50 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, pH 8,0, потім гібриди мономер-димер елюювали 100 мМ гліцину, pH 3,0. Потім елюйовані фракції, що містять пік білка, нейтралізували додаванням 1 частини 1 М Трис-HCl, pH 8, до 10 частин елюйованої фракції. Об'єднані фракції зберігали при -80°C.

Приклад 14: Експресія і очищення гомодимеру фактор IX-Fc і гібриду мономер-димер

Створювали клітини CHO DG-44, які експресують фактор IX-Fc. Клітини CHO DG-44 висівали в чашки Петрі для культури тканини діаметром 100 мм і вирощували до злиття в моношар на 50%-60%. Всього 10 мкг ДНК використовували для трансфекції клітин на одній чашці діаметром 100 мм: для трансфекції гомодимером використовували 8 мкг pED.dC-фактор IX-Fc + 2 мкг pсДНК6-PACE; для трансфекції гібридом мономер-димер використовували 8 мкг pED.dC-фактор IX-Fc + 1 мкг pсДНК3-FlagFc + 1 мкг pсДНК6-PACE. Клітини трансфікували, як описано в керівництві до реагенту для трансфекції Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Середовище видалляли з суміші для трансфекції через 48 годин, і замінювали MEM-альфа без нуклеозидів плюс 5% діалізованої фетальної бичачої сироватки і 10 мкг/мл бластицидину (Invitrogen, Carlsbad, CA) у випадку обох трансфекцій, тоді як у випадку трансфекції гібридом мономер-димер також додавали 0,2 мг/мл генетицину (Invitrogen, Carlsbad, CA). Через 3 дні клітини знімали з чашки 0,25% трипсином і переносили у флакони для культури тканини T25 і селекцію продовжували протягом 10-14 днів до того, доки клітини не починали добре рости, оскільки були створені стабільні лінії клітин. Потім експресію білка збільшували за допомогою додавання 10 нМ або 100 нМ метотрексату у випадку гомодимеру або гібриду мономер-димер, відповідно.

У випадку обох клітинних ліній приблизно 2×10⁷ клітин використовували для інокуляції в 300 мл середовища для зростання у флакон, що обертається, об'ємом 1700 см² (Corning, Corning, NY) з додаванням 5 мкг/л вітаміну К₃ (бісульфіт менадіону натрію) (Sigma, St Louis, MO). Флакони, що обертаються, інкубували в 5% CO₂ при 37°C протягом 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 10 мкг/мл гентаміцину) з додаванням 5 мкг/л вітаміну К₃. Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожний день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор.

Перед хроматографією середовище освітлювали, використовуючи фільтр SuporCap-100 (0,8/0,2 мкм) (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI). Всі наступні стадії проводили при 4°C. Освітлене середовище наносили на білок А-сефарозу, промивали 5 об'ємами колонки 1×PBS (10 мМ фосфат, рН 7,4, 2,7 мМ KCl і 137 мМ NaCl), елюювали 0,1 М гліцином, рН 2,7, і потім нейтралізували 1/10 об'єму 1 М Трис-HCl, рН 9,0. Потім білок діалізували в PBS.

Зразок білка для трансфекції гібридом мономер-димер піддавали подальшому очищенню, оскільки він містив суміш гомодимеру FIX-Fc:FIX-Fc, гібриду мономер-димер FIX-Fc:Flag-Fc і гомодимеру Flag-Fc:Flag-Fc. Матеріал концентрували і наносили на колонку 2,6×60 см (318 мл) Superdex 200 Prep Grade зі швидкістю потоку 4 мл/хвилину (36 см/год.) і потім елюювали 3 об'ємами колонки 1×PBS. Фракції, відповідні двом пікам на УФ-детекторі, збирали і аналізували в SDS-ПААГ. Фракції першого піка містили або гомодимер FIX-Fc:FIX-Fc, або гібрид мономер-димер FIX-Fc:Flag-Fc, тоді як другий пік містив гомодимер Flag-Fc:Flag-Fc. Всі фракції, що містять гібрид мономер-димер, але не містять гомодимер Flag-Fc, об'єднували і наносили безпосередньо на колонку 1,6×5 см з анти-FLAG-сефарозою M2 (Sigma Corp., St. Louis, MO) з лінійною швидкістю потоку 60 см/год. Після нанесення колонку промивали 5 об'ємами колонки PBS. Потім гібриди мономер-димер елюювали 100 мМ гліцином, рН 3,0. Елюйовані фракції, що містять пік білка, потім нейтралізували додаванням 1/10 об'єму 1 М Трис-HCl і аналізували у відновлювальному і невідновлювальному SDS-ПААГ. Фракції діалізували в PBS, концентрували до 1-5 мг/мл і зберігали при -80°C.

Приклад 15: Експресія і очищення гомодимеру IFN α і гібриду мономер-димер

Створювали клітини CHO DG-44, які експресують hIFN α . Клітини DG-44 висівали в чашки Петрі для культури тканини діаметром 100 мм і вирощували до злиття в моношар на 50%-60%. Всього 10 мкг ДНК використали для трансфекції клітин на одній чашці діаметром 100 мм: для трансфекції гомодимером 10 мкг конструкцій hIFN α -Fc; для трансфекції гібридом мономер-димер 8 мкг конструкцій hIFN α -Fc + 2 мкг рсДНК3-Flag-Fc. Клітини трансфікували, як описано в керівництві до реагенту для трансфекції Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Середовище видаляли з суміші для трансфекції через 48 годин, і замінювали MEM-альфа без нуклеозидів плюс 5% діалізованої фетальної бичачої сироватки, у випадку трансфекції гібридом мономер-димер також додавали 0,2 мг/мл генетицину (Invitrogen, Carlsbad, CA). Через 3 дні клітини знімали з чашки 0,25% трипсином і переносили у флакони для культури тканини T25 і селекцію продовжували протягом 10-14 днів доти, доки клітини не починали добре рости, оскільки були створені стабільні лінії клітин. Потім експресію білка збільшували за допомогою додавання метотрексату в діапазоні від 10 до 50 нМ.

У випадку всіх клітинних ліній приблизно 2×10^7 клітин використовували для інокуляції в 300 мл середовища для зростання у флакон, що обертається, об'ємом 1700 см² (Corning, Corning, NY). Флакони, що обертаються, інкубували в 5% CO₂ при 37°C протягом приблизно 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 10 мкг/мл гентаміцину). Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожного день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор. Перед хроматографією середовище освітлювали, використовуючи фільтр SuporCap-100 (0,8/0,2 мкм) з Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Всі наступні стадії проводили при 4°C. Освітлене середовище наносили на білок А-сефарозу, промивали 5 об'ємами колонки 1×PBS (10 мМ фосфат, рН 7,4, 2,1 мМ KCl і 137 мМ NaCl), елюювали 0,1 М гліцином, рН 2,7, і потім нейтралізували 1/10 об'єму 1 М Трис-HCl, рН 9,0. Потім білок діалізували в PBS.

Зразок білка для трансфекції гібридом мономер-димер піддавали подальшому очищенню, оскільки він містив суміш гомодимеру IFN α -Fc:IFN α -Fc, гібриду мономер-димер IFN α -Fc:Flag-Fc і гомодимеру Flag-Fc:Flag-Fc (або лінкер Δ або лінкер GS15). Матеріал концентрували і наносили на колонку 2,6×60 см (318 мл) Superdex 200 Prep Grade і швидкістю потоку 4 мл/хвилину (36 см/год.) і потім елюювали 3 об'ємами колонки 1×PBS. Фракції, відповідні двом пікам на УФ-детекторі, збирали і аналізували в SDS-ПААГ. Фракції першого піка містили або гомодимер IFN α -Fc:IFN α -Fc, або гібрид мономер-димер IFN α -Fc:Flag-Fc, тоді як другий пік містив гомодимер Flag-Fc:Flag-Fc. Всі фракції, що містять гібрид мономер-димер, але не містять гомодимер Flag-Fc, об'єднували і наносили безпосередньо на колонку 1,6×5 см з анти-FLAG-сефарозою M2 (Sigma Corp., St. Louis, MO) з лінійною швидкістю потоку 60 см/год. Після нанесення колонку промивали 5 об'ємами колонки PBS, потім гібриди мономер-димер елюювали 100 мМ гліцином, рН 3,0. Елюйовані фракції, що містять пік білка, потім нейтралізували додаванням 1/10 об'єму 1 М Трис-HCl і аналізували у відновлювальному і невідновлювальному SDS-ПААГ. Фракції діалізували в PBS, концентрували до 1-5 мг/мл і зберігали при -80°C.

Приклад 16: Експресія і очищення двоспірального білка

Плазмідами pED.dC Epo-CCA-Fc і pED.dC CCB-Fc або окремо, або разом у співвідношенні 1:1 будуть трансфіковані клітини CHO DG44. Клітини будуть трансфіковані, як описано у керівництві, прикладеному до реагенту для трансфекції Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Середовище буде видалене через 48 годин і замінене MEM-альфа без нуклеозидів плюс 5% діалізованої фетальної бичачої сироватки. Очищення буде здійс-

снене афінною хроматографією на колонці з білком А згідно зі способами, відомими в даній галузі. Альтернативно, очищення може бути здійснене з використанням ексклюзійної хроматографії за розміром.

Приклад 17: Експресія і очищення Cys-Fc

Створювали клітини CHO DG-44, які експресують Cys-Fc. Експресуючою плазмідною рED.dC.Cys-Fc, яка містить ген дигідрофолатредуктази (dhfr) миші, трансфікували клітини CHO DG44 (дефіцитні за dhfr), використовуючи реагент Superfect (Qiagen; Valencia, CA) згідно з протоколом виробника з подальшою селекцією стабільних трансфектантів в середовищі для культури тканини α MEM (без нуклеозидів) з додаванням 5% діалізованої FBS і антибіотиків пеніцилін/стрептоміцин (Invitrogen; Carlsbad, CA) протягом 10 днів. Одержаний в результаті пул стабільно трансфікованих клітин збільшували за допомогою 50 нМ метотрексату, щоб підвищити експресію. Приблизно 2×10^6 клітин використали для інокуляції в 300 мл середовища для зростання у флакон, що обертається, об'ємом 1700 см³ (Corning, Corning, NY). Флакони, що обертаються, інкубували в 5% CO₂ при 37°C протягом приблизно 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 10 мкг/мл гентаміцину). Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожний день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор. Перед хроматографією середовище освітлювали, використовуючи фільтр SuporCap-100 (0,8/0,2 мкм) з Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Всі наступні стадії проводили при 4°C. Освітлене середовище наносили на білок А-сефарозу, промивали 5 об'ємами колонки 1×PBS (10 mM фосфат, pH 7,4, 2,7 mM KCl і 137 mM NaCl), елюювали 0,1 M гліцином, pH 2,7, і потім нейтралізували 1/10 об'єму 1 M Трис-HCl, pH 9,0. Потім білок діалізували в PBS і безпосередньо використовували в реакціях кон'югації.

Приклад 18: Зв'язування T20-тіоефірів з Cys-Fc

Cys-Fc (4 мг, кінцева концентрація 3,2 мг/мл) і або T20-тіоефір, або T20-ПЕГ-тіоефір (2 мг, приблизно 5 молярних еквівалентів) інкубували протягом 16 годин при кімнатній температурі в 0,1 M Трис 8/10 mM MESNA. Аналіз в SDS-ПААГ (Трис-

Gly-гель) з використанням відновлювального буфера для зразків показав наявність нової смуги приблизно на 5 кДа довше, ніж Fc-контроль (>40-50% перетворення на кон'югат). Попереднє N-кінцеве секвенування Cys-Fc і Cys-Fc, який не прореагував, показало, що сигнальний пептид неправильно процесований у частині молекул, даючи суміш (Cys)-Fc, який буде взаємодіяти за допомогою нативного лігування з пептид-тіоефірами, і (Val)-(Gly)-(Cys)-Fc, які не будуть взаємодіяти. Оскільки умови реакції недостатні для порушення димеризації молекул Cys-Fc, вказана реакція давала суміш гомодимерів T20-Cys-Fc:T20-Cys-Fc, гібридів мономер-димер T20-Cys-Fc:Fc і Fc-димерів Cys-Fc:Cys-Fc. Даний білок очищали, використовуючи ексклюзійну хроматографію за розміром, як вказано вище, щоб розділити три види. Результат підтверджували аналізом в SDS-ПААГ у невідновлювальних умовах.

Приклад 19: Аналіз протівірусної активності IFN α

Протівірусну активність (IU/мл) злитих білків IFN α визначали, використовуючи аналіз ЦПД (цитопатична дія). Клітини A549 висівали в 96-ямковий планшет для культури тканини в середовище для зростання (RPMI 1640 з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS) і 2 mM L-глутаміну) на 2 години при 37°C, 5% CO₂. Стандарти IFN α і злиті білки IFN α розбавляли в середовищі для зростання і додавали до клітин в трьох повторях на 20 годин при 37°C, 5% CO₂. Після інкубації все середовище видаляли з ямок, розбавляли вірус енцефаломіокардиту (ЕМС) в середовищі для зростання і додавали (3000 БУО/ямку) в кожен ямок за винятком контрольних ямок. Планшети інкубували при 31°C, 5% CO₂ протягом 28 годин. Живі клітини фіксували охолодженою 10% трихлороцтовою кислотою (ТСА) і потім фарбували сульфородаміном В (SRB) згідно з опублікованими протоколами (Rubinstein et al. 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113). Барвник SRB солюбілізували в 10 mM Трис pH 10,5 і зчитували на спектрофотометрі при 490 нм. Зразки аналізували за допомогою порівняння активності з відомою стандартною кривою для міжнародного стандарту IFN α 2b Всесвітньої організації охорони здоров'я в діапазоні від 5 до 0,011 IU/мл. Результати представлені нижче в таблиці 3 і на Фіг. 6, і показують підвищену протівірусну активність гібридів мономер-димер.

