

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392325** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.16

(22) Дата подачи заявки
2022.02.17

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/36 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ ВОДНОГО РАСТВОРА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ
СКОНСТРУИРОВАННЫХ ДИМЕРНЫХ БЕЛКОВ**

(31) **2102258.7**

(32) **2021.02.17**

(33) **GB**

(86) **PCT/US2022/016864**

(87) **WO 2022/178175 2022.08.25**

(71) Заявитель:
АРЕКОР ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

**Аммануллах Ашраф (US), Езек Ян,
Джерринг Дэвид, Кремин Джошуа,
Пинто Йорге (GB), Лобо Брайан, Хейз
Брэдли (US)**

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

(57) Изобретение относится к композициям водного раствора сконструированных димерных белков, содержащих мономеры, которые содержат по меньшей мере один полипептид серпина человека, функционально связанный с полипептидом Fc иммуноглобулина человека или полипептидом, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, имеющим низкие концентрации буфера и низкую ионную силу и содержащим нейтральную аминокислоту. Композиции водного раствора повышают стабильность Fc-домена в композициях водного раствора и, в частности, повышают стабильность сконструированного димерного белка.

A1

202392325

202392325

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 579047EA/081

КОМПОЗИЦИИ ВОДНОГО РАСТВОРА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ СКОНСТРУИРОВАННЫХ ДИМЕРНЫХ БЕЛКОВ

Родственные заявки

[001] Настоящей заявке испрашивается приоритет по патентной заявке № 2102258.7, поданной в Великобритании 17 февраля 2021 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Включение списка последовательностей в качестве ссылки

[002] Содержание текстового файла, названного INHI-702_001WO Sequence_Listing.txt, который был создан 16 февраля 2022 года и имеет размер 148 килобайт, включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Совместное владение согласно соглашению о совместных исследованиях

[003] Объект, описанный в настоящей заявке, был разработан и заявленное в формуле изобретения изобретение было осуществлено одной или несколькими сторонами или от имени одной или нескольких сторон Соглашения о совместном исследовании, которое действовало в момент или до эффективной даты подачи заявленного изобретения. Стороны Соглашения о совместном исследовании являются следующими: Arecor Limited и Inhibrx, Inc.

Область изобретения

[004] Настоящее изобретение относится к композициям водного раствора сконструированного димерного белка, содержащего Fc-домен, имеющим низкие концентрации буфера и низкую ионную силу и содержащим нейтральную аминокислоту.

Уровень техники

[005] Сконструированные белки, содержащие Fc-домен, широко используются в терапии. Fc-домен представляет собой C-концевую область антитела, которая взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc-рецепторами, и некоторыми белками системы комплемента и, тем самым, активируют иммунную систему. В изоформах антител IgG, IgA и IgD Fc-домен состоит из двух идентичных фрагментов белковой цепи, каждая из которых происходит из второго и третьего константных доменов тяжелой цепи антитела. В изоформах IgM и IgE антител Fc-домен состоит из двух идентичных фрагментов белковой цепи, каждый из которых происходит из второго, третьего и четвертого константных доменов тяжелой цепи антитела. Молекулярная масса Fc-домена, как правило, может находиться в диапазоне 25-40 кДа, и может быть большей, когда присутствует гликозилирование. Широкий диапазон физиологических эффектов является результатом активации иммунной системы, опосредуемой связыванием Fc-домена антитела, включая клеточный лизис и дегрануляцию тучных клеток, базофилов и эозинофилов.

[006] Был разработан широкий диапазон сконструированных антительных белков, включая биспецифические и триспецифические антитела. Также был разработан ряд

сконструированных белков, где Fc, отделенный от Fab-частей молекулы антитела (частей, которые сообщают специфичность связывания антигена), может иметь назначение, отличное от его физиологического назначения, в частности, назначение пролонгирования времени полужизни сконструированного белка *in vivo*.

В WO2013/003641A2 и WO2016/069574A1 (INHIBRX) описаны сконструированные димерные белки, которые включают полипептид серпина или аминокислотную последовательность, которая происходит из серпина.

[007] Когда белки составляют в качестве водных растворов, они могут быть подвержены деградации и последующей утрате биологической активности при хранении. Деградация может быть физической по своей природе, включая агрегацию, преципитацию или гелеобразование. Деградация также может быть химической по своей природе, включая гидролитическое расщепление, дезамидирование, образование циклического имида, изомеризацию аспартата/глутамата или окисление.

[008] Скорости процессов деградации растут при повышении температуры и белковые терапевтические молекулы, как правило, являются более стабильными при более низких температурах. Однако часто затруднительно разработать терапевтический белковый продукт, который является стабильным в жидкой форме в течение предполагаемого срока хранения (как правило, 24 месяца), даже при охлаждении. Кроме того, для обеспечения удобства для пациентов часто необходимо разработать продукты, которые являются стабильными при повышенных температурах, например, вплоть до 25°C или вплоть до 30°C, либо в течение конкретного периода времени, либо на протяжении всего срока их хранения.

[009] Одним из наиболее важных параметров для контроля стабильности белковых терапевтических средств является pH. Таким образом, оптимизация pH является ключевой стадией в разработке состава. Многие терапевтические белки составляют с характерным pH между 4,0-8,5. Предполагается, что важно гарантировать сохранение pH на выбранном уровне и минимизировать колебания pH. Таким образом, понятно, что для составления требуется определенная степень буферной емкости. Более крупные белковые молекулы, как правило, имеют некоторую собственную буферную емкость вследствие присутствия ионизируемых групп в боковых цепях аминокислот полипептидного остова.

[010] Настоящее изобретение относится к композициям, которые повышают стабильность сконструированных белков, которые содержат Fc-домен, в композициях водного раствора, и, в частности, повышают стабильность сконструированного димерного белка, где каждый мономер димерного белка содержит по меньшей мере один полипептид серпина человека, функционально связанный с Fc-полипептидом иммуноглобулина человека, или полипептидом, который происходит из Fc-полипептида иммуноглобулина ("сконструированный димерный белок по изобретению").

Сущность изобретения

[011] Настоящее изобретение относится к композиции водного раствора с pH в диапазоне от 6,0 до 8,0, содержащей: сконструированный димерный белок, где каждый

мономер димерного белка содержит по меньшей мере один полипептид серпина человека, функционально связанный с Fc-полипептидом иммуноглобулина человека или полипептидом, который происходит из Fc-полипептида иммуноглобулина; необязательно один или несколько буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу, с pK_a в диапазоне от 4,0 до 10,0, причем эта pK_a находится в пределах 2 единиц pH от pH композиции; нейтральную аминокислоту и незаряженный модификатор тоничности; где буферы присутствуют в композиции в общей концентрации 0-10 мМ; и где общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 30 мМ.

[012] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, полипептид серпина человека представляет собой полипептид антитрипсина альфа-1 (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, каждый мономер димерного белка содержит один полипептид серпина человека. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, полипептид серпина человека имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, представляет собой модифицированный полипептид Fc IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, представляет собой модифицированный полипептид Fc IgG4 человека и имеет последовательность под любым из SEQ ID NO: 28-43. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 56.

[013] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, белок присутствует в концентрации 1-400 мг/мл, например, 10-200 мг/мл, например, 20-100 мг/мл, например, 30-60 мг/мл, например, приблизительно 35 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл.

[014] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, буферы присутствуют в общей концентрации 0,1-10 мМ, такой как 0,5-10 мМ, такой как 1-10 мМ, такой как 1-8 мМ, такой как 1-6 мМ, такой как 2-6 мМ, такой как 2-5 мМ, например, 3-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, по существу свободна от буферов.

[015] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в пределах 1 единицы от pH композиции.

[016] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, буфер или буферы выбран/выбраны из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, сульфита, аспартама, аспартата, глутамата, тартрата, аденина, сукцината, аскорбата, бензоата, фенилацетата, галлата, цитозина, *p*-аминобензойной кислоты, сорбата, ацетата, пропионата, альгината, урата, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты, бикарбоната, бис(2-гидроксиэтил)иминотрис(гидроксиметил)метана, *N*-(2-ацетамидо)-2-иминодиуксусной кислоты, 2-[(2-амино-2-охоэтил)амино]этансульфоновой кислоты, пиперазина, *N*, *N'*-бис(2-этансульфоновой кислоты), фосфата, *N,N*-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты, 3-[*N,N*-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновой кислоты, триэтанолamina, пиперазин-*N,N'*-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты), трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS), *N*-трис(гидроксиметил)глицина и *N*-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновой кислоты, и их солей, и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, тартрата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS), например, выбран из фосфата и TRIS.

[017] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, незаряженный модификатор тоничности выбран из группы, состоящей из многоатомных спиртов, сахаров (например, моносахариды и дисахариды) и сахарных спиртов. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, незаряженный модификатор тоничности выбран из группы, состоящей из глицерина, 1,2-пропандиола, маннита, сорбита, глюкозы, сахарозы, трегалозы, ПЭГ300 и ПЭГ400, и, в частности, выбран из глицерина, маннита, сахарозы и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит дисахарид в качестве незаряженного модификатора тоничности. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит сахарозу и/или трегалозу в качестве незаряженного модификатора тоничности, в частности, трегалозу.

[018] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, общая концентрация незаряженного модификатора тоничности или комбинации нескольких модификаторов тоничности составляет 50-1000 мМ, как например, 200-600 мМ, 200-500 мМ, или общая концентрация незаряженного модификатора тоничности или комбинации нескольких модификаторов тоничности составляет 50-500 мМ, как например, 100-400 мМ, 150-350 мМ, 200-300 мМ или приблизительно 250 мМ.

[019] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, осмолярность композиции составляет 200-500 мосм/л,

например приблизительно 300 мосм/л, или осмолярность композиции составляет 300-500 мосм/л, например, приблизительно 400-460 мосм/л.

[020] В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит нейтральную аминокислоту, выбранную из глицина, метионина, пролина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, серина, треонина, аспарагина и глутамина. В некоторых вариантах осуществления нейтральная аминокислота выбрана из глицина, метионина и пролина. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит пролин в качестве нейтральной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит глицин в качестве нейтральной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит пролин и метионин в качестве нейтральных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит глицин и метионин в качестве нейтральных аминокислот.

[021] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, общая концентрация одной или нескольких нейтральных аминокислот в композиции составляет от 20 до 600 мМ, как например, от 20 до 500 мМ, как например, от 20 до 400 мМ, как например, от 20 до 300 мМ, например, от 50 до 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, общая концентрация одной или нескольких нейтральных аминокислот в композиции составляет от 50 до 200 мМ, от 100 до 200 мМ или от 100 до 150 мМ.

[022] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 10 мМ.

[023] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, рН составляет от 6,8 до 7,8, например, от 7,0 до 7,8, от 7,1 до 7,6, от 7,1 до 7,5, от 7,2 до 7,5, от 7,1 до 7,4, от 7,2 до 7,3; или составляет приблизительно 7,2 или приблизительно 7,3.

[024] В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит неионное поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из алкилгликозида, полисорбата, алкилового эфира полиэтиленгликоля, блок-сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (полоксамер) и алкилфенилового эфира полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой

полисорбат, такой как полисорбат 20 или полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (полоксамер), такой как полоксамер 188.

[025] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, неионное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации 10-2000 мкг/мл, такой как 50-1000 мкг/мл, например, 100-500 мкг/мл, например, приблизительно 200 мкг/мл, или неионное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации 250-1500 мкг/мл, например, 750-1250 мкг/мл, например, приблизительно 1000 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция водного раствора, описанная в настоящем описании, содержит консервант, такой как фенольный или бензильный консервант. В некоторых вариантах осуществления фенольный или бензильный консервант выбран из группы, состоящей из фенола, м-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, пропилпарабена и метилпарабена.

[026] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанной в настоящем описании, консервант присутствует в концентрации 10-100 мМ, такой как 20-80 мМ, например, 25-50 мМ.

[027] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанная в настоящем описании, представляет собой композицию для применения в терапии.

[028] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора, описанная в настоящем описании, представляет собой фармацевтическую композицию.

[029] Настоящее изобретение также относится к способу лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение композиции водного раствора, описанной в настоящем описании.

[030] Также настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, описанной в настоящем описании.

[031] Также настоящее изобретение относится к способу уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, описанной в настоящем описании.

[032] Также настоящее изобретение относится к способу лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора по настоящему изобретению, где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

[033] Также в рамках настоящего изобретения предусматривается композиция

водного раствора по настоящему изобретению для применения в способе лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом.

[034] Также в рамках настоящего изобретения предусматривается композиция водного раствора по настоящему изобретению для применения в способе лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном уменьшении риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

[035] Также в рамках настоящего изобретения предусматривается композиция водного раствора по настоящему изобретению для применения в способе уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

[036] Также в рамках настоящего изобретения предусматривается композиция водного раствора по настоящему изобретению для применения в способе лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом, где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

[037] Также настоящее изобретение относится к применению композиции водного раствора по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом.

[038] Также настоящее изобретение относится к применению композиции водного раствора по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном снижении риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

[039] Также настоящее изобретение относится к применению композиции водного раствора по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

[040] Также настоящее изобретение относится к применению композиции водного раствора по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом, где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

[041] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора по настоящему изобретению для применения или в некоторых вариантах осуществления применения согласно любому из способов по настоящему изобретению воспалительное заболевание или нарушение выбрано из следующих: дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТ), дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТ), эмфизема, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), аллергическая астма, кистозный фиброз, злокачественные опухоли легкого, повреждение

при ишемии-реперфузии, повреждение при ишемии/реперфузии после трансплантации сердца, инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, септический артрит, псориаз, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, диабет типа I и/или типа II, пневмония, сепсис, реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), заживление ран, системная красная волчанка и рассеянный склероз.

[042] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора по настоящему изобретению для применения или в некоторых вариантах осуществления применения согласно любому из способов по настоящему изобретению инфекция выбрана из бактериальных инфекций, грибковых инфекций и вирусных инфекций.

[043] В некоторых вариантах осуществления композиции водного раствора по настоящему изобретению для применения или в некоторых вариантах осуществления применения согласно любому из способов по настоящему изобретению индивидуумом является человек.

[044] Если в настоящем описании не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные способам, описанным в настоящем описании, могут быть использованы для применения настоящего изобретения на практике, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники литературы, упомянутые в настоящем описании, включены в качестве ссылок в полном объеме. В случае противоречий настоящее описание, в том числе определения, имеют преимущество. Кроме того, материалы, способы и примеры, описанные в настоящем описании, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

[045] Другие признаки и преимущества изобретения станут понятными из и охватываются приведенным ниже подробным описанием и формулой изобретения.

Подробное описание изобретения

[046] В настоящем описании описаны стабильные композиции водного раствора сконструированного димерного белка по изобретению, в которых отсутствует или присутствует низкая концентрация буфера и низкая ионная сила.