Таблиця 3

Аналіз протівірусної активності інтерферону.
Гомодимер у порівнянні з гібридом мономер-димер

Білок	Протівірусна активність (IU/нмоль)	Стандартне відхилення
Гомодимер IFN α Fc-8-амінокислотний лінкер	$0,45 \times 10^5$	$0,29 \times 10^5$
Гібрид мономер-димер IFN α Fc-8-амінокислотний лінкер:FlagFc	$4,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Гомодимер IFN α Fc- Δ -лінкер	$0,22 \times 10^5$	$0,07 \times 10^5$
Гібрид мономер-димер IFN α Fc- Δ дельта лінкер :FlagFc	$2,4 \times 10^5$	$0,0005 \times 10^5$
Гомодимер IFN α Fc-GS15-лінкер	$2,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
Гібрид мономер-димер IFN α Fc-GSIS-лінкер	$5,3 \times 10^5$	$0,15 \times 10^5$

Приклад 20: Аналіз скипаючої активності FVIIa

Набір для аналізу StaClotFVIIa-rTF придбавали з Diagnostics Stago (Parsippany, NJ) і модифікували, як описано в Johannessen et al. 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11.-SI59. Заздалегідь одержували стандартну криву зі стандартом FVIIa Всесвітньої організації охорони здоров'я 89/688. Аналіз використали для порівняння скипаючої активності гібридів мономер-димер у порівнянні з гомодимерами. Результати показали, що гібрид мономер-димер володів скипаючою активністю в чотири рази більш високою у порівнянні з гомодимером (Фіг. 7).

Приклад 21: Пероральне дозування FVIIa-Fc у 10-денних щурів

Щурів Sprague Dawley масою 25 грам на 9 день після народження придбавали з Charles River (Wilmington, MA) і давали можливість акліматизуватись протягом 24 годин. Щурам перорально вводили дози гомодимеру FVIIaFc, гібриду мономер-димер або їх суміші 50:50. Вводили об'єм 200 мкл розчину FVIIaFc для одержання дози 1 мг/кг. Розчин містив буфер Трис-HCl pH 7,4 з 5 мг/мл інгібітору трипсину сої. Щурів піддавали евтаназії з використанням CO₂ в декількох часових точках і брали 200 мкл крові пункцією серця. Плазму одержували додаванням 3,8% розчину цитрату натрію і центрифугуванням при кімнатній температурі зі швидкістю 1268 g. Зразки плазми або досліджували у свіжому вигляді, або заморожували при -20°C. При пероральному дозуванні гібрид мономер-димер приводив до значно більш високих максимальних концентрацій в сироватці (C_{max}) у порівнянні з гомодимерним фактором VII (Фіг. 8).

Приклад 22: Пероральне дозування фактор IX-Fc у неонатальних щурів

Неонатальним щурам Sprague-Dawley десятиденного віку п/о вводили 200 мкл гомодимеру FIX-Fc або гібриду мономер-димер FIX-Fc:FlagFc у відповідних еквімолярних дозах 10 нмоль/кг в 0,1 М буфері на основі фосфату натрію, pH 6,5, що містить 5 мг/мл інгібітору трипсину сої і 0,9% NaCl. Через 1, 2, 4, 8, 24, 48 і 72 години після ін'єкції тварин піддавали евтаназії з використанням CO₂, брали кров пункцією серця і одержували плазму додаванням 3,8% розчину цитрату натрію

і центрифугуванням при кімнатній температурі зі швидкістю 1268 g. Потім зразки осаджували центрифугуванням, збирали сироватку і заморожували при -20°C аж до аналізу злитих білків в ELISA.

Приклад 23: ELISA фактора IX-Fc

96-ямковий планшет для ELISA Immulon 4HBX (Thermo LabSystems, Vantaa, Finland) покривали 100 мкл/ямку козячого IgG проти фактора IX (Affinity Biologicals, Ancaster, Canada) в розведенні 1:100 в 50 мМ карбонатному буфері, pH 9,6. Планшети інкубували при температурі навколишнього середовища протягом 2 годин або протягом ночі при 4°C, герметично закритими полімерною плівкою. Ямки промивали 4 рази PBST по 300 мкл/ямку, використовуючи пристрій для промивання планшетів TECAN. Ямки блокували PBST + 6% БСА, 200 мкл/ямку, та інкубували 90 хвилин при температурі навколишнього середовища. Ямки промивали 4 рази PBST, 300 мкл/ямку, використовуючи пристрій для промивання планшетів TECAN. У ямки додавали стандарти і зразки крові від щурів, описані у прикладі 18 (100 мкл/ямку), та інкубували 90 хвилин при температурі навколишнього середовища. Зразки і стандарти розбавляли в буфері HBET (HBET: 5,95 г HEPES, 1,46 г NaCl, 0,93 г Na₂EDTA, 2,5 г бичачого сироваткового альбуміну, 0,25 мл Твін-20, доведені до 250 мл dH₂O, доведення pH до 7,2). Діапазон стандартної кривої складав від 200 нг/мл до 0,78 нг/мл з 2-кратним розведенням між ними. Ямки промивали 4 рази PBST, 300 мкл/ямку, використовуючи пристрій для промивання планшетів TECAN. У кожен ямку додавали 100 мкл/ямку кон'югованого козячого антитіла анти-IgG-Fc людини-HARP (Pierce, Rockford, IL), розведеного в HBET 1:25000. Планшети інкубували 90 хвилин при температурі навколишнього середовища. Ямки промивали 4 рази PBST, 300 мкл/ямку, використовуючи пристрій для промивання планшетів TECAN. Планшети проявляли, додаючи 100 мкл/ямку субстрату пероксидази тетраметилбензидину (TMB) (Pierce, Rockford, IL), згідно з інструкціями виробника. Планшети інкубували 5 хвилин при температурі навколишнього середовища в темряві або аж до розвитку забарвлення. Реакцію зупиняли, додаючи 100 мкл/ямку 2 М сірчаної кислоти. Оптичну щільність реєстру-

вали при 450 нм на зчитувальному пристрої SpectraMax plusplate (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Аналіз крові, взятої в точці, відповідній 4 годинам, показав більше ніж 10-кратну відмінність у концентрації в сироватці між гібридом мономер-димер фактор IX-Fc і гомодимерами фактор IX-Fc (Fig. 9). Результати показали, що рівні гібриду мономер-димер фактор IX-Fc були істотно вище, ніж гомодимерів фактор IX-Fc (Fig. 10).

Приклад 24: Клонування Epo-Fc

Кодуючу ділянку зрілого Epo одержували ПЛР-ампліфікацією з плазмід, що кодує кодуючу послідовність зрілого еритропоетину, початково одержану в ОТ-ПЛР з мРНК Her G2, і використовуючи праймери heroxba-F і heroeso-R, показані нижче. Праймер heroxba-F містить сайт XbaI, тоді як праймер heroeso-R містить сайт EcoRI. ПЛР здійснювали в термоциклері RapidCycler Idaho Technology, використовуючи полімеразу Vent, денатуруючи при 95°C протягом 15 секунд з подальшими 28 циклами з нахилом 6,0 при 95°C протягом 0 секунд, 55°C протягом 0 секунд і 72°C протягом 1 хвилини 20 секунд з подальшим 3-хвилинним подовженням при 12°C. Продукт довжиною приблизно 514 п.н. очищали в гелі, розщеплювали XbaI і EcoRI, знов очищали в гелі і безпосередньо субклонували в XbaI/EcoRI-розщепленому, очищеному в гелі векторі

pED.dC.XFc, вказаному вище. Дану конструкцію назвали pED.dC.EpoFc.

Послідовність Epo, що містить як ендегенний сигнальний пептид, так і зрілу послідовність, одержували ПЛР-ампліфікацією, використовуючи препарат кДНК QUICK-clone нирки дорослого організму як матрицю і праймери Epo+Pep-Sbf-F і Epo+Pep-Sbf-R, описані нижче. Праймер Epo+Pep-Sbf-F містить сайт SbfI вище стартового кодону, тоді як праймер Epo+Pep-Sbf-R випаляється нижче ендегенного сайту SbfI в послідовності Epo. Реакцію ПЛР проводили в термоциклері PTC-200 MJ, використовуючи полімеразу Expand, денатуруючи при 94°C протягом 2 хвилин з подальшими 32 циклами (при 94°C протягом 30 секунд, при 57°C протягом 30 секунд і при 72°C протягом 45 секунд) з подальшим 10-хвилинним подовженням при 12°C. Продукт довжиною приблизно 603 п.н. виділяли з гелю і субклонували у векторі pGEM-T Easy. Правильну кодуючу послідовність вирізали розщепленням SbfI, очищали в гелі і клонували в PstI-розщеплений, оброблений лужною фосфатазою креветки (SAP), очищений в гелі плазміді pED.dC.EpoFc. Плазміді з вставкою в правильній орієнтації спочатку визначали розщепленням KpnI. Розщеплення XmnI і PvuII вказаної конструкції порівнювали з pED.dC.EpoFc і підтвердили, що вона має правильну орієнтацію. Визначали послідовність і конструкцію назвали pED.dC.natEpoFc. Праймери ПЛР:

heroxba-F (EPO-F): 5'-AATCTAGAGCCCCACCCAGCCTCATCTGTGAC-3'(SEQ ID NO:75)

heroeso-R (EPO-R) 5'-TTGAATTCTCTGTCCCCTGTCCTGCAGGCC-3'(SEQ ID NO:76)

Epo+Pep-Sbf-F: 5'-GTACCTGCAGGCGGAGATGGGGGTGCA-3'(SEQ ID NO:77)

Epo+Pep-Sbf-R: 5'-CCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3'(SEQ ID NO:78)

Приклад 25: Клонування Epo-Fc

В даному описі наведений альтернативний спосіб клонування EPO-Fc. Спочатку конструю-

вали праймери, щоб ампліфікувати кодуючу послідовність Epo повної довжини, включаючи нативну сигнальну послідовність, таким чином:

Epo-F: 5'-GTCCAACCTG CAGGAAGCTTG CCGCCACCAT GGGAGTGCAC GAATGTCCTG CCTGG- 3'(SEQ ID NO:79)

Epo-R: 5'-GCCGAATTCA GTTTTGTGCA CCGCAGCGG CGCCGGCGAA CTCTCTGTCC CCTGTTCTGC AGGCCTCC- 3'(SEQ ID NO:80)

Прямий праймер включає сайт SbfI і HindIII вище послідовності Козака, тоді як обернений праймер видаляє внутрішній сайт SbfI і додає 8-амінокислотний лінкер до 3'-кінця кодуючої послідовності (EFAGAAAV) (SEQ ID NO:81), а також сайти рестрикції SalI і EcoRI. Потім кодуючу послідовність Epo ампліфікували з бібліотеки кДНК нирки (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), використовуючи 25 пмоль вказаних праймерів в 25 мкл реакційної суміші для ПЛР, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним

протоколом виробника в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 58°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), потім 72°C протягом 10 хвилин. Смугу очікуваного розміру (641 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia, CA), і лігували в проміжний клонуючий вектор pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI). ДНК трансформували клітини DH5α (Invitrogen, Carlsbad, CA) і приготували мінікультури вирощували і очищали, використовуючи набір для плазмід Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) згідно

зі стандартними протоколами виробника. Після підтвердження послідовності вказану вставку вищеплювали ферментами рестрикції SbfI/EcoRI, очищали в гелі і клонували в сайтах PstI/EcoRI експресуючого вектора ссавців pED.dC схожим чином.

Fc-F: 5'-GCTGCGGTCTG ACAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CTCCGGAACCT CTGGGCGGA CCGTCAGTC- 3'(SEQ ID NO:82)

Fc-R 5'-ATTGGAATTC TCATTTACCC GGAGACAGGG AGAGGC- 3'(SEQ ID NO:83)

Прямий праймер включає сайт SalI в з'єднанні лінкер-Fc, а також вводить сайти BspEI і RsrII в Fc-ділянку, не впливаючи на кодуючу послідовність, тоді як обернений праймер додає сайт EcoRI після стоп-кодону. Потім кодуючу послідовність Fc ампліфікували з бібліотеки кДНК лейкоцитів (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), використовуючи 25 пмоль вказаних праймерів в 25 мкл реакційної суміші для ПЛР, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 58°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), потім 72°C протягом 10 хвилин. Смугу очікуваного розміру (696 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia, CA), і лігували в проміжний клонуєчий вектор pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI). ДНК трансформували клітини DH5α (Invitrogen, Carlsbad, CA) і приготовані мінікультури вирощували і очищали, використовуючи набір для плазмід Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) згідно зі стандартними протоколами виробника. Після підтвердження послідовності вказану вставку вищеплювали ферментами рестрикції SalI/EcoRI, очищали в гелі і клонували в сайтах SalI/EcoRI плазмиди pED.dC.Epo (вказаної вище) схожим чином, щоб створити експресуючу плазмиду ссавців pED.dC.EpoFc. В іншому експерименті вказану плазмиду також розщеплювали RsrII/XmaI і в ній клонували відповідний фрагмент з pSYN-Fc-002, який містить мутацію Asn 297 Ala (нумерація EU), щоб створити pED.dC.EPO-Fc N297A (pSYN-EPO-004). Експресію в клітинах ссавців здійснювали, як описано в прикладі 26. Амінокислотна послідовність EpoFc з восьмиаминокислотним лінкером подана на Фіг. 2j. Під час здійснення вказаного альтернативного способу клонування хоча і була збережена точна амінокислотна послідовність EpoFc (Фіг. 2j), був зроблений ряд некодуючих змін на рівні нуклеотидів (Фіг. 3j). Вказані зміни являють собою G6A (G в положенні нуклеотиду 6 змінений на A) (виключає можливу повторну структуру в праймері), G567A (видаляє ендегенний сайт SbfI з Epo), A582G (видаляє сайт EcoRI з лінкера), A636T і T639G (додають унікальний сайт BspEI до Fc) і G651C (додає унікальний сайт RsrII до Fc). Нуклеотидна послідовність на Фіг. 3j одержана на основі конструкції, одер-

жаної у прикладі 25, яка включає вказані відмінності від послідовності конструкції з прикладу 24.

Приклад 26: Експресія і очищення гомодимеру EPO-Fc і гібриду мономер-димер

Клітини DG-44 висівали в чашки Петрі для культури тканини діаметром 100 мм і вирощували до злиття в моношар на 50%-60%. Всього 10 мкг ДНК використали для трансфекції клітин на одній чашці діаметром 100 мм: для трансфекції гомодимером 10 мкг pED.dC.EPO-Fc; для трансфекції гібридом мономер-димер 8 мкг pED.dC.EPO-Fc + 2 мкг pсДНК3-FlagFc. Конструкції, що використовуються, клонували, як описано в прикладі 24. Спосіб клонування, описаний у прикладі 25, також можна використати для одержання конструкцій для застосування в даному прикладі. Клітини трансфікували, як описано в керівництві до реагенту для трансфекції Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Альтернативно, pED.dC.EPO-Fc котрансфікували з pSYN-Fc-016, щоб одержати немічений мономер. Середовище видаляли з суміші для трансфекції через 48 годин і замінювали MEM-альфа без нуклеозидів плюс 5% діалізованої фетальної бичачої сироватки в обох випадках трансфекції, тоді як при трансфекції гібридом мономер-димер також додавали 0,2 мкг/мл генетицину (Invitrogen, Carlsbad, CA). Через 3 дні клітини знімали з чашки 0,25% трипсином і переносили у флакони для культури тканини T25 і селекцію продовжували протягом 10-14 днів доти, доки клітини не починали добре рости, оскільки були створені стабільні лінії клітин. Потім експресію білка збільшували за допомогою додавання метотрексату.

У випадку обох клітинних ліній приблизно 2×10^7 клітин використали для інокуляції в 300 мл середовища для зростання у флакон, що обертається, об'ємом 1700 см² (Corning, Corning, NY). Флакони, що обертаються інкубували, в 5% CO₂ при 37°C протягом 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 10 мкг/мл гентаміцину). Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожний день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор. Перед хроматографією середовище освітлювали, використовуючи фільтр SuporCap-100 (0,8/0,2 мкм) Pall Gelman

У випадку обох клітинних ліній приблизно 2×10^7 клітин використали для інокуляції в 300 мл середовища для зростання у флакон, що обертається, об'ємом 1700 см² (Corning, Corning, NY). Флакони, що обертаються інкубували, в 5% CO₂ при 37°C протягом 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну і 10 мкг/мл гентаміцину). Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожний день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор. Перед хроматографією середовище освітлювали, використовуючи фільтр SuporCap-100 (0,8/0,2 мкм) Pall Gelman

Sciences (Ann Arbor, MI). Всі наступні стадії проводили при 4°C. Освітлене середовище наносили на білок А-сефарозу, промивали 5 об'ємами колонки 1×PBS (10 mM фосфат, pH 7,4, 2,7 mM KCl і 137 mM NaCl), елюювали 0,1 M гліцином, pH 2,7, і потім нейтралізували 1/10 об'єму 1 M Трис-HCl, pH 9,0. Потім білок діалізували в PBS.

Зразок білка для трансфекції гібридом мономер-димер піддавали подальшому очищенню, оскільки він містив суміш гомодимеру EPO-Fc:EPO-Fc, гібриду мономер-димер EPO-Fc:Flag-Fc і гомодимеру Flag-Fc:Flag-Fc. Матеріал концентрували і наносили на колонку 2,6×60 см (318 мл) Superdex 200 Prep Grade зі швидкістю потоку 4 мл/хвилину (36 см/год.) і потім елюювали 3 об'ємами колонки 1×PBS. Фракції, відповідні двом пікам на УФ-детекторі, збирали і аналізували в SDS-ПААГ. Фракції першого піка містили або гомодимер EPO-Fc:EPO-Fc, або гібрид мономер-димер EPO-Fc:Flag-Fc, тоді як другий пік містив гомодимер Flag-Fc:Flag-Fc. Всі фракції, що містять гібрид мономер-димер, але не містять гомодимер Flag-Fc, об'єднували і наносили безпосередньо на колонку 1,6×5 см з анти-FLAG-сефарозою M2 (Sigma Corp., St. Louis, MO) з лінійною швидкістю потоку 60 см/год. Після нанесення колонку промивали 5 об'ємами колонки PBS. Потім гібриди мономер-димер елюювали 100 mM гліцином, pH 3,0. Елюювані фракції, що містять пік білка, потім нейтралізували додаванням 1/10 об'єму 1 M Трис-HCl і аналізували у відновлювальному і невідновлювальному SDS-ПААГ. Фракції діалізували в PBS, концентрували до 1-5 мг/мл і зберігали при -80°C.

Альтернативно, фракції першого піка з Superdex 200 аналізували в SDS-ПААГ і об'єднували тільки фракції, що містять більшу частину

гібриду мономер-димер EPO-Fc з невеликою кількістю гомодимеру EPO-Fc. Одержаний пул, збагачений гібридом мономер-димер, потім наносили на колонку Superdex 200, і потім об'єднували фракції, що містять тільки гібрид мономер-димер EPO-Fc, діалізували і зберігали у вигляді очищеного білка. Потрібно зазначити, що вказаний альтернативний спосіб очищення можна використати для того, щоб також очистити немічені гібриди мономер-димер.

Приклад 27: Введення димеру EPO-Fc і гібриду мономер-димер з восьмиаминокислотним лінкером макакам-крабоїдам

Для легеневого введення створювали аерозолі або з димерним білком EPO-Fc, або з гібридним білком мономер-димер EPO-Fc (обидва з 8-аминокислотним лінкером) в PBS, pH 7,4, використовуючи розпилювач Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA) нарівні з респиратором Bird Mark 7A, і вводили анестезованим нативним макакам-крабоїдам через ендотрахеальні трубки (приблизно до нормальних вдихів і видихів). Обидва білки також вводили нативним макакам-крабоїдам за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Зразки брали в різних часових точках і визначали кількість EPO-вмісного білка в одержаній плазмі, використовуючи імуноаналіз EPO людини Quantikine IVD (R and D Systems, Minneapolis, MN). Фармакокінетичні параметри розраховували, використовуючи комп'ютерну програму WinNonLin. У таблиці 4 представлені результати biodisponibility для макак-крабоїдів, оброблених гібридом мономер-димер EPO-Fc або димером EPO-Fc.

Таблиця 4

Введення гібриду мономер-димер EPO-Fc і димеру EPO-Fc мавпам

Білок	№ мавпи	Шлях	Зразкова осаджувана доза ¹ (мкг/кг)	C _{max} (нг/мл)	C _{max} (фмоль/мл)	t _{1/2} (год.)	Середнє t _{1/2} (год.)
Гібрид мономер-димер EPO-Fc	C06181	Легеневий	20	72,3	1014	23,6	25,2
	C06214	Легеневий	20	50,1	703	23,5	
	C07300	Легеневий	20	120	1684	36,2	
	C07332	Легеневий	20	100	1403	17,5	
	C07285	В/в	25	749	10508	21,3	22,6
	C07288	В/в	25	566	7941	23	
	C07343	В/в	25	551	1014	23,5	
Димер EPO-Fc	DD026	Легеневий	15	10,7	120	11,5	22,1
	DD062	Легеневий	15	21,8	244	27,3	
	DD046	Легеневий	15	6,4	72	21,8	
	DD015	Легеневий	15	12,8	143	20,9	
	DD038	Легеневий	35	27	302	29	
	F4921	В/в	150	3701	41454	15,1	14,6
	96Z002	В/в	150	3680	41219	15,3	
	1261CQ	В/в	150	2726	30533	23,6	
	127-107	В/в	150	4230	47379	15,0	
	118-22	В/в	150	4500	50403	8,7	
	126-60	В/в	150	3531	39550	9,8	

¹ на основі 15% осаджуваної частини дози, що розпилюється, яку визначали гамма-сцинтиграфією

Процент біодоступності (F) розраховували для легеневих доз, використовуючи наступне рівняння:

$$F = (AUC_{\text{легенева}} / \text{доза}_{\text{легенева}}) / (AUC_{\text{в/в}} / \text{доза}_{\text{в/в}}) \times 100$$

Таблиця 5

Розрахунок біодоступності у процентах для гібриду мономер-димер ЕроFc у порівнянні з димером після легеневого введення нативним макакам-крабоїдам

Блок	№ мавпи	Зразкова (осаджува-на) доза ¹	AUC (нг·год./мл)	Біодоступність ² (F)	Середня біодос-тупність
Гібрид моно-мер-димер ЕроFc	C06181	20 мг/кг	3810	25,2%	34,9%
	C06214	20 мг/кг	3072	20,3%	
	C07300	20 мг/кг	9525	63,0%	
	C07332	20 мг/кг	4708	31,1%	
Димер ЕроFc	DD026	15 мг/кг	361	5,1%	10,0%
	DD062	15 мг/кг	1392	19,6%	
	DD046	15 мг/кг	267	3,8%	
	DD015	15 мг/кг	647	9,1%	
	DD038	35 мг/кг	2062	12,4%	

¹ на основі 15% осаджуваної частини дози, що розпилюється, яку визначали гамма-сцинтиграфією;

² Середня AUC для гібриду мономер-димер ЕроFc=18,913 нг·год./мл (n=3 мавпи) в/в у дозі 25 мкг/кг.

Середня AUC для димеру ЕроFc=70,967 нг·год./мл (n=6 мавп) в/в у дозі 150 мкг/кг

Фармакокінетика ЕроFc з 8-амінокислотним лінкером, що вводиться макакам-крабоїдам, подана на Фіг. 11. На фігурі наведене порівняння димеру ЕроFc з гібридом мономер-димер ЕроFc у макак після введення однократної легеневої дози. На основі молярного порівняння одержували значно більш високі рівні в сироватці у макак, оброблених гібридом мономер-димер, у порівнянні з димером.

Приклад 28: Підшкірне введення гібриду мономер-димер ЕроFc

Щоб порівняти концентрації в сироватці відомих еритропоєтинових агентів з гібридом мономер-димер ЕроFc, і гібрид мономер-димер ЕроFc і Aranesp® (дарбепоєтин альфа), який не є химерним злитим білком, вводили підшкірно різним

мавпам і вимірювали концентрацію в сироватці обох препаратів з плином часу.

Макакам-крабоїдам (n=3 на групу) підшкірно ін'єктували 0,025 мг/кг гібриду мономер-димер ЕроFc. Зразки крові збирали перед введенням дози і у часових точках аж до 144 годин після введення дози. З крові одержували сироватку і зберігали в замороженому вигляді аж до аналізу ELISA (імуноаналіз Еро людини Quantikine) (R and D Systems, Minneapolis, MN). Фармакокінетичні параметри визначали, використовуючи комп'ютерну програму WinNonLin® (Pharsight, Mountainview, CA).

Результати показали, що концентрації в сироватці як гібриду мономер-димер ЕроFc, так і Aranesp® (дарбепоєтин альфа) були рівні з плином часу, навіть незважаючи на те, що молярна доза, що вводиться, Aranesp® (дарбепоєтину альфа) була трохи вище (таблиця 6) (Фіг. 12).

Таблиця 6

	Шлях	Доза (мг/кг)	Доза (нмоль/кг)	C _{max} (нг/мл)	AUC (нг·год./мл ⁻¹)	(год.)	Біодоступність (F), %
Гібрид мономер-димер ЕроFc	Підшкірний	25	0,3	133±34	10,745±3,144	26±5	57±17
Aranesp®	Підшкірний	20	0,54	83±11	5390±747	22±2	53±8

Приклад 29: Внутрішньовенне введення гібриду мономер-димер ЕроFc

Щоб порівняти концентрації в сироватці відомих еритропоєтинових агентів з гібридом мономер-димер ЕроFc, гібрид мономер-димер ЕроFc, Aranesp® (дарбепоєтин альфа) і Erogen® (епоєтин альфа), жоден з яких не є химерним злитим білком, вводили внутрішньовенно різним мавпам

і вимірювали концентрації в сироватці вказаних агентів з плином часу.

Макакам-крабоїдам (n=3 на групу) внутрішньовенно ін'єктували 0,025 мг/кг гібриду мономер-димер ЕроFc. Зібрали зразки крові перед введенням дози і у часових точках аж до 144 годин після введення дози. З крові одержували сироватку і зберігали в замороженому вигляді аж до

аналізу ELISA (імуноаналіз Еро людини Quantikine) (R and D Systems, Minneapolis, MN). Фармакокінетичні параметри визначали, використовуючи комп'ютерну програму WinNonLin (Pharsight, Mountainview, CA).

Результати показали, що концентрація в сироватці проти часу (AUC) гібриду мономер-димер

ЕроFc була вище, ніж концентрації Ероген® (епоедин альфа) або Аранесп® (дарбепоедин альфа), навіть якщо мавпи одержували великі молярні дози Ероген® (епоедину альфа) і Аранесп® (дарбепоедину альфа) (таблиця 7) (Фіг. 13).

Таблиця 7

	Шлях	Доза (мг/кг)	Доза (нмоль/кг)	(нг/мл)	AUC (нг·год./мл ⁻¹)	t _{1/2} (год.)
Гібрид мономер-димер ЕроFc	Внутрішньовенний	25	0,3	622±110	18,913±3,022	23±1
Аранесп®	Внутрішньовенний	20	0,54	521±8	10,219±298	20±1
Ероген	Внутрішньовенний	20	0,66	514±172	3936±636	6,3±0,6

Приклад 30: Альтернативне очищення гібриду мономер-димер ЕроFc

В даному прикладі описаний ще один альтернативний спосіб очищення ЕРО-Fc. Суміш, що містить Fc, гібрид мономер-димер ЕроFc і димер ЕроFc, наносили на колонку з білок А-сефарозою (Amersham, Uppsala, Sweden). Суміш елюювали згідно з інструкціями виробника. В елюаті з білок А-сефарози, що містить суміш, буфер замінювали на 50 мМ Трис-Cl (pH 8,0). Суміш білків наносили на колонку Mimetic Red 2 XL об'ємом 8 мл (ProMetic Life Sciences, Inc., Wayne, NJ), яка була урівноважена 50 мМ Трис-Cl (pH 8,0). Потім колонку промивали 50 мМ Трис-Cl (pH 8,0); 50 мМ NaCl. Дана стадія видаляла більшу частину Fc.

Гібрид мономер-димер ЕроFc специфічно елюювали з колонки, використовуючи 50 мМ Трис-Cl (pH 8,0); 400 мМ NaCl. Димер ЕроFc може бути елююваний і колонка регенерована 5 об'ємами колонки 1 М NaOH. Елюювані з колонки фракції аналізували в SDS-ПААГ (Фіг. 14).

Приклад 31: Клонування конструкції Igк-сигнальна послідовність-Fc для одержання Fc, що окремо не містить мітки.