[047] Следует отметить, что все упоминания в настоящем описании "pH" относятся к pH композиции, оцениваемой при 25°C. Все упоминания "pK_a" относятся к pK_a ионизируемой группы, оцениваемой при 25°C (см. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 79th Edition, 1998, D. R. Lide). При необходимости величины pK_a боковых цепей аминокислот, присутствующих в полипептиде, можно оценивать с использованием подходящего средства вычисления.

[048] Авторы настоящего изобретения полагают, что буферы имеют неблагоприятное влияние на сконструированный димерный белок по изобретению. Таким образом, концентрация буфера в композиции должна быть ограничена максимальным образом.

[049] Буфер(ы), когда он присутствует, имеет буферную емкость при рН композиции. Буферы, как правило, содержат ионизируемые группы с pK_a в пределах 1 единицы рН от рН композиции, однако часть, которая имеет ионизируемые группы с pK_a на 1 единицу рН выше или ниже рН композиции, также могут обеспечить некоторый буферный эффект, если они присутствуют в достаточном количестве. В одном варианте осуществления данный (или некоторый) буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в пределах 1 единицы рН от рН композиции. В другом варианте осуществления данный (или некоторый) буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в пределах 1,5 единицы рН от рН композиции (как например, от 1 до 1,5 единицы рН от рН композиции). В следующем варианте осуществления данный (или некоторый) буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в пределах 2 единиц рН от рН композиции (как например, от 1,5 до 2 единиц рН от рН композиции).

[050] В одном варианте осуществления композиция по существу свободна от буферов. Как используют в рамках изобретения, "по существу свободный" означает, что композиция водного раствора содержит менее 0,1 мМ буферов, например, не содержит никаких буферов. Более предпочтительно, присутствует небольшое количество буфера, чтобы избежать или ограничить колебания рН, которые являются нежелательными. В одном варианте осуществления композиция содержит один буфер. В другом варианте осуществления композиция содержит два буфера. В подходящем случае присутствует один или несколько буферов.

[051] Общая концентрация буферов в композиции составляет 0-10 мМ. В одном варианте осуществления общая концентрация буферов в композиции составляет 9,5 мМ или менее, как например, 9 мМ или менее, как например, 8 мМ или менее, как например, 7 мМ или менее, как например, 6 мМ или менее, как например, 5,5 мМ или менее, как например, 5 мМ или менее, как например, 4,5 мМ или менее, как например, 4 мМ или менее, как например, 3 мМ или менее, как например, 2 мМ или менее, как например, 1 мМ или менее, как например, 0,5 мМ или менее, как например, 0,4 мМ или менее, как например, 0,3 мМ или менее, как например, 0,2 мМ или менее. В одном варианте осуществления общая концентрация буферов составляет 0,1 мМ или более, как например, 0,2 мМ или более, как например, 0,3 мМ или более, как например, 0,4 мМ или более, как например, 0,5 мМ или более, как например, 1 мМ или более. В подходящем случае общая концентрация буферов составляет 0,1-10 мМ, как например, 0,5-10 мМ, как например, 1-10 мМ, как например, 1-8 мМ, как например, 1-6 мМ, как например, 2-6 мМ, как например, 2-5 мМ, например, 3-5 мМ.

[052] При рассмотрении концентрации буфера в растворе любая буферная емкость самого сконструированного димерного белка по изобретению должна быть исключена.

[053] рН водного раствора снижается при добавлении кислоты и возрастает при добавлении основания. При данной температуре и атмосферном давлении величина рН снижается при добавлении кислоты или величина рН возрастает при добавлении основания в зависимости от (1) количества добавленной кислоты или основания, (2)

начального значения рН водного раствора (т.е. до добавления кислоты или основания) и (3) присутствия буфера. Таким образом, (1) начиная с данного значения рН, добавление большего количества кислоты или основания приведет к большей величине изменения рН, (2) добавление данного количества кислоты или основания приведет к наибольшему изменению рН при нейтральном значении рН (т.е. рН 7,0) и величина изменения рН снизится по мере смещения начального рН от рН 7,0 и (3) величина изменения рН, начиная с данного рН, будет меньшей в присутствии буфера, чем в отсутствии буфера. Таким образом, буфер обладает способностью снижать изменение рН при добавлении в раствор кислоты или основания.

[054] В подходящем случае вещество считается буфером, если оно способно снижать величину изменения рН раствора до 75%, предпочтительно, до 50%, наиболее предпочтительно, до 25%, по сравнению с идентичным раствором, который не содержит буфер, при добавлении либо сильной кислоты, либо сильного основания, приводящем к повышению концентрации кислоты или основания в растворе на 0,1 мМ.

[055] Напротив, в подходящем случае вещество не считается буфером, если оно неспособно снижать величину изменения рН раствора до 75%, предпочтительно до 50%, наиболее предпочтительно до 25% по сравнению с идентичным раствором, который не содержит вещество, при добавлении либо сильной кислоты, либо сильного основания, приводящем к повышению концентрации кислоты или основания в растворе на 0,1 мМ.

[056] В одном варианте осуществления данный или некоторый буфер представляет собой аминокислоту. В другом варианте осуществления данный или некоторый буфер не является аминокислотой. В одном варианте осуществления композиция свободна от аминокислот лизина, аргинина, гистидина, глутамата и аспартата. В одном варианте осуществления композиция свободна от цистеина.

[057] Когда они присутствуют, подходящие буферы включают, но не ограничиваются ими: цитрат, гистидин, малеат, сульфит, аспартам, аспартат, глутамат, тартрат, аденин, сукцинат, аскорбат, бензоат, фенилацетат, галлат, цитозин, п-аминобензойную кислоту, сорбат, ацетат, пропионат, альгинат, урат, 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту, бикарбонат, бис(2-гидроксиэтил)иминотрис(гидроксиметил)метан, N-(2-ацетамидо)-2-иминодиуксусную кислоту, 2-[(2-амино-2-оксоэтил)амино]этансульфоновую кислоту, пиперазин, N, N'-бис(2-этансульфоновую кислоту), фосфат, N, N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновую кислоту, 3-[N, N-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновую кислоту, триэтанолламин, пиперазин-N, N'-бис(2-гидроксипропансульфоновую кислоту), трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS), N-трис(гидроксиметил)глицин и N-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновую кислоту, и их соли, и их комбинации.

[058] В одном варианте осуществления буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, тартрата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и TRIS, например, выбран из группы, состоящей из гистидина, малеата, тартрата, бензоата,

ацетата, бикарбоната, фосфата и TRIS, например, выбран из группы, состоящей из гистидина, ацетата, фосфата и TRIS.

[059] В одном варианте осуществления буфер представляет собой фосфат (например, фосфат натрия) или TRIS. В одном варианте осуществления буфер представляет собой фосфат (например, фосфат натрия). В подходящем случае буфер представляет собой TRIS.

[060] В одном варианте осуществления композиция не содержит фосфат натрия.

[061] Основным растворителем для композиций по изобретению является вода, такая как вода для инъекций. Другие компоненты композиций (например, многоатомный спирт) могут вносить вклад в сольubilизацию сконструированного димерного белка.

[062] Композиция содержит незаряженный модификатор тоничности, такой как многоатомный спирт, сахар, например, моносахарид или дисахарид, или сахарный спирт. В одном варианте осуществления композиция содержит модификатор тоничности, выбранный из группы, состоящей из глицерина, 1,2-пропандиола, маннита, сорбита, глюкозы, сахарозы, трегалозы, ПЭГ300 и ПЭГ400, например, выбранный из группы, состоящей из глицерина, 1,2-пропандиола, маннита, сорбита, сахарозы, трегалозы, ПЭГ300 и ПЭГ400. Предусматриваются смеси незаряженных модификаторов тоничности, таких как трегалоза и сахароза, или трегалоза и маннит. В одном варианте осуществления незаряженный модификатор тоничности выбран из глицерина, маннита, сахарозы и трегалозы. В подходящем случае незаряженный модификатор тоничности представляет собой дисахарид. Таким образом, в другом варианте осуществления незаряженный модификатор тоничности представляет собой сахарозу и/или трегалозу, и, в частности, представляет собой трегалозу. Когда он включен, незаряженный модификатор тоничности (или комбинацию нескольких модификаторов тоничности) обычно используют в композиции в общей концентрации 50-1000 мМ, например, 200-600 мМ, такой как приблизительно 200-500 мМ. В одном варианте осуществления общая концентрация незаряженного модификатора тоничности (или комбинации нескольких модификаторов тоничности) составляет 50-500 мМ, как например, 100-400 мМ, 150-350 мМ, 200-300 мМ или приблизительно 250 мМ. Другая представляющая интерес концентрация составляет приблизительно 150 мМ.

[063] В одном варианте осуществления, когда незаряженным модификатором тоничности является трегалоза, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими незаряженными модификаторами тоничности, концентрация трегалозы в композиции составляет 50-180 мМ, например, 50-150 мМ.

[064] В подходящем случае композиция имеет осмолярность, которая является физиологически приемлемой и, таким образом, подходящей для парентерального введения. Таким образом, осмолярность композиции в подходящем случае составляет 200-500 мосм/л, например, приблизительно 300 мосм/л. Например, композиция является изотоничной с плазмой человека. В другом варианте осуществления осмолярность композиции составляет 300-500 мосм/л, например, приблизительно 400-460 мосм/л.

Композиции также могут быть гипотоническими или гипертоническими, например, предназначенными для разбавления перед введением.

[065] Композиция содержит нейтральную аминокислоту. Как используют в рамках изобретения, нейтральная аминокислота представляет собой аминокислоту, боковая цепь которой не содержит ионизируемую группу, которая является в значительной степени ионизированной (например, более 20%, в частности, более 50% боковой цепи имеют отрицательный или положительный заряд) при pH композиции. Примерами нейтральных аминокислот являются глицин, метионин, пролин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин, триптофан, серин, треонин, аспарагин и глутамин и, в частности, их L-изомеры.

[066] В одном варианте осуществления композиция содержит нейтральную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, метионина и пролина. В одном варианте осуществления композиция содержит пролин в качестве нейтральной аминокислоты. В одном варианте осуществления композиция содержит глицин в качестве нейтральной аминокислоты. Предусматриваются смеси нейтральных аминокислот. В одном варианте осуществления композиция содержит пролин и метионин в качестве нейтральных аминокислот. В одном варианте осуществления композиция содержит глицин и метионин в качестве нейтральных аминокислот. Как можно видеть из примеров, было выявлено, что присутствие нейтральной аминокислоты повышает стабильность композиции.

[067] В одном варианте осуществления концентрация нейтральной аминокислоты, например, пролина или глицина, составляет от 20 до 600 мМ, как например, от 20 до 500 мМ, как например, от 20 до 400 мМ, как например, от 20 до 300 мМ или от 50 до 300 мМ. В одном варианте осуществления концентрация нейтральной аминокислоты, например, пролина или глицина, составляет от 50 до 200 мМ, от 100 до 200 мМ или от 100 до 150 мМ.

[068] В одном варианте осуществления метионин в качестве нейтральной аминокислоты, когда он присутствует в композиции, присутствует в концентрации от 2 до 10 мМ, например, приблизительно 2 мМ.

[069] В одном варианте осуществления концентрация всех нейтральных аминокислот (т.е. общая концентрация) в композиции, например, пролина или глицина и метионина, составляет от 20 до 600 мМ, как например, от 20 до 500 мМ, как например, от 20 до 400 мМ, как например, от 20 до 300 мМ или от 50 до 300 мМ. В одном варианте осуществления концентрация всех нейтральных аминокислот в композиции, например, пролина или глицина и метионина, составляет от 50 до 200 мМ, от 100 до 200 мМ или от 100 до 150 мМ.

[070] Композиция может содержать неионное поверхностно-активное вещество. Неионное поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей из полисорбата, алкилгликозида, алкилового эфира полиэтиленгликоля, блок-сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, и алкилфенилового эфира

полиэтиленгликоля.

[071] Особенно подходящим классом неионных поверхностно-активных веществ являются полисорбаты (сложные эфиры жирных кислот и этоксилированного сорбитана), такие как полисорбат 20 или полисорбат 80. Полисорбат 20 представляет собой сложный моноэфир, образованный из лауриновой кислоты и полиоксиэтилен (20) сорбитана, в котором число 20 указывает на количество групп оксиэтилена в молекуле. Полисорбат 80 представляет собой сложный моноэфир, образованный из олеиновой кислоты и полиоксиэтилен (20) сорбитана, в котором число 20 указывает на количество групп оксиэтилена в молекуле. Полисорбат 20 известен под рядом торговых наименований, включая, в частности, Tween 20, а также Alkest TW 20. Полисорбат 80 известен под рядом торговых наименований, включая, в частности, Tween 80, а также Alkest TW 80. Другие подходящие полисорбаты включают полисорбат 40 и полисорбат 60.

[072] Другим подходящим классом неионных поверхностно-активных веществ являются алкилгликозиды, особенно додецилмальтозид. Другие алкилгликозиды включают додецилглюкозид, октилглюкозид, октилмальтозид, децилглюкозид, децилмальтозид, тридецилглюкозид, тридецилмальтозид, тетрадецилглюкозид, тетрадецилмальтозид, гексадецилглюкозид, гексадецилмальтозид, монооктаноат сахарозы, монодеcanoат сахарозы, монододеcanoат сахарозы, монотридеcanoат сахарозы, монотетрадеcanoат сахарозы и моногексадеcanoат сахарозы.

[073] Другим подходящим классом неионных поверхностно-активных веществ являются алкиловые эфиры полиэтиленгликоля, особенно те, которые известны под торговым наименованием Brij, например, выбранные из полиэтиленгликоль (2) гексадецилового эфира (Brij 52), полиэтиленгликоль (2) олеилового эфира (Brij 93) и полиэтиленгликоль (2) додецилового эфира (Brij L4). Другие подходящие поверхностно-активные вещества Brij включают полиэтиленгликоль (4) лауриловый эфир (Brij 30), полиэтиленгликоль (10) лауриловый эфир (Brij 35), полиэтиленгликоль (20) гексадециловый эфир (Brij 58) и полиэтиленгликоль (10) стеариловый эфир (Brij 78).

[074] Другим подходящим классом неионных поверхностно-активных веществ являются блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, также известные как полуксамеры, в частности, полуксамер 188, полуксамер 407, полуксамер 171 и полуксамер 185. Полуксамеры также известны под торговыми наименованиями Pluronic или Koliphors. Например, полуксамер 188 выпускается в продажу как Pluronic F-68.

[075] Другим подходящим классом неионных поверхностно-активных веществ являются алкилфениловые эфиры полиэтиленгликоля, в частности, 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль, также известный под торговым наименованием Triton X-100.