Кодуючу послідовність константної ділянки IgG1 (EU № 221-447; Fc-ділянка) одержували ПЛР-ампліфікацією з бібліотеки кДНК лейкоцитів (Clontech, CA), використовуючи наступні праймери:

rcFc-F 5'- GCTGCGGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCTCC

GGAACCTCTGGGCGGACCGTCAGTC -3' (SEQ ID NO: 84)

rcFc-R 5'- ATTGGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC -3' (SEQ ID

NO: 85)

Прямий праймер додає три амінокислоти (AAV) і сайт клонування Sall перед початком Fc-ділянки, а також вводить сайт рестрикції BspEI в положеннях амінокислот 231-233 і сайт рестрикції RsrII в положеннях амінокислот 236-238, використовуючи виродженість генетичного коду, щоб зберегти правильну амінокислотну послідовність (нумерація EU). Обернений праймер додає сайт клонування EcoRI після стоп-кодону для Fc. Реакцію ПЛР в об'ємі 25 мкл здійснювали з 25 пмоль кожного праймера з використанням високоточної системи Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом

виробника в термоциклері MJ, використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 58°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), 72°C 10 хвилин. Смугу очікуваного розміру (~696 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), і клонували в pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI), щоб одержати проміжну плазмиду pSYN-Fc-001 (pGEM T-Easy/Fc).

Сигнальну послідовність Igк миші додавали до кодуючої послідовності Fc, використовуючи наступні праймери:

rc-Igk sig seq-F: 5'-TTTAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCC
TGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGACAAAACCT
CACACATGCCACCG -3' (SEQ ID NO: 86)

Fc-noXma-GS-R: 5'-GGTCAGCTCATCGCGGGATGGG -3' (SEQ ID NO: 87)

Fc-noXma-GS-F: 5'-CCCATCCCGCGATGAGCTGACC -3' (SEQ ID NO: 88)

Праймер rc-Igk-сигнальна послідовність-F додає сайт рестрикції HindIII до 5'-кінця молекули з подальшою послідовністю Козака (GCCGCCACC) (SEQ ID NO:89), за якою слідує сигнальна послідовність легкого ланцюга Igk миші, що безпосередньо примикає на початок послідовності Fc (EU № 221). Праймери Fc-noXma-GS-F і -R видаляють внутрішній сайт XmaI з кодуєчої послідовності Fc, використовуючи вироженість генетичного коду, щоб зберегти правильну амінокислотну послідовність. Проводили дві реакції ПЛР об'ємом 25 мкл з 25 пмоль або rc-Igk-сигнальна послідовність-F і Fc-noXma-GS-R, або Fc-noXma-GS-F і rcFc-R, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері MJ. Першу реакцію здійснювали з 500 нг бібліотеки кДНК лейкоцитів (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) як матрицею, використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 30 циклів (94°C 30 секунд, 55°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), 72°C 10 хвилин. Другу реакцію здійснювали з 500 нг pSYN-Fc-001 як матрицею (вище), використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 16 циклів (94°C 30 секунд, 58°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), 72°C 10 хвилин. Смуги

очікуваного розміру (~495 і 299 п.н., відповідно) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), потім об'єднували в реакційній суміші для ПЛР з 25 пмоль праймерів rc-Igk-сигнальна послідовність-F і rcFc-R і реакцію здійснювали, як описано вище, випаляючи при 58°C і продовжуючи протягом 16 циклів. Смугу очікуваного розміру (~772 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), і клонували в pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI), щоб одержати проміжну плазмиду pSYN-Fc-007 (pGEM T-Easy/Igk sig seq-Fc). Потім повну касету Igk-сигнальна послідовність-Fc субклонували, використовуючи сайти HindIII і EcoRI, в експресуючий вектор ссавців або pEE6.4 (Lonza, Slough, UK), або в pcДНК3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), в залежності від системи, що використовується, щоб створити pSYN-Fc-009 (pEE6.4/Igk sig seq-Fc) і pSYN-Fc-015 (pcДНК3/Igk sig seq-Fc).

Приклад 32: Клонування конструкції Igk-сигнальна послідовність-Fc N297A для одержання Fc N297A, який не містить мітки окремо

Щоб мутувати Asp 297 (нумерація EU) в Fc до залишку Ala використали наступні праймери:

N297A-F 5'-GAGCAGTACGCTAGCACGTACCG -3' (SEQ ID NO: 90)

N297A-R 5'-GGTACGTGCTAGCGTACTGCTCC -3' (SEQ ID NO: 91)

Здійснювали дві реакції ПЛР з 25 пмоль або rc-Igk-сигнальна послідовність-F і N297A-R, або N297A-F і rcFc-R, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері MJ. Обидві реакції здійснювали, використовуючи 500 нг pSYN-Fc-007 як матрицю і використовуючи наступні цикли: 94°C 2 хвилини; 16 циклів (94°C 30 секунд, 48°C 30 секунд, 72°C 45 секунд), 72°C 10 хвилин. Смуги очікуваного розміру (~319 і 475 п.н., відповідно) очищали з гелю. Використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), потім об'єднували в реакційній суміші для ПЛР з 25 пмоль праймерів rc-Igk-сигнальна послідовність-F і rcFc-R і реакцію здійснювали, як описано вище, випаляючи при 58°C і продовжуючи протягом 16 циклів. Смугу очікуваного розміру (~772 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), і клонували в pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI), щоб одержати

проміжну плазмиду pSYN-Fc-008 (pGEM T-Easy/Igk sig seq-Fc N297A). Потім повну касету Igk-сигнальна послідовність-Fc окремо субклонували, використовуючи сайти HindIII і EcoRI, в експресуючому векторі ссавців або pEE6.4 (Lonza, Slough, UK), або в pcДНК3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), в залежності від системи, що використовується, щоб створити pSYN-Fc-010 (pEE6.4/Igk sig seq-Fc N297A) і pSYN-Fc-016 (pcДНК3/Igk sig seq-Fc N297A).

Ті ж самі вказані N297A-праймери також використовували з праймерами rcFc-F і rcFc-R. і pSYN-Fc-001 як матрицею в реакції ПЛР з подальшим субклонуванням, як указано вище, щоб створити pSYN-Fc-002 (pGEM T Easy/Fc N297A).

Приклад 33: Клонування EpoFc і Fc в одній плазміді для створення двоєнних векторів для одержання гібридів мономер-димер EpoFc дикого типу або N297A і експресія.

Альтернативною трансфекції конструкціями EpoFc і Fc на окремих плазмідах є їх клонування

в одній плазміді, також названій двогенним вектором, таким як використовується в системі Lonza Biologies (Slough, UK). Фрагмент RsrII/EcoRI з pSYN-Fc-002 субклонували у відповідних сайтах в pEE12.4 (Lonza Biologies, Slough,

UK) згідно зі стандартними способами, щоб створити pSYN-Fc-006 (pEE12.4/Fc N297A-фрагмент). Плазмиду pSYN-EPO-004 використали як матрицю для реакції ПЛР, використовуючи праймер Epo-F з прикладу 25 і наступний праймер:

EpoRsr-R: 5'- CTGACGGTCCGCCCAGGAGTTCCG

GAGCTGGGCACGGTGGGCATG TGTGAGTTTTGTGACCGCAGCGG -3' (SEQ

ID NO: 91)

Реакцію ПЛР здійснювали, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері MJ, як указано вище, протягом 16 циклів з температурою відпалу 55°C. Смугу очікуваного розміру (-689 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA) і клонували в pSYN-Fc-006, використовуючи сайти рестрикції HindIII/RsrII, щоб створити pSYN-EPO-005 (pEE12.4/EpoFc N297A). Потім конструювали двогенний вектор для гібриду мономер-димер EpoFc N297A клонуванням NotI/BamHI-фрагмента з pSYN-Fc-010 у відповідних сайтах в pSYN-EPO-005, щоб створити pSYN-EPO-008 (pEE12.4-6.4/EpoFc N297A/Fc N297A).

Також одержували конструкцію дикого типу субклонуванням послідовності Fc дикого типу з pSYN-Fc-001 в pSYN-EPO-005, використовуючи сайти RsrII і EcoRI, щоб створити pSYN-EPO-006 (pEE12.4/EpoFc). Потім конструювали двогенний

вектор для гібриду мономер-димер EpoFc клонуванням NotI/BamHI-фрагмента з pSYN-Fc-009 у відповідних сайтах в pSYN-EPO-006, щоб створити pSYN-EPO-007 (pEE12.4-6.4/EpoFc/Fc).

Кожною плазмідною трансфікували клітини CHO K1SV та ідентифікували позитивні клони і адаптували до безсироваткової суспензії, як указано в Lonza Biologies Manual for Standard Operating procedures (Lonza Biologies, Slough, UK), і очищали, як указано для інших конструкцій мономер-димер.

Приклад 34: Клонування конструкцій IFN β Fc людини, IFN β -Fc N297A з восьмиаминокислотними лінкерами і Igk-Fc-6His

10 нг бібліотеки геномної ДНК людини з Clontech (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) використали як матрицю для того, щоб виділити IFN β людини з його нативною сигнальною послідовністю, використовуючи наступні праймери:

IFN β -F H3/SbfI:

**5'- CTAGCCTGCAGGAAGCTTGCCGCCACCATGACCA
ACAAGTGTCTCCTC -3' (SEQ ID NO: 92)**

IFN β -R (EFAG) SalI:

**5'TTTGTGACCGCAGCGGCGCGCGGAAGCTGTTTCGG
AGGTAACCTGTAAG -3' (SEQ ID NO: 93)**

Також використали обернений праймер, щоб створити восьмиаминокислотну лінкерну послідовність (EFAGAAAV) (SEQ ID NO:94) на 3'-кінці послідовності IFN β людини. Реакцію ПЛР здійснювали з використанням високоточної системи Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері Rapid Cycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Продукт ПЛР правильного розміру (~607 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen; Valencia, CA), клонували в TA-клонуючому векторі (Promega, Madison, WI) і секвенували. Дана конструкція названа pSYN-IFN β -002. pSYN-IFN β -002 розщеплювали SbfI і SalI і клонували в rSP72 (Promega) в сайти PstI і SalI, одержуючи pSYN-IFN β -005.

Очищену pSYN-Fc-001 (0,6 мкг) розщеплювали SalI і EcoRI і клонували у відповідних сайтах pSYN-IFN β -005, щоб створити плазмиду pSYN-IFN β -006, яка містить IFN β людини, зв'язаний з Fc людини через восьмиаминокислотну лінкерну по-

слідовність. Потім pSYN-IFN β -006 розщеплювали SbfI і EcoRI і повнорозмірну послідовність IFN β -Fc клонували в сайтах PstI і EcoRI pEDdC.sig, щоб створити плазмиду pSYN-IFN β -008.

pSYN-Fc-002, що містить ДНК Fc людини з однією амінокислотою заміною аспарагіну на аланін в положенні 297 (N297A; нумерація EU), розщеплювали BspEI і XmaI, щоб виділити фрагмент ДНК довжиною ~365 п.н., що містить мутацію N297A. Одержаний фрагмент ДНК клонували у відповідних сайтах в pSYN-IFN β -008, щоб створити плазмиду pSYN-IFN β -009, яка містить послідовність IFN β -Fc з восьмиаминокислотним лінкером і мутацію N297A в Fc в експресуючому векторі pED.dC.

Клонування Igk-сигнальна послідовність-Fc N297A-6His. Використали наступні праймери, щоб додати мітку 6xHis до C-кінця кодуючої послідовності Fc N297A:

Fc GS-F: 5'- GGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACTCC -3' (SEQ ID

NO: 95)

Fc.6His-R: 5'- TCAGTGGTGATGGTGATGATGTTTACCCGGAGACAGGGAG -3'

(SEQ ID NO: 96)

Fc.6His-F: 5'- GGTAACATCATCACCATCACCCTGAGAATTCC

AATATCACTAGTGAATTCG -3' (SEQ ID NO: 97)

Sp6+T-R: 5'- GCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC -3' (SEQ ID NO: 98)

Проводили дві реакції ПЛР з 50 пмоль або Fc GS-F і Fc.6His-R, або Fc.6His-F і Sp6+T-R, використовуючи високоточну систему Expand (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) згідно зі стандартним протоколом виробника в термоциклері MJ. Обидві реакції здійснювали з використанням 500 нг pSYN-Fc-008 як матриці в 50 мкл реакційної суміші, використовуючи стандартні умови циклів. Смуги очікуваного розміру (~780 і 138 п.н., відповідно) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA), потім об'єднували в 50 мкл реакційної суміші для ПЛР з 50 пмоль праймерів Fc GS-F і Sp6+T-R і реакцію здійснювали, як описано раніше, використовуючи стандартні умови циклів. Смугу очікуваного розміру (-891 п.н.) очищали з гелю, використовуючи набір для екстракції з гелю (Qiagen, Valencia CA) і клонували в pсДНК6 V5-His B, використовуючи сайти HindIII і EcoRI, щоб створити pSYN-Fc-014 (pсДНК6/Igк sig seq-Fc N297A-6 His).

Приклад 35: Експресія і очищення IFN β Fc, гомодимеру IFN β -Fc N297A і гібриду мономер-димер IFN β -Fc N297A

Клітини CHO DG-44 висівали в чашки Петрі для культури тканини діаметром 100 мм і вирощували до злиття в моношар на 50%-60%. Всього 10 мкг ДНК використовували для трансфекції клітин на одній чашці діаметром 100 мм. Для трансфекції гомодимером використовували 10 мкг конструкції pSYN-IFN β -008 або pSYN-IFN β -009; для трансфекції гібридом мономер-димер використовували 8 мкг конструкції pSYN-IFN β -009 + 2 мкг pSYN-Fc-014. Клітини трансфікували, використовуючи реагенти для трансфекції Superfect (Qiagen, Valencia, CA) згідно з інструкціями виробника. Через 48-72 години після трансфекції середовище для зростання видаляли і клітини знімали з чашок 0,25% трипсином і переносили у флакони для культури тканини T75 в середовище для селекції (MEM-альфа без нуклеозидів плюс 5% діалізованої фетальної бичачої сироватки). У середовище для селекції у випадку трансфекції гібридом мономер-димер додавали 5 мкг/мл бластицидину (Invitrogen, Carlsbad, CA). Селекцію продовжували протягом 10-14 днів доти, доки клітини не починали добре рости, оскільки були створені стабільні лінії клітин. Потім експресію білка збільшували за допомогою додавання метотрексату: в діапазоні від 10 до 50 нМ.

У випадку всіх клітинних ліній приблизно 2×10^7 клітин використали для інокуляції в 300 мл

середовища для зростання у флакон, що обертається, об'ємом 1700 см² (Corning, Corning, NY). Флакони, що обертаються, інкубували в інкубаторі з 5% CO₂ при 37°C протягом 72 годин. Потім середовище для зростання замінювали 300 мл безсироваткового середовища для продукування (DMEM/F12 з 5 мкг/мл бичачого інсуліну). Середовище для продукування (кондиціоноване середовище) збирали кожний день протягом 10 днів і зберігали при 4°C. Після кожного збирання у флакони, що обертаються, додавали свіже середовище для продукування і флакони повертали в інкубатор. Перед хроматографією середовище освітлювали, використовуючи фільтр SuporCar-100 (0,8/0,2 мкм) з Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI). Всі наступні стадії проводили при 4°C. Освітлене середовище наносили на білок А-сефарозу, промивали 5 об'ємами колонки 1xPBS (10 мМ фосфат, рН 7,4, 2,7 мМ KCl і 137 мМ NaCl), елюювали 0,1 М гліцином, рН 2,7, і потім нейтралізували 1/10 об'єму 1 М Трис-HCl, рН 8,0, 5 М NaCl. Гомодимери додатково очищали при пропусканні через колонку Superdex 200 Prep Grade, що розділяє за розміром, і елюювали в 50 мМ фосфаті натрію рН 7,5, 500 мМ NaCl, 10% гліцерині.

Гібридний білок мономер-димер піддавали додатковому очищенню, оскільки містив суміш гомодимеру IFN β Fc N297A:IFN β Fc N297A, гібриду мономер-димер IFN β Fc N297A:Fc N297A-His і гомодимеру Fc N297A-His:Fc N297A-His. Матеріал наносили на нікель-хелатуючу колонку в 50 мМ фосфаті натрію рН 7,5, 500 мМ NaCl. Після нанесення колонку промивали 50 мМ імідазолом в 50 мМ фосфаті натрію рН 7,5, 500 мМ NaCl і білок елюювали градієнтом 50-500 мМ імідазолу в 50 мМ фосфаті натрію рН 7,5, 500 мМ NaCl. Фракції, відповідні пікам елювання на УФ-детекторі, збирали і аналізували в SDS-ПААГ. Фракції першого піка містили гібрид мономер-димер IFN β Fc N297A:Fc N297A-His, тоді як другий пік містив гомодимер Fc N297A-His:Fc N297A-His. Всі фракції, що містять гібрид мономер-димер, але не містять гомодимер Fc, об'єднували і наносили безпосередньо на колонку Superdex 200 Prep Grade, що розділяє за розміром, пропускали і елюювали в 50 мМ фосфаті натрію рН 7,5, 500 мМ NaCl, 10% гліцерині. Фракції, що містять гібриди мономер-димер IFN β -Fc N297A:Fc N297A-His, об'єднували і зберігали при -80°C.

Приклад 36: Аналіз противірусної активності IFN β

Противірусну активність (IU/мл) злитих білків IFN β визначали, використовуючи аналіз ЦПД (цитопатична дія). Клітини A549 висівали в 96-ямковий планшет для культури тканини в середовище для зростання (RPMI 1640 з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS) і 2 мМ L-глутаміну) на 2 години при 31°C, 5% CO₂. Стандарти IFN β і злиті білки IFN β розбавляли в середовищі для зростання і додавали до клітин в трьох повторах на 20 годин при 31°C, 5% CO₂. Після інкубації все середовище видаляли з ямок, розбавляли вірус енцефаломіокардиту (ЕМС) в середовищі для зростання і додавали (3000 БУО/ямку) в кожен ямок за винятком контрольних

ямок. Планшети інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 28 годин. Живі клітини фіксували охолодженням 10% трихлороцтовою кислотою (ТСА) і потім фарбували сульфородаміном В (SRB) згідно з опублікованими протоколами (Rubinstein et al. 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113). Барвник SRB солюбілізували в 10 мМ Трис рН 10,5 і зчитували на спектрофотометрі при 490 нм. Зразки аналізували за допомогою порівняння активності з відомою стандартною кривою в діапазоні від 10 до 0,199 IU/мл. Результати представлені нижче в таблиці 8 і показують підвищену противірусну активність гібридів мономер-димер.

Таблиця 8

Аналіз противірусної активності інтерферону бета.
Гомодимер у порівнянні з гібридом мономер-димер

Білок	Противірусная активність (IU/моль)	Стандартне відхилення
Гомодимер IFN β Fc-8-амнокислотний лінкер	4,5 \times 10 ⁵	0,72 \times 10 ⁵
Гомодимер IFN β Fc N297A-8-амнокислотний лінкер	3,21 \times 10 ⁵	0,48 \times 10 ⁵
Гібрид мономер-димер IFN β Fc N297A-8-амнокислотний лінкер: Fc-His	12,2 \times 10 ⁵	2 \times 10 ⁵

Приклад 37: Введення гомодимеру і гібриду мономер-димер IFN β Fc з восьмиаминокислотним лінкером макакам-крабобідам

Для легеневого введення створювали аерозолі або з гомодимерним білком IFN β Fc, або з гібридним білком мономер-димер IFN β Fc N297A (обидва з 8-амінокислотним лінкером) в PBS, рН 7,4, 0,25% HSA, використовуючи розпилювач Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA) нарізні з респиратором Bird Mark 7A, і вводили анестезованим нативним макакам-крабобідам через ендотрахеальні трубки (приблизно до нормаль-

них вдихів і видихів). Зразки крові брали в різних часових точках і визначали кількість IFN β -вмісного білка в одержаній сироватці, використовуючи імуноаналіз IFN β людини (Biosource International, Camarillo, CA). Фармакокінетичні параметри розраховували, використовуючи комп'ютерну програму WinNonLin. В таблиці 9 представлені результати для макакам-крабобідів, оброблених гібридом мономер-димер IFN β Fc N297A або гомодимером IFN β Fc.

Таблиця 9

Введення гібриду мономер-димер IFN β Fc і гомодимеру IFN β Fc мавпам

Білок	№ мавпи	Шлях	Зразкова осаджувана доза ¹ (мкг/кг)	C _{max} (нг/мл)	AUC (год·нг/мл)	t _{1/2} (год.)	Середнє t _{1/2} (год.)
Гібрид мономер-димер IFN β Fc N297A	C07308	Легеневий	20	23,3	987,9	27,6	27,1
	C07336	Легеневий	20	22,4	970,6	25,6	
	C07312	Легеневий	20	21,2	1002,7	28,0	
Гомодимер IFN β Fc	C07326	Легеневий	20	2,6	94,6	11,1	114
	C07338	Легеневий	20	5,0	150,6	11,7	

¹ на основі 15% осаджуваної частини дози, що розпилюється, яку визначали гамма-сцинтиграфією

Фармакокінетика IFN β Fc з 8-амінокислотним лінкером, що вводиться макакам-крабобідам, подана на Фіг. 15. На фігурі наведене порівняння гомодимеру IFN β Fc з гібридом мономер-димер IFN β Fc N297A у макак після введення однократної легеневої дози. Одержували значно більш високі рівні в сироватці у макак, оброблених гібридом мономер-димер, у порівнянні з гомодимером.

Зразки сироватки також аналізували відносно рівнів неоптерину (біомаркера активності IFN β), використовуючи імуноаналіз неоптерину (MP Biomedicals, Orangeburg, NY). Результати даного аналізу показані на Фіг. 16. На фігурі наведене порівняння стимуляції неоптерину у відповідь на гомодимер IFN β -Fc і гібрид мономер-димер IFN β -Fc N297A. Можна бачити, що виявляли значно більш високі рівні неоптерину у мавп, оброблених

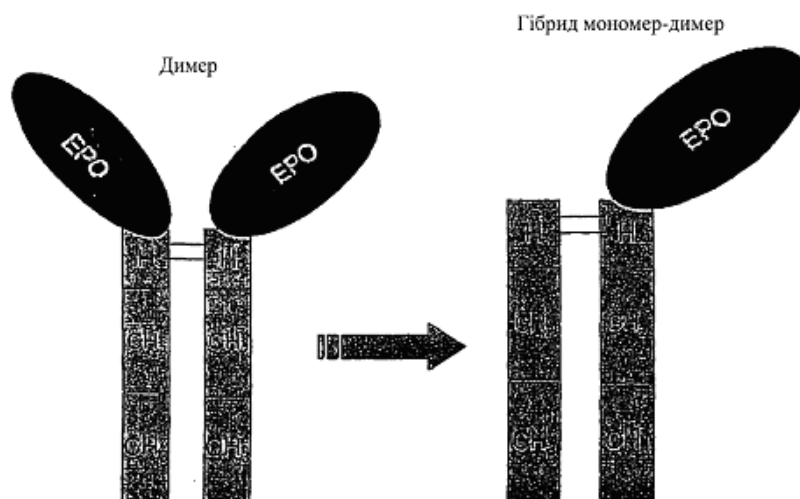
гібридом мономер-димер IFN β -Fc N297A, у порівнянні з гомодимером IFN β -Fc.

Всі числа, що виражають кількості інгредієнтів, умови реакції і т.д., що використовуються в описі і формулі винаходу потрібно розуміти як модифіковані у всіх випадках терміном «приблизно». Відповідно, якщо не обумовлене інше, числові параметри, вказані в описі і прикладній формулі винаходу, є приблизними, так що вони можуть варіювати в залежності від необхідних властивостей, які намагаються одержати за допомогою даного винаходу. Як мінімум, і не як спроба обмежити заявлений принцип еквівалентів в об'ємі формули винаходу, кожний числовий параметр потрібно розглядати в світлі ряду значущих цифр і звичайних способів округлення.

Всі посилання, цитовані в даному описі, включені в даний опис у вигляді посилання в повному об'ємі і фактично в такій же мірі, як у випадку, коли кожна окрема публікація або патент або

заявка на видачу патенту спеціально і окремо вказані як включені у вигляді посилання фактично в повному об'ємі. Що стосується міри, в якій публікації і патенти або заявки на видачу патентів, включені у вигляді посилання, суперечать розкриттю, наведеному в описі, опис призначений для того, щоб замінити собою і/або мати переважне право перед будь-яким таким матеріалом, що суперечить.

Як буде зрозуміло фахівцям в даній галузі, можуть бути здійснені багато які модифікації і зміни даного винаходу, не відходячи від суті і не виходячи за рамки його об'єму. Конкретні варіанти, наведені в даному описі, пропонуються тільки як приклад і жодним чином не призначені для обмеження. Мається на увазі, що опис і приклади повинні вважатись тільки зразковими, при цьому даний об'єм і суть винаходу вказані у формулі винаходу, яка слідує далі.



Фиг. 1

Амінокислотна послідовність фактор VII-Fc (сигнальний пептид підкреслений, пропептид вказаний жирним шрифтом)

```

1  MVSQALRLLC LLLGLOGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS
51  LERECKEEQC SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK
101 DQLQSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGCEBQYC SDHTGTXRSC
151 RCHEGYSLLA DGVSCPTVE YPCGKIPILE XRNASKPQGR IVGGKVCPKG
201 ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWWVSAA HCFDKIKNWR NLIIVLGEHD
251 LSEHDGDEQS RRAVQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPLC
301 LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLD RGA TALELMVLNV PRIMTQDCIQ
351 QSRKVGDSFN ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGTV
401 SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFFDKTHTC
451 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMI SRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYCKVSNK
551 ALPAPIEKT I SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD
601 IAVEWESNGQ .PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQCGNVFSCS
651 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

Фиг. 2A

Амінокислотна послідовність фактор 1X-Fc (сигнальний пептид підкреслений, пропептид вказаний жирним шрифтом)

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
51  KLEEFVQGNL ERECMEEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
101 PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCCL DVTCNIKNGR CEQFCCKNSAD
151 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPPFCGR VSVSQTSLT RAETVFPDND
201 YVNSTEAEIT LDNITQSTQS FNDFTTRVVG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
251 FCGGSIVNEK WIVTAACVE TGVKITVAVG EHNIETEHT EQKRNVRIRI
301 PHHYNAAIN KYNHDIALL LDEPLVLNSY VTFCIADKE YTNIFLKFGS
351 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
401 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGG YGIYTKVSRV
451 VNWIKEKTKL TEFAGAAVD KTHTCPCPA PELLGGPSVF LFPKPKDITL
501 MSRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
551 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
601 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSTIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD
651 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

Фіг. 2B

Амінокислотна послідовність IFN α -Fc (8-амінокислотний лінкер) (сигнальна послідовність підкреслена)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLM LAQMRRISLF
51  SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNL STKSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEEF AGAAAVDKTH
201 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
251 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
301 NKALPAPIEK TISKAKQQR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFPY
351 SDIAVEWESN GQFENNYKTT PPVLDSDGSG FLYSLTVDK SRWQQGNVFS
401 CSVMHEALHN HYTOKSLSL PGK

```

Фіг. 2C

Амінокислотна послідовність IPN α -Fc- Δ -лінкер (сигнальна послідовність підкреслена)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLM LAQMRRISLF
51  SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNL STKSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEDK THTCPPCPAP
201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNAKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKGFP YPSDIAVEWE
351 SNGQPENNYK TTTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEHAL
401 HNHYTQKSL LSPGK

```

Фіг. 2D

Амінокислотна послідовність FlagFc (сигнальна послідовність підкреслена)

```

1  METDTLLLVV LLLWVPGSTG DDYKDDDDKD KTHTCPCPA PELLGGPSVF
51  LFPKPKDITL MSRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
101 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
151 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSTIAVEW ESNGQPENNY
201 KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL
251 SLSPGK

```

Фіг. 2E

Амінокислотна послідовність Еро-ССА-Fc (сигнальна
послідовність K^b підкреслена, подвійна спіраль вказана
жирним шрифтом)

```

1  MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AGSRAPPRLI CDSRVLQRYL LEAKEAENIT
51  TGCAEHCSLN ENITVPDTKV NFYAWKRMEV GQQAQEVWQG LALLSEAVLR
101 GQALLVNSSQ RWEPLQLHVD KAVSGLRSIT TLLRALGAQK EAI SPPDAAS
151 AAPLRTITAD TFRKLFVYS NFLRGKLY TGEACRTGDR EFGGEYQALE
201 KEVAQLEAEN QALEKEVAQL EHEGGGPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
251 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
301 SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
351 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TFPVLDSGDS
401 FFLYSKLTVD KSRWQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

```

Фіг. 2F

Амінокислотна послідовність ССВ-Fc (сигнальна
послідовність K^b підкреслена, подвійна спіраль вказана
жирним шрифтом)