[076] В одном варианте осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полуксамер. В другом варианте осуществления неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, такой как полисорбат 80 или полисорбат 20. В одном варианте осуществления неионное

поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер, такой как полоксамер 188. Концентрация неионного поверхностно-активного вещества в композиции, как правило, находится в диапазоне 10-2000 мкг/мл. Иллюстративные концентрации, например для поверхностно-активных веществ-полисорбатов, составляют 50-1000 мкг/мл, например, 100-500 мкг/мл, например, приблизительно 200 мкг/мл. Иллюстративные концентрации, например, для поверхностно-активных веществ-полоксамеров составляют 250-1500 мкг/мл, например, 750-1250 мкг/мл, например, приблизительно 1000 мкг/мл.

[077] В некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активных веществ-полоксамеров составляет 0,025%-0,15% по массе на объем (масс./об.) композиции, например, от 0,075% до 0,125% по массе на объем (масс./об.) композиции, например, приблизительно 0,1% по массе на объем (масс./об.) композиции.

[078] Композиции по изобретению, кроме того, могут содержать консервант, такой как фенольный или бензильный консервант. Консервант в подходящем случае выбран из группы, состоящей из фенола, м-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, пропилпарабена и метилпарабена, в частности, фенола, м-крезола и бензилового спирта. Концентрация консерванта составляет, как правило, 10-100 мМ, например 20-80 мМ, например, 25-50 мМ. Оптимальную концентрацию консерванта в композиции выбирают так, чтобы гарантировать, что композиция пройдет тест противомикробной композиции фармакопеи (USP <51>, Vol. 32).

[079] Авторы настоящего изобретения полагают, что присутствие ионов имеет негативное влияние на стабильность сконструированного димерного белка по изобретению. Таким образом, ионная сила композиции должна быть ограничена настолько, насколько это возможно.

[080] Общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка по изобретению составляет менее 30 мМ, в подходящем случае менее 25 мМ, в подходящем случае менее 20 мМ, в подходящем случае менее 15 мМ, в подходящем случае менее 10 мМ, например, менее 5 мМ. Термин "общая ионная сила" используют в настоящем описании в качестве следующей функции концентрации всех ионов в растворе:

$$I = \sum_{x=1}^n c_x z_x^2 / 2$$

где c_x представляет собой молярную концентрацию иона x (моль $л^{-1}$), z_x представляет собой суммарный заряд иона c_x . Данная сумма охватывает все ионы (n), присутствующие в растворе, за исключением вклада сконструированного димерного белка по изобретению. Будет понятно, что необязательные нейтральные аминокислоты имеют суммарный заряд, равный нулю, в композициях по изобретению и, таким образом, не вносят вклад в общую ионную силу. В любом случае вклад каких-либо нейтральных аминокислот не учитывается.

[081] pH композиции составляет от 6,0 до 8,0, как например, от 6,8 до 7,8, например, от 7,0 до 7,8, от 7,1 до 7,6, от 7,1 до 7,5, от 7,2 до 7,5, от 7,1 до 7,4, от 7,2 до 7,3;

или составляет приблизительно 7,2 или приблизительно 7,3.

[082] В определенных вариантах осуществления сконструированный димерный белок по изобретению является по существу чистым, т.е. композиция содержит один белок и не содержит существенного количества какого-либо дополнительного белка. В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный димерный белок по изобретению содержит по меньшей мере 99%, предпочтительно по меньшей мере 99,5% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99,9% от общего содержания белка в композиции. В предпочтительных вариантах осуществления сконструированный димерный белок по изобретению является достаточно чистым для применения в фармацевтической композиции.

[083] Сконструированный димерный белок по изобретению в подходящем случае присутствует в композиции в концентрации приблизительно 1-400 мг/мл, в подходящем случае 10-200 мг/мл, в более подходящем случае 20-100 мг/мл, например, 30-60 мг/мл, например, приблизительно 35 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл.

[084] В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции водного раствора с рН в диапазоне от 6,8 до 7,8, например, от 7,0 до 7,8, например, от 7,1 до 7,6, например, от 7,1 до 7,5, например, приблизительно 7,2 или приблизительно 7,3, содержащей сконструированный димерный белок, где каждый мономер димерного белка содержит по меньшей мере один полипептид серпина человека, функционально связанный с полипептидом Fc иммуноглобулина человека или полипептидом, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина; буфер, выбранный из фосфата (например, фосфат натрия) или TRIS, например TRIS; нейтральную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина, метионина и пролина, например, глицина и метионина или пролина и метионина; и незаряженный модификатор тоничности, например, дисахарид, например, трегалозу, сахарозу или смесь трегалозы и сахарозы; неионное поверхностно-активное вещество, выбранное из полисорбата и поллоксамера, например, поллоксамера, такого как поллоксамер 188; где буферы присутствуют в композиции в общей концентрации 1-8 мМ, например, 2-6 мМ; и где общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 20 мМ, например, менее 10 мМ, например, менее 5 мМ.

[085] В подходящем случае, композиция по изобретению остается в качестве прозрачного раствора после хранения при 2-8°C в течение длительного периода времени, такого как по меньшей мере 4 недели, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

[086] В подходящем случае, композиция по изобретению остается в качестве прозрачного раствора после хранения при 25°C в течение длительного периода времени, такого как по меньшей мере 4 недели, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца.

[087] В подходящем случае, композиция по изобретению остается в качестве прозрачного раствора после хранения при 30°C в течение длительного периода времени,

такого как по меньшей мере 4 недели, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца.

[088] В подходящем случае, композиция по изобретению остается в качестве прозрачного раствора после хранения при 40°C (т.е. температура, подходящая для ускоренного испытания стабильности) в течение некоторого периода времени, такого как по меньшей мере 1 сутки, 3 суток, 1 неделя, 2 недели или 4 недели.

[089] В подходящем случае, композиция по изобретению имеет увеличенную стабильность при хранении либо при 2-8°C, либо при увеличенной температуре по сравнению с эквивалентной композицией, которая содержит более высокую концентрацию того же буфера или буферов.

[090] В подходящем случае, композиция по изобретению имеет увеличенную стабильность при хранении либо при 2-8°C, либо при повышенной температуре по сравнению с эквивалентной композицией, которая имеет более высокую общую ионную силу.

[091] В одном варианте осуществления композиция по изобретению содержит не более 8% высокомолекулярных структур, как например, не более 7%, как например, не более 6%, как например, не более 5%, как например, не более 2%, как например, не более 1%, как например, не более 0,5%, как например, не более 0,3% высокомолекулярных структур (относительно общей массы сконструированного димерного белка по изобретению в композиции при определении посредством эксклюзионной хроматографии или сходного подходящего способа) после хранения при 2-8°C в течение по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

[092] В одном варианте осуществления композиция по изобретению содержит не более 18% высокомолекулярных структур, как например, не более 17%, как например, не более 16%, как например, не более 15%, как например, не более 10%, как например, не более 8%, как например, не более 5%, как например, не более 4%, как например, не более 3%, как например, не более 1% высокомолекулярных структур (относительно общей массы сконструированного димерного белка по изобретению в композиции при определении посредством эксклюзионной хроматографии или сходного подходящего способа) после хранения при 25°C в течение по меньшей мере 4 недель, 8 недель, 12 недель, 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяцев.

[093] В одном варианте осуществления композиция по изобретению содержит не более 25% высокомолекулярных структур, как например, не более 20%, как например, не более 18%, как например, не более 17%, как например, не более 16%, как например, не более 15%, как например, не более 10%, как например, не более 8%, как например, не более 5%, как например, не более 4%, как например, не более 3%, как например, не более 1% высокомолекулярных структур (относительно общей массы сконструированного димерного белка по изобретению в композиции при определении посредством эксклюзионной хроматографии или сходного подходящего способа) после хранения при 30°C в течение по меньшей мере 4 недель.

[094] В одном варианте осуществления композиция по изобретению содержит не более 30% высокомолекулярных структур, как например, не более 25%, как например, не более 20%, как например, не более 18%, как например, не более 17%, как например, не более 16%, как например, не более 15%, не более 10%, как например, не более 8%, как например, не более 6%, как например, не более 4% высокомолекулярных структур (относительно общей массы сконструированного димерного белка по изобретению в композиции при определении посредством эксклюзионной хроматографии или сходного подходящего способа) после хранения при 40°C в течение по меньшей мере 1 суток, 3 суток, 1 недели, 2 недель или 4 недель.

[095] Как используют в рамках изобретения, высокомолекулярные структуры представляют собой структуры, которые являются результатом агрегации белка, с кажущейся молекулярной массой, превышающей молекулярную массу димерного белка.

[096] В одном варианте осуществления композиция по изобретению представляет собой композицию для применения в терапии. В одном варианте осуществления композиция по изобретению представляет собой фармацевтическую композицию.

[097] В одном варианте осуществления предусматривается способ ингибирования или подавления аберрантной экспрессии или активности сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления аберрантная экспрессия или активность сериновой протеазы ассоциирована с воспалительным заболеванием или нарушением, или риском инфекции. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание или нарушение выбрано из следующих: дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТ), эмфизема, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), аллергическая астма, кистозный фиброз, злокачественные опухоли легких, повреждение при ишемии-реперфузии, повреждение при ишемии/реперфузии после трансплантации сердца, инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, септический артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, диабет типа I и/или типа II, пневмония, сепсис, реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), заживление ран, системная красная волчанка и рассеянный склероз.

[098] В одном варианте осуществления риск инфекции представляет собой риск инфекции, выбранной из бактериальных инфекций, грибковых инфекций и вирусных инфекций.

[099] В одном варианте осуществления предусматривается способ лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, как описано в настоящем описании. В другом варианте осуществления предусматривается способ лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном снижении риска

инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, как описано в настоящем описании. В другом варианте осуществления предусматривается способ уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, как описано в настоящем описании.

[100] В одном варианте осуществления, когда полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, предусматривается способ лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора, как описано в настоящем описании.

[101] В одном варианте осуществления предусматривается композиция водного раствора, как описано в настоящем описании, для применения в способе лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления предусматривается композиция водного раствора, как описано в настоящем описании, для применения в способе лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном уменьшении риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления предусматривается композиция водного раствора, как описано в настоящем описании, для применения в способе уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

[102] В одном варианте осуществления, когда полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, предусматривается композиция водного раствора, как описано в настоящем описании, для применения в способе лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом.

[103] В одном варианте осуществления предусматривается применение композиции водного раствора, как описано в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления предусматривается применение композиции водного раствора, как описано в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном снижении риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления предусматривается применение композиции водного раствора, как описано в настоящем описании, для производства лекарственного средства для снижения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

[104] В одном варианте осуществления, когда полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, предусматривается применение композиции водного раствора, как описано в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом.

[105] В подходящем случае, индивидуумом является человек.

[106] В подходящем случае, воспалительное заболевание или нарушение выбрано из следующих: дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТ), эмфизема, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), аллергическая астма, кистозный фиброз, злокачественные опухоли легких, повреждение при ишемии-реперфузии, повреждение при ишемии/реперфузии после трансплантации сердца, инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, септический артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, диабет типа I и/или типа II, пневмония, сепсис, реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), заживление ран, системная красная волчанка и рассеянный склероз.

[107] В подходящем случае, инфекция выбрана из бактериальных инфекций, грибковых инфекций и вирусных инфекций.

[108] Композиции, например, композиции, предназначенные для внутривенного введения, можно получать в качестве концентратов для разбавления перед введением.

[109] Все варианты осуществления, описанные выше в отношении композиции водного раствора, применимы в равной степени к способам и применениям по изобретению.

[110] Также предусматривается контейнер, например, изготовленный из пластмассы или стекла, содержащий одну дозу или множество доз композиции, как описано в настоящем описании. Контейнер может представлять собой, например, флакон, предварительно заполненный шприц, предварительно заполненный пакет для инфузий или кассету, предназначенную для того, чтобы быть сменным элементом для применения в устройстве для инъекций.

[111] Композиции по изобретению в подходящем случае могут быть упакованы для инфузии или инъекции, особенно внутривенной инфузии, внутривенной инъекции, подкожной инъекции или внутримышечной инъекции.

[112] Композиции по изобретению в подходящем случае могут быть упакованы во флакон в качестве концентрата для внутривенной инфузии. Перед применением концентрат извлекают из флакона и разбавляют в инфузионном пакете, содержащем подходящий разбавитель, такой как солевой раствор, раствор декстрозы или вода для инъекций. Затем разбавленную композицию вводят посредством внутривенной инфузии с определенной скоростью инфузии (например, 8-16 мл/мин).

[113] Один из аспектов изобретения относится к устройству для инъекций или инфузий, в частности, устройству, адаптированному для подкожной или внутримышечной

инъекции или инфузии, для однократного или многократного применения, включающему контейнер, содержащий одну или множество доз композиции по изобретению, вместе с иглой для инъекций. В одном варианте осуществления контейнер представляет собой сменную кассету, которая содержит множество доз. В одном варианте осуществления устройство для инъекций имеет форму ручки. В одном варианте осуществления устройство для инъекций имеет форму предварительно заполненного шприца. В одном варианте осуществления устройство для инъекций или инфузий имеет форму насоса или другого носимого устройства для инъекций или инфузий.

[114] Ожидается, что композиции по изобретению будут иметь хорошую физическую и химическую стабильность, как описано в настоящем описании.

[115] Описание списка последовательностей

[116] SEQ ID NO: 1 представляет собой полноразмерную последовательность полипептида ААТ человека.

[117] SEQ ID NO: 2 представляет собой полноразмерную последовательность полипептида ААТ человека.

[118] SEQ ID NO: 3 представляет собой часть петли реакционного центра белка ААТ.

[119] SEQ ID NO: 4 представляет собой часть петли реакционного центра белка ААТ.

[120] SEQ ID NO: 5 представляет собой часть петли реакционного центра белка ААТ.

[121] SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность полипептида Fc IgG1 человека.

[122] SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность полипептида Fc IgG1 человека, включающего шарнирную область на N-конце.

[123] SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 с мутациями остатков M252, T256 и M428.

[124] SEQ ID NO: 9 представляет собой модифицированную последовательность полипептида Fc IgG1, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков M252, T256 и M428.

[125] SEQ ID NO: 10 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1, где остаток G236 делетирован.

[126] SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1, включающего шарнирную область на N-конце, где остаток G236 делетирован.

[127] SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 с мутациями остатков L234 и L235.

[128] SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков L234 и L235.

[129] SEQ ID NO: 14 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 с делецией остатка G236 и мутациями остатков L234 и L235.

[130] SEQ ID NO: 15 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1, включающего шарнирную область на N-конце, с делецией остатка G236 и мутациями остатков L234 и L235.

[131] SEQ ID NO: 16 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 с делецией остатка G236 и мутациями остатков L234, L235, M252, T256 и M428.

[132] SEQ ID NO: 17 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1, включающего шарнирную область на N-конце, с делецией остатка G236 и мутациями остатков L234, L235, M252, T256 и M428.

[133] SEQ ID NO: 18 представляет собой последовательность полипептида Fc IgG2 человека.