```

1  MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AGEFGGEYQA LKKKVAQLKA KNQALKKKVA
51  QLKHKGGGPA PELLGGPSVF LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP
101 EVKFNWYVDG VEVHNACTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
151 KVSNNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
201 FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTFPVLDSG DSFFLYSKLT VDKSRWQGN
251 VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

Фіг. 2G

Амінокислотна послідовність CysFc (сигнальна послідовність
hIFN α підкреслена)

```

1  MALTFFALLVA LLVLSCKSSC SVGCPPCFAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM
51  ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNACTKPR EEQYNSTYRV
101 VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
151 PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTFPVLDSG
201 SFFLYSKLTV DKSRWQGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSL LSPGK

```

Фіг. 2H

Послідовність білка IFN α GS15 Fc (сигнальна послідовність
підкреслена)

```

1  MALTFFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLM LLAQMRRLSLF
51  SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIPNLF STKDSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVR AEI MRSFSLSTNL QESLSKEGG GSGGGGGSGG
201 GGSDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
251 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDWNLGK
301 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCL
351 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW
401 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

Фіг. 2I

Амінокислотна послідовність ЕроFc (сигнальна послідовність підкреслена, лінкер вказаний жирним шрифтом)

```

1  MGVHECPAWL WLLSLLSLP LGLFVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE
51  NITTGCAEHC SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAQEV WQGLALLSEA
101 VLRGQALLVN ESQPWEPLQL HVDKAVSGLR SLTTLRALG AQKEAISPFD
151 AASAPLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDREFAGAAA
201 VDKTHTCPFC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
251 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
301 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREQVY TLPPSRDEL T KNQVSLTCLV
351 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVL SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
401 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

Фіг. 2J

Нуклеотидна послідовність фактор VII-Fc (сигнальний пептид підкреслений, пропептид вказаний жирним шрифтом)

```

atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagcatcaccagccctcatcaccatctgccttttaggat
atctactcagtgctgcatgtacagttttcttgatcatgaaacgcccaacaaattctgcatcg
gccaaagggtatatttcagggttaattggaaggtttgttcaagggaaccttgagagagatgt
atggaagaaagtgatgttttgaggaagcagcagaggtttttgaaacactgaaagaaacactg
aattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgttttaaatggcggcag
ttgcaaggatgacattaatccctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaagaaagaaactgt
gaattagatgtaacatgtaacattaaagatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctg
atacaagggtgtttgtcctgtactgagggatcagacttgcaagaaacacagaagtcctgtga
accagcagtgccatttccatgtggaaggtttctgtttcacaaacttctaagctcacccgtgct
gagactgttttccctgatgtggactatgtaattctactgaagctgaaccattttggataaca
tcactcaagaccccaatcatttaattgacttccctcgggttggttggtggagagatgccaaacc
aggtcaattcccttgccaggttggtttgaaatggttaagttgatgcattctgtggaggctctatc
gttaattgaaaaatggattgtaactgctgccactgtgttgaaactgggtgttaaaattacagttg
tcgcagggtgaacataaatatgaggagacagacataacagcgaagcgaatgtgattcgaat
tattcctcacccaaactacaatgcagctattaataagtaacacatgacattgcccttctggaa
ctggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcatgtgacaaaggaataca
cgaacatcttccctcaatttggtatctggctatgtaagtggctggggaagagctctccacaaggg
gagatcagcttttagttcttcagtaaccttagagttccacttggtgaccgagccacatgtcttcca
tctacaaggttcacccatctatacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt
catgtcaaggagatagtggggggaccccatgttactgaagtggaagggaagaccagtttcttaactgg
aattattagctggggtgaaggatgtgcaatgaaggcaaatatggaaatatataccaaggtatcc
cggtatgtcaactggattaaaggaacaaacaaagctcactgaattcgccgggcgccgtgagggtcg
acaaactcacacatgcccaacgtgccagccctgaactcctgggggggacccgtcagctcttccct
cttcccccaaaaaccccaaggacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgcgtaggg
gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaaggtgc
ataatgccagacaaagccgcgggaggagcagtaacacagcagctaccgtgtggtcagcgtcct
caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagtgaagggtctccaacaaagcc
ctccagcccccctcgagaaacacatctccaaaggccaaaggggcagcccgagaaacacaggtgt
acacccctgcccccatccggggtgagctgaccaagaaacaggtcagcctgacctgctgtgcaa
aggcttctatccagcgcacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggagccgggagaaacacac
aagacacagcctcccggtgtggaactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcacccgtgg
acaaagcagggtggcagcagggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagaggctctgcacaa
ccactacacgcagagagcctctccctgtctccgggtaaatga

```

Фіг. 3A

Нуклеотидна послідовність фактор IX-Fc (сигнальний пептид
підкреслений, пропептид вказаний жирним шрифтом)

atgcagccgcctgaacatgatcatggcagaatcaccaggccctcatcaccatctgccttttagaat
atctactcagtgctgaatgtacagttttctctgatcatgaaacgcccaacaaattctgaatcg
gccaaaggaggtataattcagggttaattggaagggtttgttcaagggaaccttgagagagaatgt
atggaaagaaagtgtatgttttgaaagacacgagaagttttgaaacactgaaagaaacactg
aattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgttttaattggcggcag
ttgcaaggatgacattaatctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaaggaaagaaactgt
gaattagatgtaacatgtaacattaaagaatggcagatgcgagcagtttgtasaaatagtgtctg
atacaagggtggtttgctcctgtactgagggatatacgacttgacagaaacccagaagtctgtga
accagcagtgccatttccatgtggagaggtttctgtttcacaaactcttaagctcaccctgtct
gagactgttttctgatgtggactatgtaatttctactgaagctgaaacattttggataaca
tcactcaaaagcaccatcttaattgaacttcactcgggtgtttggaggagagatgccaacc
aggatcaattcccttggcagggtgttttgaaatggtaaagtgtatgcattctgtggaggctctatc
gttaattgaaaaatggattgtaactgctgccactgtgttgaaactgggtgttaaatatacagttg
tcgcaggtgaacataaatttgaggagacagacataacagagcaaaagcgaatgtgattcgaaat
tattcctcaccacaactacaatgcagctattataagtagacaacatgacattgccccttctggaa
ctggacgaaccccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcatgtgtgacaagggaataca
cgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaaagggtcttccacaagg
gagatcagcttttagttcttcagtaaccttagagtccacttgttgaccgagccacatgtctcga
tctacaagggtcaccatctataacaacatgttctgtgctggctccatgaaggagggtagagatt
catgtcaaggagatagtggggggaccccatgttactgaaagtggaaagggaacaggtttcttaactgg
aattattagctggggtgaagagtggtgcaatgaaaggcaaatatgggaatatataccaagggtatcc
cggtatgtcaactggattaaaggaaaaacaaagctcactgaattcgccggcgccgctgcggtcg
acaaactcacacatgccacccgtgcccgacccctgaactectgggggggacccgtcagctcttctc
cttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccgggacccctgagggtcacatgcgtggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggagcggtgagggtgc
ataatgccaaagacaaagccgcccggaggagtagtaaacacagcagcgtacgtgtggtcagcgtcct
caccgtcctgacacaggaactggctgaatggcaggagtagcaagtgcagggtctccaaacaaagcc
ctccagcccccatcgagaaaaacatctccaaagcgaaggggcagccccggaacacaggtgt
acacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaacaggtcagcctgacctgctgtggtcaa
agggtcttatccagcgacatgcgcgtggagtgaggaggaatgggcagccggagaaacaaactac
aagaccacgctcccggtgttggaactccgaaggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgg
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcctgagggtctgacaaa
ccactacacgcaggagagcctctccctgtctccgggtaaatga

Фиг. 3В

Нуклеотидна послідовність IFN α -Fc (8-амінокислотний лінкер)

atggccttgacctttgctttactagtgccctcctgggtgctcagctgcaagtcaagctcctctg
tgggctgtgatctgctcaaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
gatgaggagaatctctctttctcctgcttgaaaggacagactgactttggatttccccaggag
gagtttggcaaccagttccaaaggctgaaacacatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggtgagacccctcctagacaaatt
ctacactgaactctaccagcagctgatgacctggaagcctgtgtgatacaggggggtgggggtg
acagagactccctgatgagggaaggactccattctggctgtgagggaatacttccaaagaatca
ctctctatctgaagaggaagaaatacagcccttgctgctgggggggtgtgtagagcagaaatcat
gagatcttttcttctgcaacaaacttgcaagaaagttaagaaagtgaaggagaattcgccggc
gccgtgccgtcgacaaactcacacatgccacccgtgcccgacccctgaactcctggggggac
cgtaagtcttctcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccgggacccctgaggt
cacatgcgtggtgggggagtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggagggtgcatatgccagacaaagccgcccgggaggagtagtaaacacagcacgtacccgtg
tggtagcgtcctcaccgtcctgacacaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcagggt
ctccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaacatctccaaagccaaaggggcagccccga
gaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaacagggtcagcctga
cctgctggtcaaaggcttctatccagcgacatgcgcgtggagtgaggagagcaatgggcagcc
ggagaaacactacagacacacgctcctgtgttggaactccgacgggtcctcttctctctacagc
aagctcaccgtggacaaagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatg
agggtctgcacaaacccctacacgcagaaagcctctccctgtctccgggtaaatga

Фиг. 3С

Нуклеотидна послідовність IFN α -Fc- Δ -лінкер

atggccttgacctttgctttactggtggccctctggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
 gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaggacagacatgactttggatttccccaggag
 gagtttggcaaccaggttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
 tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt
 ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaaagcctgtgtgatacaggggggtgggggtg
 acagagactccccctgatgaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccasaagaatca
 ctctctatctgaaagagaagaatacagcccttgtgcctgggagggttgtcagagcagaatcat
 gagatctttttcttctgtcaacaaaacttgcaagaaagttaaagaaagttaggaaagacaaaactcac
 acgtgcccgccgtgccagctccggaactgctgggcggaccgtcagctcttctcttccccccaa
 aaccacaaggacacccctcatgatctcccgacccctgagggtcacatgctgtggagggtgagcgtgag
 ccacgaagaacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatggcaag
 acaaagccgaggaggagcagtcacacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc
 accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctccagccccc
 catcgagaaaccatctccaaagccaaaggaggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgcc
 ccatcccgggatgagctgaccasgaaccagggtcagcctgacctgacctgggtcaaaggcttctatc
 ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcgggagaacaactacaagaccacgccc
 tccctgtgttgactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcagggaacgtcttctcatgctccgtgctgcatgaggctctgcacaaccactacacgc
 agaagagcctctccctgtctcgggttaatga

Фіг. 3D

Нуклеотидна послідовність FlagFc

atggaagcagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtagc
actacaaggacgacgatgacaaggacaaaactcacacatgccacacgtgccagctccggaact
 cctgggggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaaccacaggacacccctcatgatctccgg
 acccttgagggtcacatgctgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaact
 ggtacgtggcggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagccgaggaggagcagtagacaacag
 cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtac
 aegtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaccatctccaaagccaag
 ggacgccccgagaaccacagggtgtacacccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaacca
 ggtcagcctgacctgacctgggtcaaaggcttctatccacagcagcatcgccgtggagtgggagagc
 aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgttgactccgacgggtccttct
 tctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcagggggaacgtcttctcatgctc
 cgtgatgcatgaggctctgcacaaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
 tga

Фіг. 3E

Нуклеотидна послідовність Еро-ССА-Fc (сигнальна послідовність K^b
підкреслена, кисла подвійна спіраль вказана жирним шрифтом)

atggtagccgtgcacgctgctcctgctgttggcggccgcctggctccgactcagaccgcgcgcg
gctctagagcccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctgcagaggtacctcttggaggc
caaggagggccggaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcact
gtcccagacaccaaagttaatttctatgcttggagaggatggaggtcgggcagcagggccgtag
aagtcctggcagggcctggccctgctgtcggaagctgtcctgcggggccagggccctgttggtaa
ctcttcccagccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaagccgtcagtgcccttcgcagc
ctcaccactctgcttcgggctctgggagcccaaggaagccatctcccctccagatggggcct
cagctgctccactccgaacaatcactgctgacactttccgcaaacctcttcgagcttactccaa
tttctccgggggaagctgaagctgtacacaggggagggcctgcaggaccgggtgacaggggaatc
ggtaggtgagtaaccagggcctggaggaaggaggtggccagctggaggccgagaaaccagggcctgg
agaaggaggtggccagctggagcagcagggtggtaggtccgcaccccgagctgctggggcggacc
gtcagctcttctcttccccccaaaaccacagacccctcatgatctccggagccctgaggtc
acatgcgtggtaggtggagctgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtagctggagc
gcgtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccgcggggaggagcagtagcaacagcagtagctgt
ggtagcgtcctcaccgtcctgcacacaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggctc
tccaaacaaagccctcccagcccccacgagaaaccatctccaaagccaaaggcagcccccag
aacacaggtgtacacccctgcccccatccgggatgagctgaccaaagaaaccaggtcagcctgac
ctgctggtaggtcaggtcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggagcgg
gagaacaaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttcttctctacagca
agctcaccgtggacaaggcagggtggcagcgggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
ggctctgcacaaccactacacgcagaaagacctctccctgtctccgggtaaatga

Fig. 3F

Нуклеотидна послідовність ССВ-Fc (сигнальна послідовність підкреслена,
основна подвійна спіраль вказана жирним шрифтом)

atggtagccgtgcacgctgctcctgctgttggcggccgcctggctccgactcagaccgcgcgcg
gcgaattcgggtggtagtagtagggccctgaaggaagaggtggccagctgaaggccaaagaaacca
ggccctgaaggaagaggtggccagctgaagcacaagggcggcggcccccagagctcctg
ggcggacgcgtcagctcttctcttcccccaaaaccacaggaacccctcatgatctccgggaccc
ctgaggtcacatgcgtggtaggtggagctgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagcaaaagccgcgggaggagcagtagcaacagcagc
tagcgtgtggtagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaagt
gcaaggctctccaaacaaagccctcccagcccccacgagaaaccatctccaaagccaaaggga
gccccgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatccgggatgagctgaccaaagaaccaggtc
agcctgacctgctggtaggaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatg
ggcagccggagaaacaaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttcttctc
ctacagcagctcaccgtggacaaggcagggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
atgtagtaggtctgcacaaccactacacgcagaaagacctctccctgtctccgggtaaatga

Fig. 3G

Нуклеотидна послідовність CysFc (сигнальна послідовність
hIFN α підкреслена)

atggccttgacctttgctttactggtagccctcctggtagctcagctgcaagtcaggctgctctg
tgggctgcccgcgctgcccagctccggaaactgctgggcggaccgtcagcttctcctcttcccccc
aaaacccaaggacacccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtaggtggacgtg
agccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgcc
agacaaagccgcgggaggagcagtagcaacagcagtagcgtgtggtagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcaaggctctccaaacaagccctcccagcc
cccatcgagaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgagaaccacaggtgtacacccctgc
ccccatcccgggatgagctgaccagaaccaggtcagcctgacctgctggtaggaaggcttcta
tcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccgggaacaaactacaagaccagc
cctcccgtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagca
ggtaggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacac
gcagaaagacctctccctgtctccgggtaaatga

Fig. 3H

Нуклеотидна послідовність IFN α GS15 Fc (сигнальна
послідовність підкреслена)

atggccttgaaccttgccttactggtgacccctcctggctcctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgtgactgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaaggacagacatgacttggatttccccaggag
gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggatgagacccctcctagacaaatt
ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaggcctgtgtgatacaggggggtgggggtg
acagagactccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
ctctctatctgaagagagaagaatacagcccttgtgctgggagggttgtcagagcagaatcat
gagatcttttcttctgtcaacaaacttgaagaagtttacgtagttaggaagggtggcggcggg
tccggtggaggcgggtcggcggtggaggagcgacaaactcacacgtgcccgccgtgcccg
ctccggaactgctgggcggaccgtcagttctctcttcccccaaaacccaaaggacacccctcat
gatctccggacccctgaggctcacatgcgtgggtggtagctgagccacgaagacccctgaggtc
aagtccaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagcggggaggagc
agtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgctcctgcaccaggactggctgaatgg
caaggagtacaagtgaagggtctccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaccatctcc
aaagcacaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccattccgggatgagctga
ccaagaaaccgggtcagcctgacctgctgggtcaaggccttctatccagcgacatcgccgtgga
gtgggagagcagatgggcagcgggagaaactacaagaccacgcctcccggtgtgagctccgac
ggctccttcttctctacagcaagctcacggtggacaagagcagggtggcagagggaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagagagcctctccctgtc
tcccaataaatca

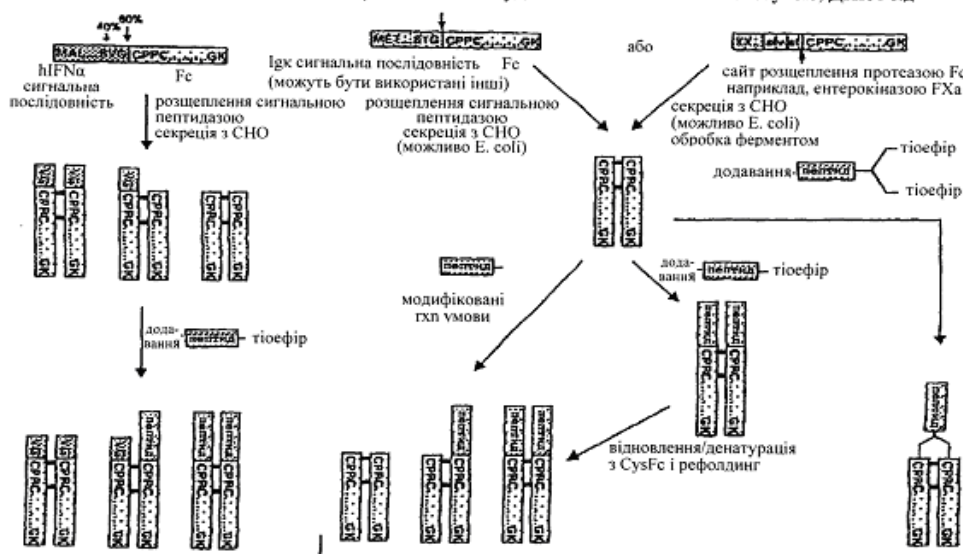
Фіг. 3I

Нуклеотидна послідовність ЕроFc (сигнальна послідовність підкреслена,
лінкер вказаний жирним шрифтом)

atggaggtgacagaaatgctcctgcctggctgtggcttctcctgtccctgctgtcgtccctctgg
gcctccaggtcctgggcgcctccacacgcctcatctgtgacagccgagtccctggagagggtacct
cttggaggccaaaggaggccgagaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgag
aatatcactgtccagacaccaaagttaatctctatgacctggagaggatggagggtcgggcagc
aggccgtagaagtctggcaggcctggccctgctgtcggaagctgtcctgcggggccaggccct
gttgggtcaactcttccagcgtgggagccctgcagctgcatgtggataaagccgtcagtggtg
cttcgcagcctcacactctgcttcgggctctgggagcccgagagggaagccatctccctccag
atggggcctcagctgtccactccgaacaatcactgctgacacttccgcacaaactcttcagggt
ctactccaatttctccggggaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcagaacaggggagc
agagagttcgcgggcgcgttgcgggtgacaaactcacacatgcccaacgtgccagctccgg
aaactcctgggcggaccgtcagttctctcttccccccaaacccaaaggacacccctcatgatctc
ccggacccctgagggtcacatgcgtgggtggtagctgagccacgaagacccctgagggtcaagttc
aaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagcggggaggagcagta
acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgctcctgcaccaggactggctgaatggcaagg
gtacaagtgaagggtctccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaccatctccaaagcc
aaaggggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccattccgggatgagctgacaaaga
accagggtcagcctgacctgctgggtcaagggttctatccagcgacatcgccgtggagtgagg
gagcaatgggcagccggggaacaaactacaagaaacacgcctcccggtgtggactccgacggctc
ttcttctctacagcaagctcacggtggacaagagcagggtggcagcagggggaacgtctctcat
gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagagagagcctctccctgtctccgg
taaatga

Фіг. 3J

Різні шляхи утворення гібридів мономер-димер за допомогою нативного лігування зверніть увагу, що пептид може бути замінений будь-якою іншою малою молекулою. ДНК і т.д.



також можна використати в протилежному напрямі, тобто одержати Fc-інтеїн, створити Fc-тіоефір, здійснити взаємодію з Cys-пептидами і т.д.

Fig. 4

Амінокислотна послідовність Fc-MESNA (одержаного у векторі pTWIN1 з NEB; в тому випадку, коли Fc-інтеїн-CBD елюєє з хітинових кульок з використанням MESNA, одержують наступний білок з С-кінцевим тіоефіром на кінцевому залишку Phe)

1	MG1EGRGAAA	VDSHTCPCP	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMSRTPEV
51	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KFREEQYNST	YRVVSVLTVL
101	HQDWLNGKEY	KCKVPSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPVY	TLPPSRDELT
151	KNQVSLTKCLV	KGFYPSNDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK
201	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSMVH	EALHNHYTOK	SLSLSPGF	

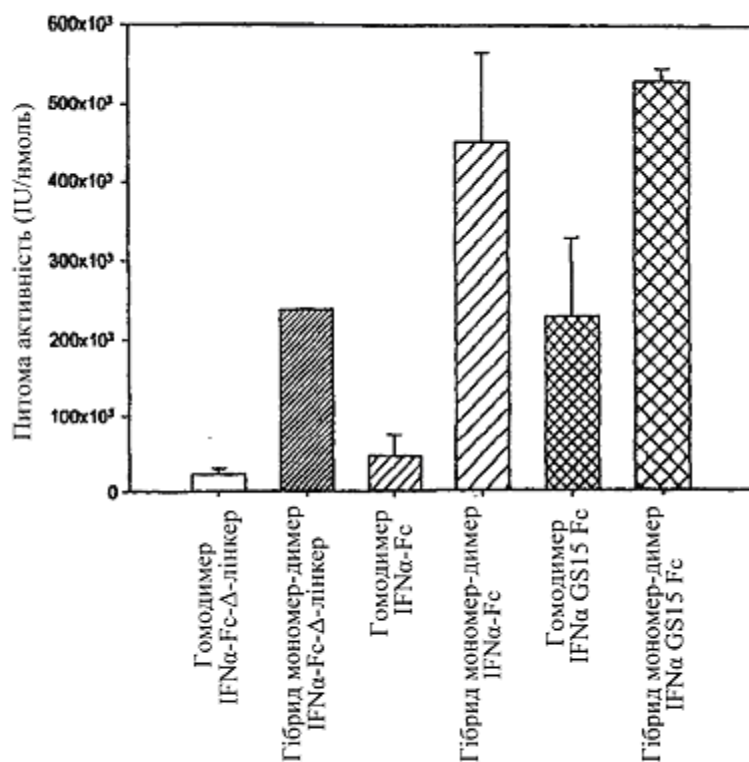
Fig. 5A

Нуклеотидна послідовність кодуючої послідовності FC рТWIN1
(кінцевий залишок F, tt_t, безпосередньо межує з кодуючою
послідовністю Mxe GyrA в рТWIN1)

atgggcattgaggcagaggcgccgctgcggtcgatactagtcacacatgccaccgtgccag
cactgaactctggggggaacgtcagttctctcttcccccaaaacccaggacacctcat
gattctccgggacccctgaggtcacgtcggtggtggacgtgagccagagacctgaggtc
aagtcaactggtagtggacggcgctggagggtgcataactcccaagacaaaggcgcgggggagc
agtacaacagcagctaccgtgtggtcagcgctctcacgctcccgaccaggactgctgaatgg
caaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagccccctcgagaaaccatctcc
aaaggcaaaaggcgagccccgagaaaccagggtgtacacctgccccctcccggtatgagctga
cgaagaaacccgtcagcctgacctgctggctcgaaggctctatccagcgccagactcgcggtgga
gtggggagagcaatgggcagcgggagaaacactcaagaccacgcctcccggttgtagctccgac
ggctctctctctctctacagcgaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtct
ctctcattctcgtagtgcattgaggtctgcacaacccactacacgcgaagagctctctccctgtc
tccqqgtttt

Fig. 5B

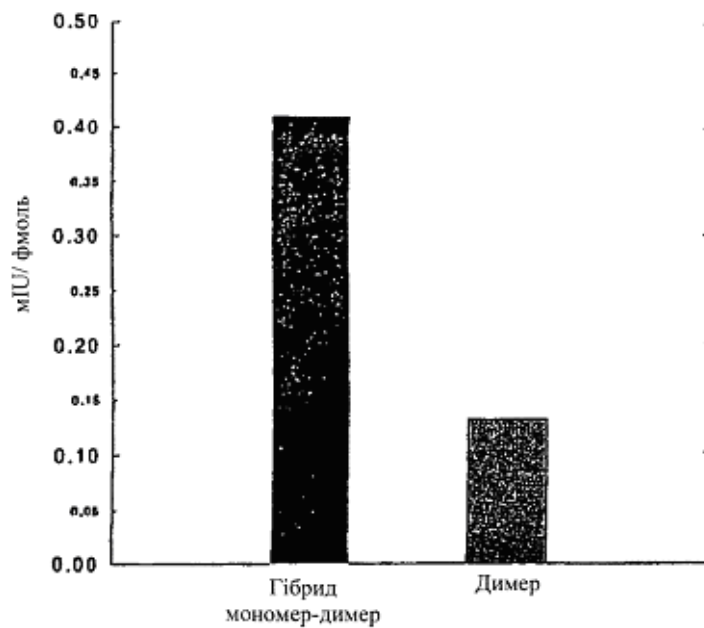
Противірусна активність димеру IFN α -Fc у порівнянні з гібридним злиттям мономер-димер (IU/нмоль)



Тестований злитий білок IFN α

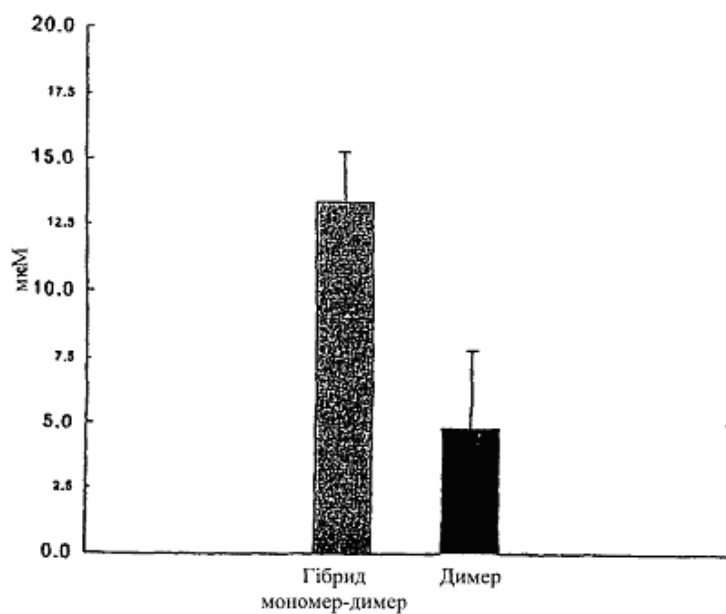
Фіг. 6

Аналіз скипання STA-CLOT VІІа-гTF

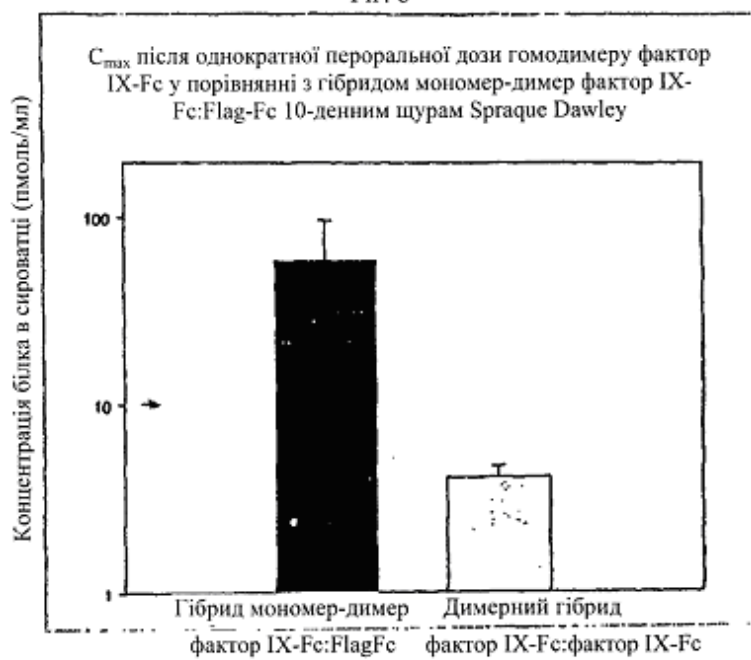


Фіг. 7

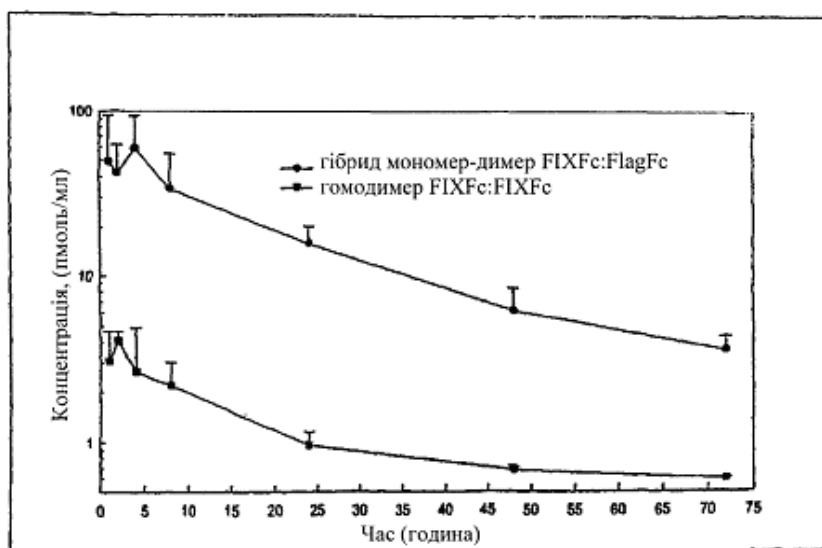
Elisa FVII:Ag
Пероральное введение неонатальным щурам