[134] SEQ ID NO: 19 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG2 с делецией остатка G236 и мутациями остатков M252, T256 и M428.

[135] SEQ ID NO: 20 представляет собой последовательность полипептида Fc IgG3 человека.

[136] SEQ ID NO: 21 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 с мутациями остатков M252, T256 и M428.

[137] SEQ ID NO: 22 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 с делецией остатка G236.

[138] SEQ ID NO: 23 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 с мутациями остатков L234 и L235.

[139] SEQ ID NO: 24 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 с делецией остатка G236 и мутациями остатков L234 и L235.

[140] SEQ ID NO: 25 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 с делецией остатка G236 и мутациями остатков L234, L235, M252, T256 и M428.

[141] SEQ ID NO: 26 представляет собой последовательность полипептида Fc IgG4 человека.

[142] SEQ ID NO: 27 представляет собой последовательность полипептида Fc IgG4 человека, включающего шарнирную область на N-конце.

[143] SEQ ID NO: 28 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 с мутациями остатков M252, T256 и M428.

[144] SEQ ID NO: 29 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков M252, T256 и M428.

[145] SEQ ID NO: 30 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 с делецией остатка G236.

[146] SEQ ID NO: 31 представляет собой последовательность модифицированного

полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с делецией остатка G236.

[147] SEQ ID NO: 32 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 с мутацией остатка L235.

[148] SEQ ID NO: 33 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутацией остатка L235.

[149] SEQ ID NO: 34 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 с мутациями остатков L234 и L235.

[150] SEQ ID NO: 35 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков L234 и L235.

[151] SEQ ID NO: 36 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 с мутацией остатка S228.

[152] SEQ ID NO: 37 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков S228 и L235.

[153] SEQ ID NO: 38 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков S228, L235 и M252.

[001] SEQ ID NO: 39 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков S228, L235 и M428.

[002] SEQ ID NO: 40 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков S228, L235, M252 и M428.

[003] SEQ ID NO: 41 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 с мутациями остатков L235, M252, T256 и M428.

[004] SEQ ID NO: 42 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков L235, M252, T256 и M428.

[005] SEQ ID NO: 43 представляет собой последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4, включающего шарнирную область на N-конце, с мутациями остатков S228, L235, M252, T256 и M428.

[006] SEQ ID NO: 44 представляет собой полипептид Fc IgM человека.

[007] SEQ ID NO: 45 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6.

[008] SEQ ID NO: 46 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 18.

[009] SEQ ID NO: 47 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-

полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 6.

[010] SEQ ID NO: 48 представляет собой полипептид ААТ.

[011] SEQ ID NO: 49 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 18.

[012] SEQ ID NO: 50 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 18

[013] SEQ ID NO: 51 представляет собой полипептид ААТ.

[014] SEQ ID NO: 52 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 6.

[015] SEQ ID NO: 53 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 17.

[016] SEQ ID NO: 54 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 43.

[017] SEQ ID NO: 55 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG, включающий SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 7.

[154] SEQ ID NO: 56 представляет собой слитый белок полипептид ААТ-полипептид Fc IgG₄, включающий SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 40.

[155] Каждый мономер сконструированного димерного белка по изобретению содержит по меньшей мере один полипептид серпина человека (например, один или два), функционально связанный с полипептидом Fc иммуноглобулина человека или полипептидом, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина.

[156] Как используют в рамках изобретения, "функционально связанный" означает соединенный в качестве части непрерывной полипептидной цепи, т.е. в качестве слитого белка. Такие сконструированные белки могут быть получены способами рекомбинантной инженерии. Как используют в рамках изобретения, "функционально связанный" также означает, что по меньшей мере один полипептид серпина человека в слитой конструкции с полипептидом Fc иммуноглобулина является функциональным с точки зрения ингибирования активности сериновой протеазы.

[157] В одном варианте осуществления полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

[158] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка содержит один полипептид серпина человека.

[159] В одном варианте осуществления каждый мономер сконструированного димерного белка содержит по меньшей мере один (например, один) полипептид, выбранный из полипептида альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека и полипептидов, которые происходят из полипептида ААТ человека, где указанный по меньшей мере один полипептид функционально связан(ы) с N-концом полипептида Fc иммуноглобулина человека или полипептида, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина.

[160] Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой

полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или 2.

[161] Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой альфа-1 антитрипсин (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, имеет последовательность SEQ ID NO: 1. Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой альфа-1 антитрипсин (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[162] В некоторых вариантах осуществления полноразмерная последовательность полипептида ААТ человека имеет следующую аминокислотную последовательность:

```

1  EDPQGDAQK  TDTSHHQDN  PTFNKITPNL  AEFAFSLYRQ  LAHQSNSTNI
FFSPVSIATA
61  FAMLSLGTKA  DTHDEILEGL  NFNLTEIPEA  QIHEGFQELL  RTLNQPDSQL
QLTTGNLFL
121 SEGLKLVDFK  LEDVKKLYHS  EAFTVNFGDT  EEAKKQINDY  VEKGTQGKIV
DLVKELDRDT
181 VFALVNYIFF  KGKWERPFEV  KDTEEEDFHV  DQVTTVKVPM  MKRLGMFNIQ
HCKKLSSWVL
241 LMKYLGNATA  IFFLPDEGKL  QHLENELTHD  IITKFLNED  RRSASLHLPK
LSITGTYDLK
301 SVLGQLGITK  VFSNGADLSG  VTEEAPLKLS  KAVHKAVLTI  DEKGTEAAGA
MFLEAIPMSI
361 PPEVKFNKPF  VFLMIEQNTK  SPLFMGKVVN  PTQK (SEQ ID NO: 1)

```

[163] Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой альфа-1 антитрипсин (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, имеет последовательность SEQ ID NO: 2. Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой альфа-1 антитрипсин (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

[164] В некоторых вариантах осуществления полноразмерная последовательность полипептида ААТ человека имеет следующую аминокислотную последовательность:

```

1  EDPQGDAQK  TDTSHHQDN  PTFNKITPNL  AEFAFSLYRQ  LAHQSNSTNI
FFSPVSIATA
61  FAMLSLGTKA  DTHDEILEGL  NFNLTEIPEA  QIHEGFQELL  RTLNQPDSQL
QLTTGNLFL
121 SEGLKLVDFK  LEDVKKLYHS  EAFTVNFGDT  EEAKKQINDY  VEKGTQGKIV
DLVKELDRDT
181 VFALVNYIFF  KGKWERPFEV  KDTEEEDFHV  DQVTTVKVPM  MKRLGMFNIQ

```

HCKKLSSWVL

241 LMKYLGNATA IFFLPDEGKL QHLENELTHD IITKFLENED RRSASLHLPK
LSITGTYDLK

301 SVLGQLGITK VFSNGADLSG VTEEAPLKLS KAVHKAVLTI DEKGTEAAGA
EFLAIPLSI

361 PPEVKFNKPF VFLMIEQNTK SPLFMGKVVN PTQK (SEQ ID NO: 2).

[165] Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой альфа-1 антитрипсин (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека последовательности, имеет последовательность, представленную под номерами доступа GenBank № AAB59495.1, CAJ15161.1, P01009.3, AAB59375.1, AAA51546.1, CAA25838.1, NP_001002235.1, CAA34982.1, NP_001002236.1, NP_000286.3, NP_001121179.1, NP_001121178.1, NP_001121177.1, NP_001121176.16, NP_001121175.1, NP_001121174.1, NP_001121172.1 и/или AAA51547.1.

[166] Например, полипептид или каждый полипептид, который представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека, содержит последовательность реакционной петли в соответствии с любой из последовательностей SEQ ID NO: 3, 4 и 5.

[167] В некоторых вариантах осуществления часть петли реакционного центра белка ААТ включает по меньшей мере аминокислотную последовательность: GTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNK (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления часть петли реакционного центра белка ААТ включает по меньшей мере аминокислотную последовательность: GTEAAGAEFLEAIPLSIPPEVKFNK (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления часть петли реакционного центра белка ААТ включает по меньшей мере аминокислотную последовательность: GTEAAGALFLEAIPLSIPPEVKFNK (SEQ ID NO: 5).

[168] В одном варианте осуществления полипептид содержит полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, который представляет собой полипептид Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность полипептида Fc IgG1 человека имеет следующую аминокислотную последовательность:

1 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK

61 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
GQPREPQVYT

121 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSKL

181 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 6)

[169] В некоторых вариантах осуществления полипептид включает шарнирную область, присоединенную к N-концу полипептида Fc в полипептиде, где полипептид Fc включает последовательность полипептида Fc IgG1 человека, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

1 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD
61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
121 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID
NO: 7).

[170] В некоторых вариантах осуществления, где полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc полипептида включает последовательность полипептида Fc IgG1 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7.

[171] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG1, причем модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает мутации остатков M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 22, 26 и 198 SEQ ID NO: 6 или остаткам 32, 36 и 208 SEQ ID NO: 7, представленным выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APELLGGPSV FLFPPKPKDT L[□]ISR[□]PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK
61 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
GQPREPQVYT
121 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSKL
181 TVDKSRWQQG NVFSCSV[□]HE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

[172] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает мутации остатков M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 22, 26 и 198 SEQ ID NO: 6 или остаткам 32, 36 и 208 SEQ ID NO: 7, показанным выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT L[□]ISR[□]PEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD
61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK
121 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV[□]HE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID

NO: 9)

[173] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 человека, где остаток G236, который соответствует остатку 6 SEQ ID NO: 6 или остатку 16 SEQ ID NO: 7, как указано выше, делегирован и имеет следующую аминокислотную последовательность:

1 APELLGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

61 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL

121 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDS
GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 10).

[174] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 человека, где остаток G236, который соответствует остатку 6 SEQ ID NO: 6 или остатку 16 SEQ ID NO: 7, как указано выше, делегирован, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность:

1 DKTHTCPPCP APELLGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVKFNWYVDG

61 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP
IEKTISKAKG

121 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
KTTPPVLDS

181 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID
NO: 11).

[175] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG1, где модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает мутации остатков L234 и L235, которые соответствуют остаткам 4 и 5 SEQ ID NO: 6 или остаткам 14 и 15 SEQ ID NO: 7, как указано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APE[V]AGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK

61 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
GQPREPQVYT

121 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

DGSFFLYSKL

181 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 12)

[176] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 полипептида включает мутации остатков L234 и L235, которые соответствуют остаткам 4 и 5 SEQ ID NO: 6 или остаткам 14 и 15 SEQ ID NO: 7, указанных выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 DKTHTCPPCP APEVAAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD

61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
IEKTISKAK

121 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS

181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID
NO: 13).

[177] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков L234 и L235, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APEVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

61 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL

121 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 14).

[178] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков L234 и L235, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 DKTHTCPPCP APEVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVKFNWYVDG

61 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
IEKTISKAKG

121 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
KTTTPVLDS

181 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 15).

[179] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков L234, L235, M252, T256, и M428, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APEVAGPSVF LFPPKPKDTL IISRDPPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

61 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL

121 PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD
GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN VFSCSVLHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 16).

[180] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, соединенную с N-концом модифицированного полипептида Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков L234, L235, M252, T256 и M428, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 DKTHTCPPCP APEVAGPSVF LFPPKPKDTL IISRDPPEVTC VVVDVSHEDP
EVKFNWYVDG

61 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP
IEKTISKAKG

121 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
KTTPPVLDSD

181 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVLHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO:
17).

[181] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG1, модифицированный полипептид Fc IgG1 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG1 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

[182] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgG2 человека, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

1 APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG
VEVHNAKTKP

61 REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVS NKGLPAP IEKTISKTKG
QPREPQVYTL

121 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD
GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 18).

[183] В некоторых вариантах осуществления, где слитый белок по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgG2 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18.

[184] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG2, модифицированный полипептид Fc IgG2 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков M252, T256 и M428, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APPVAGPSVF LFPPKPKDTL IISRDPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG
VEVHNAKTKP

61 REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG
QPREPQVYTL

121 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPMLDSD
GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN VFSCSVIHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 19).

[185] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgG3 человека, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

1 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
GVEVHNAKTK

61 PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK
GQPREPQVYT

121 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS
DGSFFLYSKL

181 TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 20).

[186] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgG3 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

[187] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG3, модифицированный полипептид Fc IgG3 слитого белка включает мутации остатков M252, T256 и M428, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APELLGGPSV FLFPPKPKDT L¹ISRD¹PEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 GVEVHNAKTK
 61 PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK
 GQPREPQVYT
 121 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS
 DGSFFLYSKL
 181 TVDKSRWQQG NIFSCSV¹HE ALHNRFTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 21).

[188] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG3, модифицированный полипептид Fc IgG3 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 человека, где остаток G236, который соответствует остатку 6 SEQ ID NO: 20, как указано выше, делегирован, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

1 APELLGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFKWYVDG
 VEVHNAKTKP
 61 REEQYNSTFR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKTKG
 QPREPQVYTL
 121 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESSGQPENNY NTPMLDSD
 GSFFLYSKLT
 181 VDKSRWQQGN IFSCSVMHEA LHNRFQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 22).

[189] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG3, модифицированный полипептид Fc IgG3 слитого белка включает мутации остатков L234 и L235, которые соответствуют остаткам 4 и 5 SEQ ID NO: 20, как указано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APE¹VA¹GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 GVEVHNAKTK
 61 PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK
 GQPREPQVYT
 121 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS
 DGSFFLYSKL
 181 TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 23).

[190] В некоторых вариантах осуществления, где слитый белок по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG3, модифицированный полипептид Fc IgG3 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков L234 и L235 и имеет следующую аминокислотную последовательность:

1 APE¹VA¹GPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFKWYVDG
 VEVHNAKTKP
 61 REEQYNSTFR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKTKG
 QPREPQVYTL
 121 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESSGQPENNY NTPMLDSD

GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN IFSCSVMHEA LHNRFQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 24).

[191] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG3, модифицированный полипептид Fc IgG3 слитого белка включает делецию остатка G236 и мутации остатков L234, L235, M252, T256 и M428, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

1 APEVAGPSVF LFPPKPKDTL ISRDPEVTC VVVDVSHEDP EVQFKWYVDG
VEVHNAKTKP

61 REEQYNSTFR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKTKG
QPREPQVYTL

121 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESSGQPENNY NTPPMLDSD
GSFFLYSKLT

181 VDKSRWQQGN IFSCSVIHEA LHNRFQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 25).

[192] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG3, модифицированный полипептид Fc IgG3 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG3 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24 или 25.

[193] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgG4 человека, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

1 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK

61 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
GQPREPQVYT

121 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD
DGSFFLYSRL

181 TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 26).

[194] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает шарнирную область, присоединенную к N-концу Fc-полипептида слитого белка, где полипептид Fc включает последовательность полипептида Fc IgG4 человека, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTPPVLD

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 27).

[195] В некоторых вариантах осуществления, где слитый белок по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgG4 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26 или 27.

[196] В некоторых вариантах осуществления, где слитый белок по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 22, 26 и 19 SEQ ID NO: 26 или остаткам 34, 38 и 210 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

```

1  APEFLGGPSV  FLFPPKPKDT  LISRPEVT  CVVVDVSQED  PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK
61  PREEQFNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKGLPS  SIEKTISKAK
GQPREPQVYT
121 LPPSQEEMTK  NQVSLTCLVK  GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTPPVLDS
DGSFFLYSRL
181 TVDKSRWQEG NVFSCSVHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 28).
```

[197] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 22, 26 и 197 SEQ ID NO: 26 или остаткам 34, 38 и 210 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

```

1  ESKYGPPCPS  CPAPEFLGGP  SVFLFPPKPK  DTLISRPE  VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY
61  VDGVEVHNAK  TKPREEQFNS  TYRVVSVLTV  LHQDWLNGKE  YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK
121 AKGQPREPQV  YTLPPSQEEM  TKNQVSLTCL  VKGFYPSDIA  VEWESNGQPE
NNYKTPPVL
181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVHEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID
NO: 29).
```

[198] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 человека, где остаток G236, который соответствует остатку 6 SEQ ID NO: 26 или остатку 19 SEQ ID NO: 27, как показано выше, делетирован, и имеет следующую аминокислотную

последовательность:

1 APEFLGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSDQEDP EVQFNWYVDG
VEVHNAKTKP
61 REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKGLPSS IEKTISKAKG
QPREPQVYTL
121 PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
GSFFLYSRLT
181 VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGK (SEQ ID NO: 30)

[199] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 человека, где остаток G236, который соответствует остатку 6 SEQ ID NO: 26 или остатку 19 SEQ ID NO: 27, как показано выше, делетирован, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность:

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE
DPEVQFNWYV
61 DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
SSIEKTISKA
121 KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN
NYKTTTPVLD
181 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID
NO: 31).

[200] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутацию остатка L235, который соответствует остатку 5 SEQ ID NO: 26 или остатку 17 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантный аминокислотный остаток заключен в рамку:

1 APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK
61 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
GQPREPQVYT
121 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVKG FYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSRL
181 TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LLSLGK (SEQ ID NO: 32).

[201] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутацию остатка L235, который соответствует остатку 5 SEQ ID NO: 26 или остатку 17 SEQ ID NO: 27, как

показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантный аминокислотный остаток заключен в рамку:

```

1  ESKYGPPCPS  CPAPEFEGGP  SVFLFPPKPK  DTLMISRTPE  VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY
61  VDGVEVHNAK  TKPREEQFNS  TYRVVSVLTV  LHQDWLNGKE  YKCKVSNKGL
PSSIIEKTISK
121 AKGQPREPQV  YTLPPSQEEM  TKNQVSLTCL  VKGFYPSDIA  VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL
181 DSDGSFFLYS  RLTVDKSRWQ  EGNVFSCSVM  HEALTHNHYTQ  KSLSLSLGK (SEQ
ID NO: 33).

```

[202] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков L234 и L235, которые соответствуют остаткам 4 и 5 SEQ ID NO: 26 или остаткам 16 и 17 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

```

1  APEVAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSQED  PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK
61  PREEQFNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKGLPS  SIEKTISKAK
GQPREPQVYT
121 LPPSQEEMTK  NQVSLTCLVK  GFYPSDIAVE  WESNGQPENN  YKTTTPVLDS
DGSFFLYSRL
181 TVDKSRWQEG  NVFSCSVMHE  ALHNHYTQKS  LSLSLGK (SEQ ID NO: 34).

```

[203] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков L234 и L235, которые соответствуют остаткам 4 и 5 SEQ ID NO: 26 или остаткам 16 и 17 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

```

1  ESKYGPPCPS  CPAPEVAGGP  SVFLFPPKPK  DTLMISRTPE  VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY
61  VDGVEVHNAK  TKPREEQFNS  TYRVVSVLTV  LHQDWLNGKE  YKCKVSNKGL
PSSIIEKTISK
121 AKGQPREPQV  YTLPPSQEEM  TKNQVSLTCL  VKGFYPSDIA  VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL
181 DSDGSFFLYS  RLTVDKSRWQ  EGNVFSCSVM  HEALTHNHYTQ  KSLSLSLGK (SEQ
ID NO: 35).

```

[204] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4

слитого белка включает мутацию остатка S228, который соответствует остатку 10 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантный аминокислотный остаток заключен в рамку:

1 ESKYGPPCP^P CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ
ID NO: 36)

[205] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков S228 и L235, которые соответствуют остаткам 10 и 17 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 ESKYGPPCP^P CPAPEF^EGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ
ID NO: 37).

[206] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков S228, L235 и M252, которые соответствуют остаткам 10, 17 и 34 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 ESKYGPPCP^P CPAPEF^EGGP SVFLFPPKPK DTL^YISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ
ID NO: 38).

[207] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает

шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков S228, L235 и M428, которые соответствуют остаткам 10, 17 и 34 SEQ ID NO: 27, как показано выше, слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 ESKYGPPCP^P CPAPEF^EGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
YKCKVSNKGL PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSV^L HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
(SEQ ID NO: 39).

[208] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков S228, L235, M252 и M428 которые соответствуют остаткам 10, 17, 34 и 210 SEQ ID NO: 27, как показано выше, слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 ESKYGPPCP^P CPAPEF^EGGP SVFLFPPKPK DTL^YISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSV^L HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID
NO: 40).

[209] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков L235, M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 5, 22, 26 и 197 SEQ ID NO: 26 или остаткам 17, 34, 38 и 210 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и имеет следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 APEF^EGGPSV FLFPPKPKDT L^IISR^DPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK

61 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
GQPREPQVYT

121 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSRL

181 TVDKSRWQEG NVFSCSV[]HE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 41).

[210] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков L235, M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 5, 22, 26 и 197 SEQ ID NO: 26 или остаткам 17, 34, 38 и 210 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 ESKYGPPCPS CPAPEF[]GGP SVFLFPPKPK DTL[]ISR[]PE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCSCSV[]HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID
NO: 42).

[211] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает шарнирную область, присоединенную к N-концу модифицированного полипептида Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает мутации остатков S228, L235, M252, T256 и M428, которые соответствуют остаткам 10, 17, 34, 38 и 210 SEQ ID NO: 27, как показано выше, и слитый белок включает по меньшей мере следующую аминокислотную последовательность, где мутантные аминокислотные остатки заключены в рамку:

1 ESKYGPPCP[] CPAPEF[]GGP SVFLFPPKPK DTL[]ISR[]PE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY

61 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
PSSIEKTISK

121 AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVL

181 DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCSCSV[]HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID
NO: 43).

[212] В некоторых вариантах осуществления, где слитый белок по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4, модифицированный полипептид Fc IgG4 слитого белка включает последовательность модифицированного полипептида Fc IgG4 человека, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 или 43.

[213] Например, полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, представляет собой

модифицированный полипептид Fc IgG4 человека, который имеет последовательность SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 или 43.

[214] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, который происходит из модифицированного полипептида Fc IgG4 человека, где модифицированный полипептид Fc IgG4 человека содержит мутации в положениях S228, L235, M252, T256 и M428.

[215] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает модифицированный полипептид Fc IgG4 человека, где модифицированный полипептид Fc IgG4 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, 36 или 37, где модифицированный полипептид Fc IgG4 человека содержит мутацию в положении M252 (остаток 34 SEQ ID NO: 27) и/или в положении M428 (остаток 210 SEQ ID NO: 27).

[216] В одном варианте осуществления модифицированный полипептид Fc IgG4 человека дополнительно содержит мутации в положении T256 (остаток 38 SEQ ID NO: 27).

[217] В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению включает полипептид Fc, полипептид Fc слитого белка включает последовательность полипептида Fc IgM человека, имеющую следующую аминокислотную последовательность:

1 IAELPPKVSF FVPPRDGFFG NPRKSKLICQ ATGFSPRQIQ VSWLREGKQV
GSGVTTDQVQ

61 AEAKESGPTT YKVTSTLTIK ESDWLGQSMF TCRVDHRGLT FQQNASSMCV
PDQDTAIRVF

121 AIPPSFASIF LTKSTKLTCV VTDLTTYDSV TISWTRQNGE AVKTHTNISE
SHPNATFSAV

181 GEASICEDDW NSGERFTCTV THTDLPSPK QTISRPKG (SEQ ID NO: 44).

[218] В одном варианте осуществления полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина представляет собой модифицированный полипептид Fc IgG4 человека.

[219] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 45. Как показано ниже, часть полипептида AAT слитого белка подчеркнута (SEQ ID NO: 1) и часть полипептида IgG-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 6).

EDPQGDAAQKTDTSNHDQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTPEAQAIEHGFQELLRTLNLQPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
LDRDRTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCK
KLSSWVLLMKYLGNAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
GTYDLKSVLGLGITKVFNSGADLSGVTEEAAPLKLKAVHKAVALTIDEKGTAAAGAMFL
EAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:45)

[220] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 46. Как показано ниже, часть полипептида ААТ слитого белка подчеркнута (SEQ ID NO: 1) и часть полипептида IgG-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 18).

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVKDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
LDRDRTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCK
KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKQLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
GTYDLKSVLGQLGITKVFVSNADLSGVTEEAAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFL
EAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKERKCCVECPPCAPPVAGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 46)

[221] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 47. Как показано ниже, часть полипептида ААТ слитого белка подчеркнута (SEQ ID NO: 48), часть полипептида IgG-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 6), и мутация Met351Glu заключена в рамку, и мутация Met358Leu выделена серым цветом.

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVKDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
LDRDRTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCK
KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKQLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
GTYDLKSVLGQLGITKVFVSNADLSGVTEEAAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAA[**E**]FL
EAIPLSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)

[222] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 49. Как показано ниже, часть полипептида ААТ слитого белка подчеркнута (SEQ ID NO: 48), часть полипептида IgG-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 18), мутация Met351Glu заключена в рамку и мутация Met358Leu выделена серым цветом.

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN

GLFLSEGLKLVKDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEA~~AKKQ~~INDYVEKGTQGKIVDLVKE
 LDRDTVFA~~LVNYIFFK~~GKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTV~~KVP~~MMKRLGMFNIQHCK
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFL~~PDEG~~KLQHLENELTHDIITK~~FLENE~~DRRSASLHLPKLSIT
 GTYDLKSVLGQLGITK~~VFS~~NGADLSGVTEEA~~PLKLS~~KA~~VHKA~~VLTIDEKGTAAAGAA~~FL~~
 EAIPLSIPPEV~~KFN~~KPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKERKCCVECPCPPAPPVAGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
 VVSVLTVVHQD~~WL~~NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCS~~
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49)

[223] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 50. Как показано ниже, часть полипептида AAT слитого белка подчеркнута (SEQ ID NO: 51), часть полипептида IgG-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 18), мутация Met351Leu выделена черным цветом и мутация Met358Leu выделена серым цветом.

EDPQGDAAQKTDTS~~HH~~DQDHPTFNKITPNLA~~EFA~~FSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
 SIATAFAMLSLGT~~KAD~~THDEILEGLN~~FN~~LTEIPEAQIHEGFQELLRTL~~NQ~~PDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVKDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEA~~AKKQ~~INDYVEKGTQGKIVDLVKE
 LDRDTVFA~~LVNYIFFK~~GKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTV~~KVP~~MMKRLGMFNIQHCK
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFL~~PDEG~~KLQHLENELTHDIITK~~FLENE~~DRRSASLHLPKLSIT
 GTYDLKSVLGQLGITK~~VFS~~NGADLSGVTEEA~~PLKLS~~KA~~VHKA~~VLTIDEKGTAAAGALFL
 EAIPLSIPPEV~~KFN~~KPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKERKCCVECPCPPAPPVAGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
 VVSVLTVVHQD~~WL~~NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~FSCS~~
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)

[224] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 52. Как показано ниже, часть полипептида AAT слитого белка подчеркнута (SEQ ID NO: 1), часть полипептида IgG-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 6).

EDPQGDAAQKTDTS~~HH~~DQDHPTFNKITPNLA~~EFA~~FSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
 SIATAFAMLSLGT~~KAD~~THDEILEGLN~~FN~~LTEIPEAQIHEGFQELLRTL~~NQ~~PDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVKDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEA~~AKKQ~~INDYVEKGTQGKIVDLVKE
 LDRDTVFA~~LVNYIFFK~~GKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTV~~KVP~~MMKRLGMFNIQHCK
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFL~~PDEG~~KLQHLENELTHDIITK~~FLENE~~DRRSASLHLPKLSIT
 GTYDLKSVLGQLGITK~~VFS~~NGADLSGVTEEA~~PLKLS~~KA~~VHKA~~VLTIDEKGTAAAGAMFL
 EAIPMSIPPEV~~KFN~~KPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV~~KFN~~WYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQD~~WL~~NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASTGSEDPQGDAAQKTDTS~~HH~~DQDHPTFNKITPNL

AEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQI
HEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTE
EAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFAVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFH
VDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENE
LTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPL
KLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGK
VVNPTQK (SEQ ID NO:52)

[225] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 53. Как показано ниже, часть полипептида ААТ слитого белка подчеркнута, а мутации Met351Glu и Met358Leu заключены в рамки (SEQ ID No: 2). Часть полипептида IgG1-Fc слитого белка с делецией Gly236 выделена курсивом (SEQ ID NO: 17), и мутации Met252Ile, Thr256Asp и Met428Leu заключены в рамки.

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
LDRDTVFAVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCK
KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
GTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAEFL
EAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKGGGGDKTHTCPPCPAPEVA
GPSVFLFPPKPKDTLIISRDPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)

[226] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 54. Как показано ниже, часть полипептида ААТ слитого белка подчеркнута, а мутации Met351Glu и Met358Leu заключены в рамки (SEQ ID No: 2). Часть полипептида IgG1-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 43), а мутации Ser228Pro, Leu235Glu, Met252Ile, Thr256Asp и Met428Leu заключены в рамки.

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
GLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
LDRDTVFAVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCK
KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
GTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAEFL
EAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKESKYGPPCPAPEFEGGP
SVFLFPPKPKDTLIISRDPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)

[227] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет

последовательность SEQ ID No: 55. Как показано ниже, часть полипептида AAT слитого белка подчеркнута, последовательность реакционной петли AAT соответствует SEQ ID NO: 51, мутация Met351Leu выделена черным цветом и мутация Met358Leu выделена серым цветом и часть полипептида IgG1-Fc слитого белка выделена курсивом (SEQ ID NO: 7).