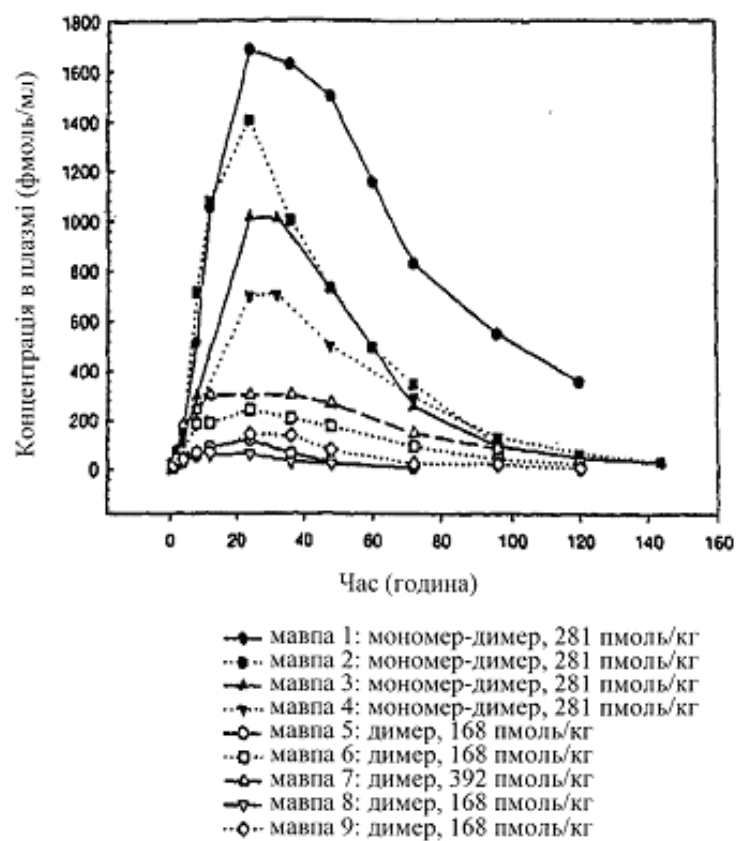
Фиг. 8



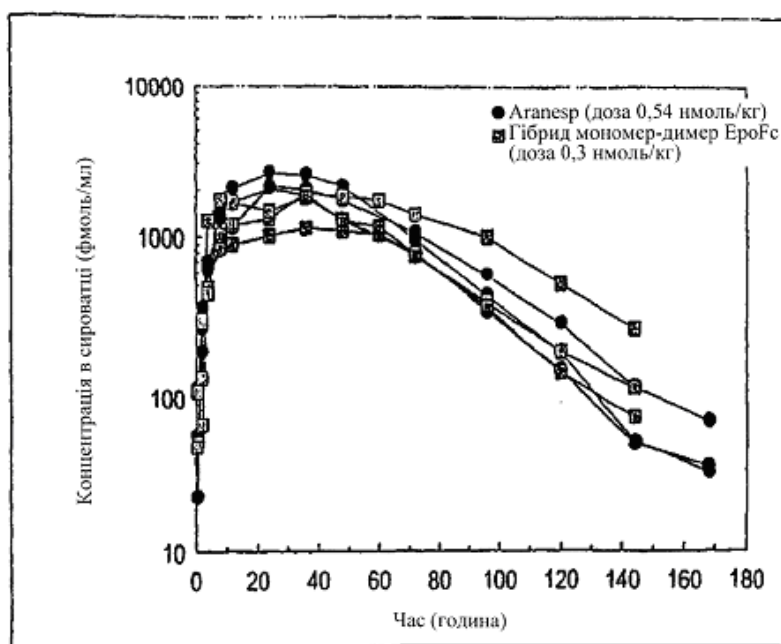
Фиг. 9



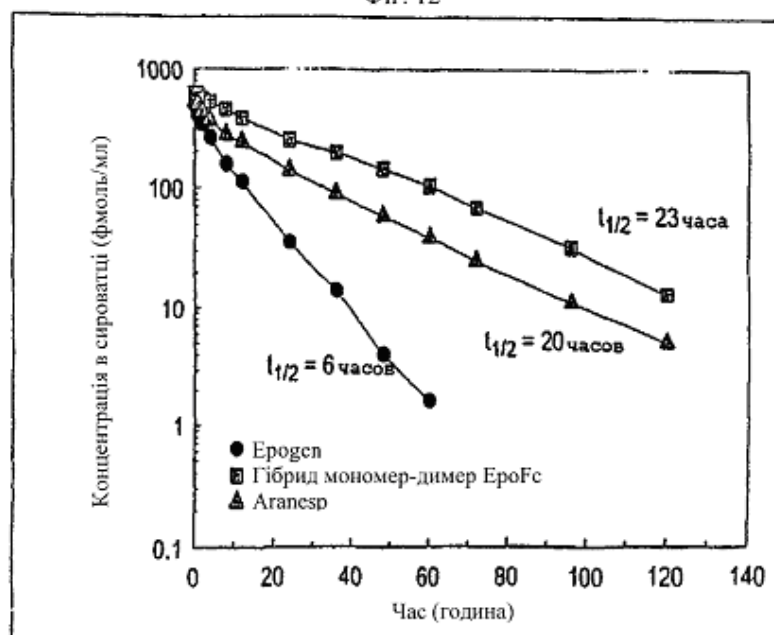
Фіг. 10
Фармакокінетика димеру ЕроFc у порівнянні з
гібридом мономер-димер у макак-крабодів після
однократної легеневої дози, молярне з'єднання



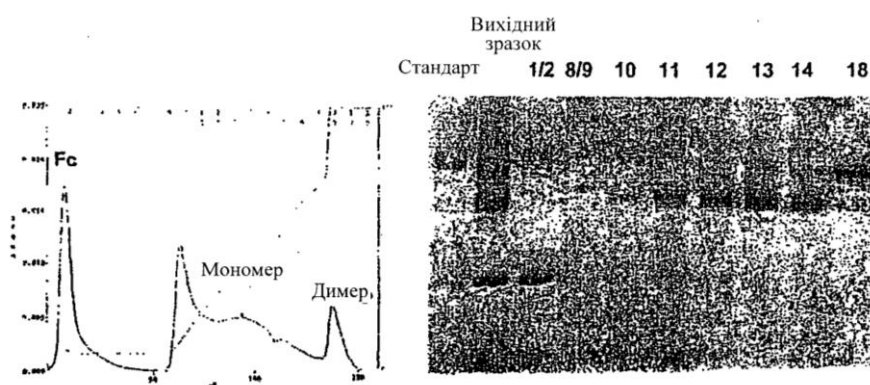
Фіг. 11



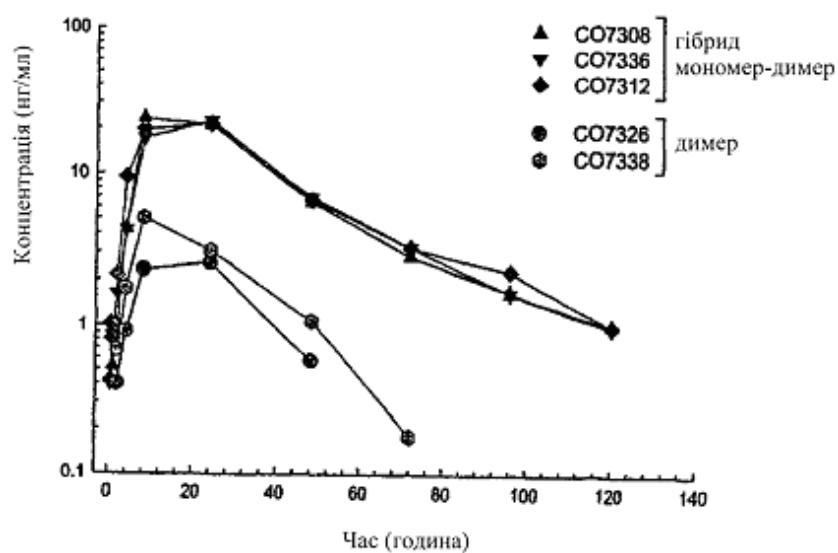
Фіг. 12



Фіг. 13

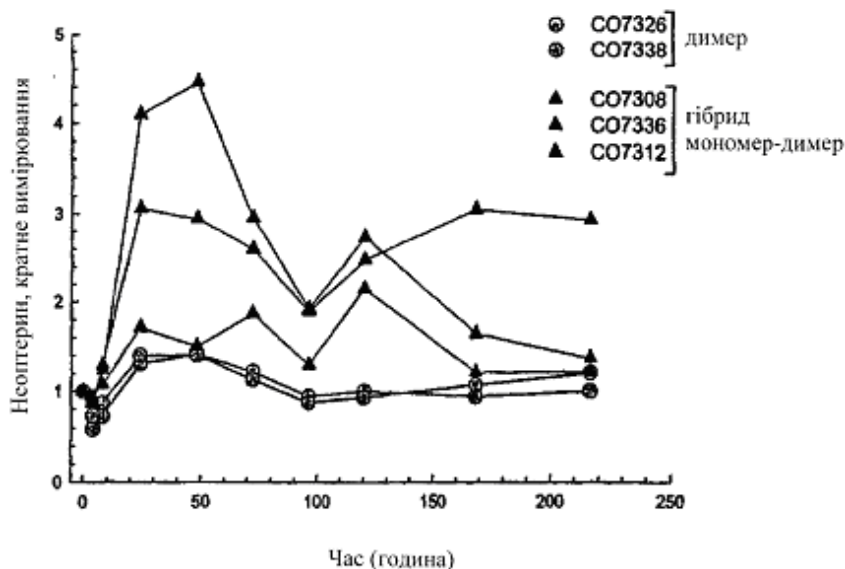


Фіг. 14
Фармакокінетика IFN β -008 (димер IFN β -Fc дикого типу) і IFN β -009/Fc-014 (мономер IFN β -Fc N297A) в сироватці макак-крабодів після однократної легеневої дози 20 мкг/кг



Фіг. 15

Рівні неоптерину в сироватці макак-крабодів після
однократної легеневої дози (20 мкг/кг) IFN β -008
(димер IFN β -Fc дикого типу) або IFN β -009/Fc-014
(мономер IFN β -Fc N297A)



Фіг. 16

Нуклеотидна послідовність IFN β -Fc (сигнальний пептид підкреслений)

atgaccaacaagtgtctcctccaaattgctctcctgttgcttctccactacagctctttcca
tgagctacaacttgcttgattcctacaaagaagcagcaattttcagtgctcagaagctcctgtg
gcaattgaatgggaggcttgaatatgtcctcaaggacaggatgaactttgacatccctgaggag
attaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgcgcattgaccatctatgagatgctccaga
acatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctggaatgagactattgttgagaa
cctcctggctaattgtctatcatcagataaaccatctgaagacagtcctggaagaaaaactggag
aaagaagatttcaccaggggaaaaactcatgagcagctctgcacctgaaaagatatattgggagga
ttctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcactgtgctggacctatagt cagagtggaat
cctaaggaacttttacttcattaacagacttacaggttacctccgaaacgagttcgccggcgcc
gctgcggtcgacaaaactcacacatgccaccgctgccagctccggaactcctgggaggacgct
cagttcttctcttcccccaaaaacccaaggacacacctcatgatctcccggaacctgaggtcac
atgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
gtggagggtgcataatgccaagacaaaagccgaggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtg
tcagcgctcctcacgctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctc
caacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaa
ccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgga
gaacaaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctccttctcctctacagcaag
ctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

Фіг. 17A

Амінокислотна послідовність IFN β -Fc (сигнальна послідовність підкреслена, лінкерна послідовність вказана жирним шрифтом, N297 вказаний жирним шрифтом і підкреслений)

```

1   MTNKCLLQIA LLLCFSTTAL SMSYNLLGFL QRSSNFQCQK LLWQLNGRLE
51  YCLKDRMNFD IPEEIKQLQQ FQKEDAALTI YEMLQNIFAI FRQDSSSTGW
101 NETIVENLLA NVYHQINHLK TVLEEKLEKE DFTRGKLMSS LHLKRYYGRI
151 LHYLKAKEYS HCAWTIVRVE ILRNFYFINR LTGYLRNEFA GAAAVDKTHT
201 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
251 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
301 KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
351 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
401 SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK

```

Fig. 17B

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO: 99).

Fig. 18A

NNLRAIEAQQHLLQLTVWGKQLQARILAVEERYLKDQ (SEQ ID NO: 100)

Fig. 18B

WQEWQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO: 101)

Fig. 18C

В описі до патенту на винахід графічні зображення та текст подаються в редакції заявника

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко

Підписне

Тираж 23 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601