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
 SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
 LDRDRTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMLKRLGMFNIQHCK
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKQLHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
 GTYDLKSVLGLGITKVFVSNVADLSGVTEEAAPLKLKAVHKAVALTIDEKGTAAAGALFL
 EAIPLSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55)

[228] В одном варианте осуществления каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 56. Как показано ниже, часть полипептида AAT слитого белка подчеркнута, мутация Met351Leu выделена черным цветом и мутация Met358Leu выделена серым цветом (SEQ ID No: 48), и часть полипептида IgG4-Fc слитого белка выделена курсивом с мутациями S228P, L235E, M252Y и M428L, заключенными в рамки, и линкер GS указан полужирным шрифтом (SEQ ID NO: 40).

EDPQGDAQAQKTDTSHHHQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV
 SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN
 GLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFTVNFVGDTEEAQKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE
 LDRDRTVFALVNYIFFKGGKWERPFVVDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMLKRLGMFNIQHCK
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKQLHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT
 GTYDLKSVLGLGITKVFVSNVADLSGVTEEAAPLKLKAVHKAVALTIDEKGTAAAGAEFL
 EAIPLSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK**GS**ESKYGPPCP**CP**CPAPEF**EG**
 GPSVFLFPPKPKDTL**Y**ISRTPEVTCVVVDV**SQ**EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN**S**
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY**SRL**TVDKSRWQ**EG**NVFS
 CSV**HE**ALHNHYTQKSLSL**SLG**K (SEQ ID NO: 56).

[229] В некоторых вариантах осуществления мономера димерного белка по изобретению часть полипептида IgG мономера может быть соединена с частью полипептида AAT без линкера GS. В некоторых вариантах осуществления часть полипептида IgG мономера димерного белка по изобретению может быть соединена с частью полипептида AAT посредством ковалентной связи.

[230] Мономеры димерного белка могут быть связаны друг с другом посредством дисульфидных мостиков. В частности, пара полипептидов Fc иммуноглобулина человека

или полипептидов, которые происходят из полипептида Fc иммуноглобулина, соединена таим образом, чтобы образовывался функциональный Fc-домен.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[231] В то время как изобретение описано с помощью его подробного описания, вышеуказанное описание предназначено для иллюстрации, а не ограничения, объема изобретения, которое определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем прилагаемой ниже формулы изобретения.

Примеры

[232] Основные способы

[233] Способы оценки стабильности сконструированного димерного белка

[234] а) Визуальная оценка

[235] Детекцию видимых частиц удобно проводить с использованием 2.9.20. Европейской Фармакопеи (Контаминация частицами: видимые частицы). Требуемое устройство состоит из стойки для осмотра, включающей:

- матовую черную панель соответствующего размера, удерживаемую в вертикальном положении
- безбликовую белую панель соответствующего размера, удерживаемую в вертикальном положении рядом с черной панелью
- регулируемый держатель лампы, оборудованный подходящим затененным источником белого света с подходящим светорассеивателем (является пригодным осветитель для осмотра, содержащий две флуоресцентных трубки по 13 Вт, каждая длиной 525 мм). Интенсивность освещения в точке осмотра поддерживается на уровне от 2000 люкс до 3750 люкс.

[236] Любые приклеенные ярлыки удаляют с контейнера и наружную часть моют и сушат. Контейнер осторожно вращают или переворачивают, следя за тем, чтобы пузырьки воздуха не проникли, и наблюдают в течение приблизительно 5 с перед белой панелью. Процедуру повторяют перед черной панелью. Присутствие каких-либо частиц регистрируют.

[237] Визуальные оценки ранжируют следующим образом:

Визуальная оценка 1: прозрачный раствор, свободный от видимых частиц

Визуальная оценка 2: небольшое образование частиц (вплоть до ~20 очень мелких частиц)

Визуальная оценка 3: более значительная преципитация (> 20 частиц, включая более крупные частицы)

[238] В то время как частицы в образцах с визуальным показателем 3 отчетливо поддаются обнаружению при обычной визуальной оценке при нормальном освещении, образцы с визуальной оценкой 1 и 2, как правило, имеют вид прозрачных растворов в ходе той же оценки. Образцы с визуальными показателями 1 и 2 считаются "удовлетворительными"; образцы с визуальной оценкой 3 считаются

"неудовлетворительными".

[239] (b) Эксклюзионная хроматография (SEC)

[240] *Способ 1*

[241] Количество высокомолекулярных структур определяют с использованием эксклюзионной колонки 300×7,8 мм TSK Gel G3000 SWXL (или эквивалент). Подвижная фаза представляет собой 250 мМ хлорид калия и 200 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6,2, со скоростью потока 0,5 мл/мин, объемом инжектирования 4 мкл (соответствующим 200 микрограммам белка) и детекцией при 280 нм. Время прогона составляет 30 мин. Результаты выражают в качестве % высокомолекулярных структур (HMWS), т.е. суммы всех площадей пиков, соответствующих агрегированному белку, относительно суммы всех связанных с белком пиков на хроматограмме.

[242] *Способ 2*

[243] Количество высокомолекулярных структур определяют с использованием эксклюзионной колонки 300×7,8 мм TSK Gel G3000 SWXL (или эквивалент). Подвижная фаза представляет собой 250 мМ хлорид калия и 200 мМ калий-фосфатный буфер, рН 6,2, со скоростью потока 0,5 мл/мин, объемом инжектирования 10 мкл (соответствующим 500 микрограммам белка) и детекцией при 280 нм. Время прогона составляет 30 мин. Результаты выражают в качестве % высокомолекулярных структур (HMWS), т.е. суммы всех площадей пиков, соответствующих агрегированному белку, относительно суммы всех связанных с белком пиков на хроматограмме.

[244] Для обоих способов повышение % HMWS означает изменение, наблюдаемое для % HMWS в данный момент времени по сравнению с величиной % HMWS в нулевой момент времени (т.е. непосредственно до инкубации при температуре хранения).

[245] (c) Оценка не видимых невооруженным глазом частиц (SVP)

[246] Количество не видимых невооруженным глазом частиц на контейнер в жидком образце оценивают с использованием устройства для подсчета частиц в жидкости HIAS 9703+. Чтобы система была пригодной, используют пустой набор для тестирования и набор для подсчета частиц. Образцы дегазируют в течение 10 минут при 75 торр перед измерением и тестируют без разведения. Результаты представлены в качестве среднего значения для трех измерений по 5 мл в каждом случае.

[247] Пример 1 - составы примеров

[248] Может быть получен следующий состав примера:

[249] Пример А:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 3 мМ

Трегалоза: 300 мМ

Пролин: 100 мМ

Полисорбат 20: 0,1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной

кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 2,6 мМ.

[250] Пример В:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 3 мМ

Трегалоза: 300 мМ

Метионин: 2 мМ

Полисорбат 20: 0,1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной

кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 2,6 мМ.

[251] Пример С:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 3 мМ

Трегалоза: 300 мМ

Пролин: 100 мМ

Метионин: 2 мМ

Полисорбат 20: 0,1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной

кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 2,6 мМ.

[252] Пример D:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 5 мМ

Трегалоза: 300 мМ

Пролин: 100 мМ

Полисорбат 20: 0,1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной

кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 4,3 мМ.

[253] Пример E:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 3 мМ

Трегалоза: 300 мМ

Пролин: 100 мМ

Полоксамер 188: 1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 2,6 мМ.

[254] Пример F:

[255] Пример G:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 5 мМ

Трегалоза: 150 мМ

Сахароза: 100 мМ

Пролин: 100 мМ

Полисорбат 20: 0,1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 4,3 мМ.

[256] Пример H:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 5 мМ

Трегалоза: 150 мМ

Сахароза: 100 мМ

Пролин: 100 мМ

Метионин: 2 мМ

Полоксамер 188: 1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 4,3 мМ.

[257] Пример I:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 5 мМ

Трегалоза: 150 мМ

Сахароза: 100 мМ

Глицин: 100 мМ

Метионин: 2 мМ

Полоксамер 188: 1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 4,3 мМ.

[258] Пример J:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

TRIS: 5 мМ

Трегалоза: 150 мМ

Сахароза: 100 мМ

Глицин: 100 мМ

Полоксамер 188: 1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 4,3 мМ.

[259] Пример К:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

Фосфат натрия: 5 мМ

Трегалоза: 150 мМ

Сахароза: 100 мМ

Пролин: 100 мМ

Метионин: 2 мМ

Полисорбат 20: 0,1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 11,1 мМ.

[260] Пример L:

Сконструированный димерный белок по изобретению: 50 мг/мл

Фосфат натрия: 5 мМ

Трегалоза: 150 мМ

Сахароза: 100 мМ

Пролин: 100 мМ

Метионин: 2 мМ

Полоксамер 188: 1 мг/мл

Вода для инъекций: достаточное количество

Значение рН, доведенное до 7,3 с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо гидроксида натрия

Ионная сила: 11,1 мМ.

[261] Стабильность составов может быть определена с использованием визуальной оценки и SEC (см. Основные способы) после инкубации при 40°C в течение 2, 4 и 8 недель.

[262] Стабильность составов может быть определена с использованием визуальной оценки и SEC (см. Основные способы) после инкубации при 25°C в течение 2, 4, 8, 12 и 26 недель.

[263] Стабильность составов может быть определена с использованием визуальной оценки и SEC (см. Основные способы) после инкубации при 2-8°C в течение 2, 4, 8, 12 и 26 недель.

[264] В приведенных ниже примерах использовался сконструированный димерный белок, имеющий SEQ ID NO: 56 в качестве мономерной последовательности ("БЕЛОК-1").

[265] Пример 2 - Эффект ионной силы на стабильность БЕЛКА-1 при хранении

[266] Эффект ионной силы на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) исследовали путем сравнения заряженного модификатора тоничности (хлорид натрия, 150 мМ) с незаряженным модификатором тоничности (глицерин, 300 мМ).

[267] Все составы содержали полисорбат 20 (0,1 мг/мл) и либо TRIS (2 мМ), либо фосфат натрия (2 мМ), в качестве буфера. Составы, содержавшие TRIS, доводили до pH 8,0, и составы, содержавшие фосфат натрия, доводили до pH 7,0. В таблице 1 обобщенно представлены протестированные составы.

Таблица 1: Протестированные составы БЕЛКА-1. Все составы содержали БЕЛОК-1 (50 мг/мл) и полисорбат 20 (0,1 мг/мл).

Состав	TRIS (мМ)	Фосфат натрия (мМ)	Хлорид натрия (мМ)	Глицерин (мМ)	pH	Ионная сила* (мМ)
1-01	-	2	150	-	7,0	153,8
1-02	2	-	150	-	8,0	151,1
1-03	-	2	-	300	7,0	3,8
1-04	2	-	-	300	8,0	1,1

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[268] Все составы хранили при 25°C в течение 7 недель. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (способ 1), и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[269] Уровень образования HMWS в составах с 1-01 по 1-04 представлен в таблице 2, где можно видеть, что уровень образования HMWS был наиболее низким в составах с низкой ионной силой, содержавших незаряженный модификатор тоничности глицерин (сравнить состав 1-01 с 1-03 и сравнить состав 1-02 с 1-04). Было обнаружено, что уровень образования HMWS был более высоким в составах при pH 7,0 с использованием натрий-фосфатного буфера по сравнению с эквивалентным составом при pH 8,0 с использованием TRIS-буфера (сравнить состав 1-01 с 1-02, и сравнить состав 1-03 с 1-04).

Таблица 2: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C в течение 7 недель в составах с 1-01 по 1-04, оцененная посредством SEC (способ 1).

Состав	Повышение % HMWS
1-01	3,77

Состав	Повышение % HMWS
1-02	3,65
1-03	1,70
1-04	1,56

[270] Пример 3 - оптимальное значение pH для стабильности БЕЛКА-1 при хранении

[271] Исследовали эффект pH на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл). Все составы содержали полисорбат 20 (0,1 мг/мл), TRIS (1 мМ) в качестве буфера, и либо трегалозу (300 мМ), либо смесь трегалозы (150 мМ) и маннита (250 мМ), в качестве незаряженного модификатора тоничности. Некоторые составы содержали метионин (2 мМ). В таблице 3 обобщенно представлены протестированные составы.

Таблица 3: Протестированные составы БЕЛКА-1. Все составы содержали БЕЛОК-1 (50 мг/мл)

Состав	TRIS (мМ)	Метионин (мМ)	Трегалоза (мМ)	Маннит (мМ)	Полисорбат 20 (мг/мл)	pH	Ионная сила* (мМ)
2-01	1	-	300	-	0,1	7,0	0,9
2-02	1	-	300	-	0,1	7,5	0,8
2-03	1	2	150	250	0,1	7,0	0,9
2-04	1	2	150	250	0,1	7,2	0,9
2-05	1	2	150	250	0,1	7,5	0,8
2-06	1	2	150	250	0,1	7,8	0,7

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[272] Составы хранили при 25°C в течение 26 недель или при 2-8°C в течение 26 недель. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (способ 1), и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[273] Уровень образования HMWS в составах с 2-01 по 2-06 представлен в таблице 4, где можно видеть, что при 25°C уровень образования HMWS был более низким в составе при pH 7,5 по сравнению с составом при pH 7,0 как при 25°C, так и при 2-8°C (сравнить составы 2-01 и 2-02 с трегалозой в качестве незаряженного модификатора тоничности). Сравнивая составы с 2-03 по 2-06 (со смесью трегалозы и маннита в качестве незаряженного модификатора тоничности), можно видеть, что, хотя вновь уровень образования HMWS был более низким при pH 7,5 по сравнению с pH 7,0 (как для 25°C, так и для 2-8°C), наиболее низкий уровень образования HMWS наблюдался при pH 7,2.

[274] В целом, pH 7,2-7,5, по-видимому, является наиболее подходящим для предупреждения образования HMWS.

Таблица 4: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C и 2-8°C в течение 26

недель в составах с 2-01 по 2-06, оцененных посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение % HMWS	
	25°C	2-8°C
2-01	3,14	1,03
2-02	2,59	0,71
2-03	3,04	0,90
2-04	2,35	0,51
2-05	2,42	0,56
2-06	2,86	0,71

[275] Пример 4 - Эффект концентрации буфера на стабильность БЕЛКА-1 при хранении

[276] Исследовали эффект концентрации буфера на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл). Все составы содержали полисорбат 20 (0,1 мг/мл). В таблице 5 обобщенно представлены протестированные составы.

Таблица 5: Протестированные составы БЕЛКА-1. Все составы содержали БЕЛОК-1 (50 мг/мл) и полисорбат 20 (0,1 мг/мл).

Состав	TRIS (мМ)	Фосфат натрия (мМ)	Метионин (мМ)	Глицери н (мМ)	Трегалоза (мМ)	Манни т (мМ)	pH	Ионна я сила* (мМ)
3-01	50	-	-	-	-	-	8,0	27,8
3-02	2	-	-	-	-	-	8,0	1,1
3-03	-	2	-	300	-	-	7,0	3,8
3-04	50	2	-	300	-	-	7,0	50,1
3-05	1	-	2	-	150	250	7,5	0,8
3-06	2	-	2	-	150	250	7,5	1,6
3-07	5	-	2	-	150	250	7,5	4

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[277] Составы хранили при 25°C в течение 7 недель и в течение 27 недель или при 2-8°C в течение 27 недель. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (способ 1), и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[278] Уровень образования HMWS в составах с 3-01 по 3-07 представлен в таблице 6, где можно видеть, что после 7 недель при 25°C уровень образования HMWS был более низким в составе, содержащем 2 мМ буфер TRIS, по сравнению с соответствующим составом, содержащем 50 мМ буфер TRIS (сравнить составы 3-01 и 3-02 при pH 8). Та же тенденция наблюдалась при pH 7,0: уровень HMWS был более низким в составе, не

содержавшем буфер TRIS, по сравнению с соответствующим составом, содержащим 50 мМ буфер TRIS (сравнить составы 3-04 и 3-03, оба из которых содержали глицерин в качестве незаряженного модификатора тоничности, при pH 7,0). Та же тенденция наблюдалась после 27 недель как при 25°C, так и при 2-8°C, где снижение концентрации буфера TRIS от 5 мМ до 2 мМ, а затем до 1 мМ приводило к снижению уровня образования HMWS (сравнить составы с 3-05 по 3-07, все из которых содержали смесь трегалозы и маннита в качестве незаряженного модификатора тоничности, при pH 7,5).

[279] В общем, при использовании TRIS в качестве буфера для диапазона pH 7,0-7,5, концентрация должна быть ниже 50 мМ и в подходящем случае настолько низкой, насколько это возможно, для снижения образования HMWS.

Таблица 6: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C и 2-8°C в составах с 3-01 по 3-07, оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение % HMWS		
	7 недель		27 недель
	25°C	25°C	2-8°C
3-01	4,14		
3-02	3,32		
3-03	1,70		
3-04	2,84		
3-05		2,42	0,56
3-06		2,69	0,68
3-07		2,76	0,69

[280] Пример 5 - Эффект незаряженного модификатора тоничности на стабильность БЕЛКА-1 при хранении

[281] Исследовали эффект разных незаряженных модификаторов тоничности на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл). Все составы содержали полисорбат 20 (0,1 мг/мл). В таблице 7 обобщенно представлены протестированные составы.

Таблица 7: Протестированные составы БЕЛКА-1. Все составы содержали БЕЛОК-1 (50 мг/мл) и полисорбат 20 (0,1 мг/мл).

Состав	TRIS (мМ)	Глицерин (мМ)	Трегалоza (мМ)	Сахароза (мМ)	pH	Ионная сила* (мМ)
4-01	2	300	-	-	7,0	1,9
4-02	2	-	300	-	7,0	1,9
4-03	2	-	-	300	7,0	1,9
4-04	1	-	300	-	7,5	0,8
4-05	1	-	200	-	7,5	0,8

4-06	1	-	-	300	7,5	0,8
4-07	1	-	-	200	7,5	0,8

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[282] Составы хранили при 25°C в течение 12 недель, при 25°C в течение 26 недель, при 2-8°C в течение 16 недель или при 2-8°C в течение 26 недель. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (Способ 1) и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[283] Уровень образования HMWS в составах с 4-01 по 4-07 представлен в таблице 8, где можно видеть, что после 12 недель при 25°C и после 16 недель при 2-8°C, при сравнении применения глицерина, трегалозы и сахарозы в качестве незаряженного модификатора тоничности скорость образования HMWS была наиболее низкой в составе, содержащем трегалозу (сравнить составы с 4-01 по 4-03, при pH 7, с 2 mM буфером TRIS). То же самое наблюдалось для более длительных периодов хранения 26 недель, при сравнении применения трегалозы и сахарозы в качестве незаряженного модификатора тоничности уровень HMWS был более низким в составе, содержащем трегалозу (сравнить составы с 4-04 по 4-07, при pH 7,5, с 1 mM буфером TRIS). Среди двух протестированных концентраций трегалозы (200 mM и 300 mM) более низкий уровень образования HMWS наблюдался при более высокой концентрации 300 mM (сравнить составы 4-04 и 4-05). Однако в некоторых случаях, в частности, если объем дозы композиции является высоким, концентрация трегалозы может быть ограничена фармакологически приемлемыми пределами, например, приблизительно до 150 mM. В таких случаях смесь трегалозы с другим незаряженным модификатором тоничности, например, сахарозой, может быть оптимальной.

[284] В общем, использование трегалозы в качестве незаряженного модификатора тоничности обеспечивало наилучший профиль стабильности для протестированных концентраций и модификаторов тоничности.

Таблица 8: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C и 2-8°C в составах с 4-01 по 4-07, оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение % HMWS			
	25°C (12 недель)	25°C (26 недель)	2-8°C (16 недель)	2-8°C (26 недель)
4-01	2,90		3,19	
4-02	1,43		0,50	
4-03	1,65		0,85	
4-04		2,59		0,71
4-05		3,77		2,19
4-06		3,21		1,37

Состав	Повышение % HMWS		
4-07		4,27	2,93

[285] Пример 6 - Эффект нейтральных аминокислот на стабильность БЕЛКА-1 при хранении

[286] Исследовали эффект разных нейтральных аминокислот на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл). Все составы содержали полисорбат 20 (0,1 мг/мл), буфер TRIS (2 мМ) и глицерин (300 мМ) в качестве незаряженного модификатора тоничности. В таблице 9 обобщенно представлены протестированные составы.

Таблица 9: Составы протестированного БЕЛКА-1. Все составы содержали БЕЛОК-1 (50 мг/мл) и полисорбат 20 (0,1 мг/мл).

Состав	TRIS (мМ)	Глицерин (мМ)	Глицин (мМ)	Пролин (мМ)	pH	Ионная сила* (мМ)
5-01	2	300	100	-	7,0	1,9
5-02	2	300	300	-	7,0	1,9
5-03	2	300	-	100	7,0	1,9
5-04	2	300	-	300	7,0	1,9
5-05	2	300	-	500	7,0	1,9
5-06	2	300	-	-	7,0	1,9

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[287] Составы хранили при 25°C в течение 16 недель. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (Способ 1) и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[288] Уровень образования HMWS в составах с 5-01 по 5-06 представлен в таблице 10, где можно видеть, что после 16 недель при 25°C добавление как глицина (300 мМ), так и пролина (во всех протестированных концентрациях) приводило к более низкому уровню образования HMWS (сравнить составы с 5-01 по 5-05 с контрольным составом 5-06). При непосредственном сравнении глицина и пролина при данной концентрации нейтральной аминокислоты уровень образования HMWS был более низким в составах, содержащих пролин (сравнить состав 5-01 с составом 5-03, и сравнить состав 5-02 с составом 5-04). Среди трех протестированных концентраций пролина (100 мМ, 200 мМ и 500 мМ), более низкий уровень образования HMWS наблюдался при наиболее высокой концентрации 500 мМ (сравнить составы 5-05 и 5-05). Однако на практике концентрация пролина, использованная в коммерческом терапевтическом составе, в идеальном случае будет более низкой (например, приблизительно 100-150 мМ) вследствие ограничений осмолярности.

[289] В общем, добавление нейтральной аминокислоты (например, пролина или

глицина, в частности, пролина) приводило к более стабильному составу.

Таблица 10: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C в течение 16 недель в составах с 5-01 при 5-06, оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение % HMWS
5-01	3,96
5-02	3,18
5-03	3,57
5-04	2,88
5-05	2,40
5-06	3,82

[290] Пример 7 - Эффект метионина в комбинации с другой нейтральной аминокислотой на стабильность БЕЛКА-1 при хранении

[291] Исследовали эффект метионина в комбинации с любой из нейтральных аминокислот глицина или пролина на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл). Все составы содержали полисорбат 20 (0,1 мг/мл), буфер TRIS (2 мМ или 1 мМ) и глицерин (300 мМ) или трегалозу (300 мМ) в качестве незаряженного модификатора тоничности. В таблице 11 обобщенно представлены протестированные составы.

Таблица 11: Протестированные составы БЕЛКА-1. Все составы содержали БЕЛОК-1 (50 мг/мл) и полисорбат 20 (0,1 мг/мл).

Состав	TRIS (мМ)	Метионин н (мМ)	Глицерин н (мМ)	Глицин (мМ)	Пролин н (мМ)	Трегалоза (мМ)	pH	Ионная сила* (мМ)
6-01	2	-	300	300	-	-	7,0	1,9
6-02	2	10	300	300	-	-	7,0	1,9
6-03	1	-	-	-	200	300	7,5	0,8
6-04	1	2	-	-	200	300	7,5	0,8

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[292] Составы хранили при 25°C в течение 16 недель, при 25°C в течение 26 недель или при 2-8°C в течение 26 недель. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (Способ 1) и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[293] Уровень образования HMWS в составах с 6-01 по 6-04 представлен в таблице 12, где можно видеть, что после 16 недель при 25°C добавление метионина к составу, содержавшему глицин, приводило к более низкому уровню образования HMWS (сравнить составы 6-01 и 6-02). Добавление метионина к составу, содержавшему пролин, также приводило к более низкому уровню образования HMWS после 26 недель при 25°C или после 26 недель при 2-8°C (сравнить составы 6-03 и 6-04).

Таблица 12: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C в составах с 6-01 по 6-04, оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение % НМWS		
	25°C (16 недель)	25°C (26 недель)	2-8°C (26 недель)
6-01	3,18		
6-02	2,62		
6-03		2,15	0,15
6-04		1,87	0,07

[294] Пример 8 - Тестирование стабильности при хранении состава БЕЛКА-1 с поверхностно-активным веществом полоксамером

[295] Исследовали эффект поверхностно-активного вещества полоксамера на стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл). Партия БЕЛКА-1, использованная в этом примере, представляла собой партию, отличную от партии, использованной в примерах 2-7. В таблице 13 обобщенно представлен протестированный состав.

Таблица 13: Протестированный состав БЕЛКА-1. Состав содержал БЕЛОК-1 (50 мг/мл).

Состав	TRI S (мМ)	Метионин (мМ)	Трегалоза (мМ)	Сахароза (мМ)	Пролин (мМ)	Полоксамер 188 (мг/мл)	pH	Ионная сила* (мМ)
7-01	2	2	150	100	100	1,0	7,5	1,6

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[296] Состав хранили при 25°C и при 2-8°C в течение 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев и 24 месяцев. Стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (Способ 1) и посредством визуальной оценки, как описано в Основных способах.

[297] Состав имел низкий уровень образования НМWS в условиях хранения, как представлено в таблицах 14А и 14В.

[298] Как показано в таблицах 15А и 15В, протестированный состав прошел визуальный тест после хранения при 25°C и при 2-8°C.

Таблица 14А: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 2-8°C в составе 7-01, оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение %НМWS при 2-8°C				
	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяцев
7-01	1,08	1,71	2,51	4,03	5,61

Таблица 14В: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C в составе 7-01,

оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение %HMWS при 25°C				
	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяцев
7-01	3,36	5,06	7,19	11,10	15,49

Таблица 15А: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 2-8°C в составе 7-01, оцененная с использованием визуальной оценки.

Состав	Визуальная оценка при 2-8°C				
	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяцев
7-01	1	1	1	1	1

Таблица 15В: Стабильность БЕЛКА-1 (50 мг/мл) при 25°C в составе 7-01, оцененная с использованием визуальной оценки.

Состав	Визуальная оценка при 25°C				
	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяцев
7-01	1	1	1	1	1

[299] Пример 9 - Оценка предела размера не видимых невооруженным глазом частиц для состава БЕЛКА-1

[300] Стабильность состава БЕЛКА-1, указанного в таблице 16А, оценивали посредством визуальной оценки и посредством определения количества не видимых невооруженным глазом частиц (SVP) после хранения в течение 6 месяцев при 25°C, в обоих случаях как описано в Основных способах.

Таблица 16А: Протестированный состав БЕЛКА-1 (50 мг/мл).

Состав	TRI S (мМ))	Метиони н (мМ)	Трегалоза (мМ)	Сахароза (мМ)	Проли н (мМ)	Полоксаме р 188 (мг/мл)	pH	Ионная сила* (мМ)
9-01	5	2	150	100	100	1,0	7,3	4,3

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[301] После хранения в течение 6 месяцев при 25°C состав 9-01 был практически свободным от видимых частиц. Количество не видимых невооруженным глазом частиц представлено в таблице 16В.

Таблица 16В: Количество не видимых невооруженным глазом частиц после хранения состава 9-01 в течение 6 месяцев при 25°C.

Состав	Количество не видимых невооруженным глазом частиц на контейнер	
	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм
9-01	67	0

[302] USP <788> "Материал в форме частиц в инъекция" 11 (в соответствии с Ph. Eur. 2.9.19) требует, чтобы препараты объемом менее 100 мл содержали не более 6000 частиц ≥ 10 мкм на контейнер и не более 600 частиц ≥ 25 мкм на контейнер при определении по светоблокировке (как например, способ НІАС в Основных способах). По сути, после длительного хранения состав 9-01 имел показатели значительно ниже требуемых верхних пределов для не видимых невооруженным глазом частиц, указывая на превосходную стабильность при хранении.

[303] Пример 10 - Испытание для планирования эксперимента (DOE), оценивающее влияние концентрации компонентов состава на стабильность БЕЛКА-1

[304] Эффект различных концентраций белка, буфера и поверхностно-активного вещества полоксамера на стабильность БЕЛКА-1 оценивали посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур в составах с использованием SEC (Способ 2), как описано в Основных способах. Уровень образования HMWS в различных составах после 12 месяцев при 5°C представлен в таблице 17.

Таблица 17: Стабильность БЕЛКА-1 при 5°C в течение 12 месяцев при оценке посредством SEC (Способ 2).

Состав	БЕЛОК-1 (мг/мл)	Tris (мМ)	pH	Полоксамер 188 (%)	Повышение HMWS после 12 месяцев %
RF08	58	10	7,7	0,03	3,3
RF01	58	10	7,7	0,17	3,3
RF15	58	2	7,7	0,03	2,6
RF16	58	2	7,7	0,17	2,4
RF02	42	10	7,7	0,03	2,4
RF11	42	10	7,7	0,17	2,4
RF09	42	2	7,7	0,03	1,7
RF05	42	2	7,7	0,17	1,7

[305] Все протестированные составы демонстрировали хорошую стабильность при хранении. При сравнении составов RF08 с RF02, RF01 с RF11, RF15 с RF09, и RF16 с RF05, можно видеть, что снижение концентрации белка приводит к некоторому повышению стабильности. При сравнении составов RF08 и RF01 с RF15 и RF16, и сравнении составов RF02 и RF11 с RF09 и RF05 можно видеть, что более низкая концентрация буфера (TRIS) приводит к небольшому повышению стабильности, хотя более высокая концентрация буфера (TRIS) 10 мМ все еще обеспечивает состав с хорошей стабильностью. Наконец, эффект на стабильность при хранении повышения концентрации полоксамера от 0,03% до 0,17% был минимальным.

[306] Сравнительный пример 11 - Эффект концентрации буфера, заряда модификатора тоничности и нейтральной аминокислоты на стабильность при хранении

иммуноглобулина G1 (IgG1) при 30°C

[307] Исследовали эффект концентрации буфера и заряда модификатора тоничности на стабильность IgG1 (100 мг/мл). Тестировали цитратный буфер. Хлорид натрия (150 мМ) использовали в качестве заряженного модификатора тоничности и глицерин (300 мМ) использовали в качестве незаряженного модификатора тоничности. Эффект пролина и глицина (50 мМ) на стабильность IgG1 также исследовали в присутствии 1 мМ буфера и глицерина (300 мМ). Все протестированные составы содержали полисорбат 80 (0,2 мг/мл) и были доведены до pH 6,0. В таблице 18 обобщенно представлены протестированные составы. Все составы подвергали стрессовым условиям при 30°C в течение 8 недель. Наблюдение за стабильностью IgG1 проводили посредством мониторинга уровня образования высокомолекулярных структур с использованием SEC (Способ 1).

Таблица 18: Протестированные составы IgG1. Все составы содержали IgG1 (100 мг/мл) и полисорбат 80 (0,2 мг/мл) и были доведены до pH 6,0.

Состав	Лимонная кислота (мМ)	Хлорид натрия (мМ)	Глицерин (мМ)	Пролин (мМ)	Глицин (мМ)	Ионная сила* (мМ)
8-01	1	150	-	-	-	153,8
8-02	5	150	-	-	-	168,7
8-03	20	150	-	-	-	224,8
8-04	1	-	300	-	-	3,8
8-05	5	-	300	-	-	18,7
8-06	20	-	300	-	-	74,8
8-07	1	-	300	50	-	3,8
8-08	1	-	300	-	50	3,8

*Общая ионная сила "I", как определено выше

[308] Все протестированные составы прошли визуальный тест после хранения при 30°C. Уровень образования HMWS в составах с 8-01 по 8-08 после хранения при 30°C представлен в таблице 19. Уровень образования HMWS снижался при повышении концентрации буфера как в присутствии хлорида натрия, так и в присутствии глицерина (сравнить составы с 8-01 по 8-03, и сравнить составы с 8-04 по 8-06). Существовала небольшая тенденция к более высокой стабильности при более высокой ионной силе состава, когда концентрация лимонной кислоты была низкой (1 или 5 мМ) (сравнить состав 8-01 с составом 8-04 и сравнить состав 8-02 с составом 8-05). Это становилось обратным, когда концентрация лимонной кислоты была высокой (20 мМ) (сравнить состав 8-03 с составом 8-06), хотя в этом случае ионная сила обоих составов была выше 70 мМ. Присутствие нейтральной аминокислоты (пролин или глицин) приводило к очень незначительному повышению уровня образования HMWS (сравнить состав 8-04 с

составами 8-07 и 8-08).

Таблица 19: Стабильность IgG1 (100 мг/мл) при 30°C в составах с 8-01 по 8-08, оцененная посредством SEC (Способ 1).

Состав	Повышение % HMWS после инкубации при 30°C в течение 8 недель
8-01	6,28
8-02	5,15
8-03	4,41
8-04	6,58
8-05	5,48
8-06	4,27
8-07	6,67
8-08	6,68

[309] Обобщение примеров

[310] Данные примеров 2-10 показывают, что композиции сконструированного димерного белка по изобретению, как определено в настоящем описании, такого как БЕЛОК-1, являются стабильными при составлении при низкой ионной силе с нейтральной аминокислотой. Ионную силу композиции подходящим образом сохраняют на низком уровне путем использования низкой концентрации буфера (или путем неиспользования никакого буфера) и путем использования незаряженного модификатора тоничности вместе заряженного модификатора тоничности.

[311] Когда эти данные сравнивают со сравнительным примером 11, можно видеть, что это поведение в значительной степени отличается от поведения, которое демонстрирует протестированное антитело из 4 цепей (типа IgG1). Было выявлено, что оно является более стабильным при более высоких концентрациях буфера и в некоторых случаях при более высокой ионной силе, и также было обнаружено, что оно дестабилизируется в присутствии нейтральной аминокислоты.

[312] Настоящее изобретение сочетает в себе признаки композиции, которые, как полагают без связи с теорией, будут действовать согласованно для защиты неприродных гидрофобных участков, а также минимизации скорости протонного обмена в неестественным образом экспонированных участках нестабильности, обеспечивая стабильность сконструированного димерного белка по изобретению, такого как БЕЛОК-1.

[313] На протяжении описания и формулы изобретения, которая приводится ниже, если контекстом не требуется иное, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", подразумевают включение указанного целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий, но не исключение какого-либо другого целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

[314] Все патенты, патентные заявки и ссылки, упоминаемые в настоящем

описании, включены в настоящее описание в полном объеме в качестве ссылок.

[315] Изобретение охватывает все комбинации предпочтительных и более предпочтительных групп и подходящих и более подходящих групп и вариантов осуществления групп, приведенных выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция водного раствора с рН в диапазоне от 6,0 до 8,0, содержащая:
 - сконструированный димерный белок, где каждый мономер димерного белка содержит по меньшей мере один полипептид серпина человека, функционально связанный с полипептидом Fc иммуноглобулина человека или полипептидом, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина;
 - необязательно один или несколько буферов, представляющих собой вещества, имеющие по меньшей мере одну ионизируемую группу с pK_a в диапазоне от 4,0 до 10,0, и эта pK_a находится в пределах 2 единиц рН от рН композиции;
 - нейтральную аминокислоту; и
 - незаряженный модификатор тоничности;где буферы присутствуют в композиции в общей концентрации 0-10 мМ; и где общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 30 мМ.
2. Композиция водного раствора по п.1, где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.
3. Композиция водного раствора по п.1 или п.2, где каждый мономер димерного белка содержит один полипептид серпина человека.
4. Композиция водного раствора по п.2 или 3, где полипептид серпина человека имеет последовательность SEQ ID NO: 1 или 2.
5. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-4, где полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, представляет собой модифицированный полипептид Fc IgG4 человека.
6. Композиция водного раствора по п.5, где полипептид Fc иммуноглобулина человека или полипептид, который происходит из полипептида Fc иммуноглобулина, представляет собой модифицированный полипептид Fc IgG4 человека и имеет последовательность под любым из SEQ ID NO: 28-43.
7. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-6, где каждый мономер димерного белка имеет последовательность SEQ ID No: 56.
8. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-7, где белок присутствует в концентрации 1-400 мг/мл, например, 10-200 мг/мл, например, 20-100 мг/мл, например, 30-60 мг/мл, например, приблизительно 35 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл.
9. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-8, где буферы присутствуют в общей концентрации 0,1-10 мМ, такой как 0,5-10 мМ, такой как 1-10 мМ, такой как 1-8 мМ, такой как 1-6 мМ, такой как 2-6 мМ, такой как 2-5 мМ, например, 3-5 мМ.
10. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-8, которая по существу свободна от буферов.
11. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-9, где буфер содержит ионизируемые группы с pK_a в пределах 1 единицы от рН композиции.

12. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-9 и 11, где буфер или буферы выбран/выбраны из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, сульфита, аспартама, аспартата, глутамата, тартрата, аденина, сукцината, аскорбата, бензоата, фенилацетата, галлата, цитозина, п-аминобензойной кислоты, сорбата, ацетата, пропионата, альгината, урата, 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, бикарбоната, бис(2-гидроксиэтил)иминотрис(гидроксиметил)метана, N-(2-ацетиамидо)-2-иминодиуксусной кислоты, 2-[(2-амино-2-охоэтил)амино]этансульфоновой кислоты, пиперазина, N, N'-бис(2-этансульфоновой кислоты), фосфата, N, N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты, 3-[N,N-бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-гидроксипропансульфоновой кислоты, триэтанолamina, пиперазин-N,N'-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты), трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS), N-трис(гидроксиметил)глицина и N-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновой кислоты, и их солей, и их комбинаций.

13. Композиция водного раствора по п.12, где буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, гистидина, малеата, тартрата, бензоата, ацетата, бикарбоната, фосфата и трис(гидроксиметил)аминометана (TRIS), например, выбран из фосфата и TRIS.

14. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-13, где незаряженный модификатор тоничности выбран из группы, состоящей из многоатомных спиртов, сахаров (например, моносахариды и дисахариды) и сахарных спиртов.

15. Композиция водного раствора по п.14, где незаряженный модификатор тоничности выбран из группы, состоящей из глицерина, 1,2-пропандиола, маннита, сорбита, глюкозы, сахарозы, трегалозы, ПЭГ300 и ПЭГ400, и, в частности, выбран из глицерина, маннита, сахарозы и трегалозы

16. Композиция водного раствора по п.14 или п.15, содержащая дисахарид в качестве незаряженного модификатора тоничности.

17. Композиция водного раствора по п.16, содержащая сахарозу и/или трегалозу в качестве незаряженного модификатора тоничности, в частности, трегалозу.

18. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-17, где общая концентрация незаряженного модификатора тоничности или комбинации нескольких модификаторов тоничности составляет 50-1000 мМ, как например, 200-600 мМ, 200-500 мМ, или общая концентрация незаряженного модификатора тоничности или комбинации нескольких модификаторов тоничности составляет 50-500 мМ, как например, 100-400 мМ, 150-350 мМ, 200-300 мМ или приблизительно 250 мМ.

19. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-17, где осмолярность композиции составляет 200-500 мосм/л, например приблизительно 300 мосм/л, или осмолярность композиции составляет 300-500 мосм/л, например, приблизительно 400-460 мосм/л.

20. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-19, содержащая нейтральную аминокислоту, выбранную из глицина, метионина, пролина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина, триптофана, серина, треонина, аспарагина и

глутамин.

21. Композиция водного раствора по п.20, где нейтральная аминокислота выбрана из глицина, метионина и пролина.

22. Композиция водного раствора по п.20, содержащая пролин в качестве нейтральной аминокислоты.

23. Композиция водного раствора по п.20, содержащая глицин в качестве нейтральной аминокислоты.

24. Композиция водного раствора по п.20, содержащая пролин и метионин в качестве нейтральных аминокислот.

25. Композиция водного раствора по п.20, содержащая глицин и метионин в качестве нейтральных аминокислот.

26. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-25, где общая концентрация одной или нескольких нейтральных аминокислот в композиции составляет от 20 до 600 мМ, как например, от 20 до 500 мМ, как например, от 20 до 400 мМ, как например, от 20 до 300 мМ, например, от 50 до 300 мМ.

27. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-25, где общая концентрация одной или нескольких нейтральных аминокислот в композиции составляет от 50 до 200 мМ, от 100 до 200 мМ или от 100 до 150 мМ.

28. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-27, где общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 20 мМ.

29. Композиция водного раствора по п.28, где общая ионная сила композиции за исключением вклада сконструированного димерного белка составляет менее 10 мМ.

30. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-29, где рН составляет от 6,8 до 7,8, например, от 7,0 до 7,8, от 7,1 до 7,6, от 7,1 до 7,5, от 7,2 до 7,5, от 7,1 до 7,4, от 7,2 до 7,3; или составляет приблизительно 7,2 или приблизительно 7,3.

31. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-30, которая содержит неионное поверхностно-активное вещество.

32. Композиция водного раствора по п.31, где неионное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из алкилгликозида, полисорбата, алкилового эфира полиэтиленгликоля, блок-сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (полосамер) и алкилфенилового эфира полиэтиленгликоля.

33. Композиция водного раствора по п.32, где неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, такой как полисорбат 20 или полисорбат 80.

34. Композиция водного раствора по п.32, где неионное поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (полосамер), такой как полосамер 188.

35. Композиция водного раствора по любому из пп. 31-34, где неионное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации 10-2000 мкг/мл, такой как 50-1000 мкг/мл, например, 100-500 мкг/мл, например, приблизительно 200 мкг/мл, или

неионное поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации 250-1500 мкг/мл, например, 750-1250 мкг/мл, например, приблизительно 1000 мкг/мл.

36. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-35, которая содержит консервант, такой как фенольный или бензильный консервант.

37. Композиция водного раствора по п.36, где фенольный или бензильный консервант выбран из группы, состоящей из фенола, м-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, пропилпарабена и метилпарабена.

38. Композиция водного раствора по п.36 или п.37, где консервант присутствует в концентрации 10-100 мМ, такой как 20-80 мМ, например, 25-50 мМ.

39. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-38, которая представляет собой композицию для применения в терапии.

40. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-38, которая представляет собой фармацевтическую композицию.

41. Способ лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение композиции водного раствора по любому из пп. 1-40.

42. Способ лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора по любому из пп. 1-40.

43. Способ уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора по любому из пп. 1-40.

44. Способ лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение указанному индивидууму композиции водного раствора по любому из пп. 1-40, где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

45. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-40, для применения в способе лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с аберрантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом.

46. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-40, для применения в способе лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном уменьшении риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

47. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-40, для применения в способе уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

48. Композиция водного раствора по любому из пп. 1-40, для применения в способе лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом,

где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

49. Применение композиции водного раствора по любому из пп. 1-40 для производства лекарственного средства для лечения или облегчения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с aberrантной экспрессией или активностью сериновой протеазы у индивидуума, нуждающегося в этом.

50. Применение композиции водного раствора по любому из пп. 1-40 для производства лекарственного средства для лечения или облегчения воспаления или симптома воспалительного заболевания или нарушения при одновременном снижении риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

51. Применение композиции водного раствора по любому из пп. 1-40 для производства лекарственного средства для уменьшения риска инфекции у индивидуума, нуждающегося в этом.

52. Применение композиции водного раствора по любому из пп. 1-40 для производства лекарственного средства для лечения или облегчения симптома дефицита ААТ у индивидуума, нуждающегося в этом, где полипептид серпина человека представляет собой полипептид альфа-1 антитрипсина (ААТ) человека или происходит из полипептида ААТ человека.

53. Способ, композиция водного раствора для применения или применение по любому из пп. 42, 46 и 50, где воспалительное заболевание или нарушение выбрано из следующих: дефицит альфа-1 антитрипсина (ААТ), эмфизема, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), аллергическая астма, кистозный фиброз, злокачественные опухоли легкого, повреждение при ишемии-реперфузии, повреждение при ишемии/реперфузии после трансплантации сердца, инфаркт миокарда, ревматоидный артрит, септический артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона, псориаз, диабет типа I и/или типа II, пневмония, сепсис, реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), заживление ран, системная красная волчанка и рассеянный склероз.

54. Способ, композиция водного раствора для применения или применение по любому из пп. 42, 43, 46, 47, 50 и 51, где инфекция выбрана из бактериальных инфекций, грибковых инфекций и вирусных инфекций.

55. Способ, композиция водного раствора для применения или применение по любому из пп. 41-54, где индивидуумом является человек.