



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118756** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)**C07K 1/10** (2006.01)**C07K 14/47** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)

A61P 11/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2015 09797	(72) Винахідник(и): Пілон Апріль Л. (US), Він Мелісса Е. (US), Цемер Джон К. (US)
(22) Дата подання заявки: 16.03.2014	(73) Власник(и): ТЕРАБРОН ТЕРЕП'ЮТІКС, ІНК., 9430 Key West Avenue, Suite 150, Rockville, MD 20850, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.03.2019	(74) Представник: Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13/843,289	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 20110183887 A1, 28.07.2011 US 20120202740 A1, 09.08.2012 US 20060275794 A1, 07.12.2006 WO 2004101824 A1, 25.11.2004 US 20070037246 A1, 15.02.2007 Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgenbinding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily / Brian C. Jackson, David C. Thompson, Mathew W. Wright et al. // Human genomics. - 2011. - Vol. 5 (6). - P. 691-702 Preclinical evaluation of human secretoglobin 3A2 in mouse models of lung development and fibrosis / Yan Cai, Melissa E. Winn, John K. Zehmer et al. // American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology. - 2014. - Vol. 306 (1). - P. L10-L22 Safety, pharmacokinetics, and anti-inflammatory effects of intratracheal recombinant human clara cell protein in premature infants with respiratory distress syndrome / Carolyn R. Levine, Ira H. Gewolb, Kristen Allen et al. // Pediatric research. - 2005. - Vol. - 58(1). - P. 15-21 An update on pharmacologic approaches to bronchopulmonary dysplasia / Sailaja Ghanta, Kristen Tropea Leeman, Helen Christou // Seminars in perinatology. - 2013. - Vol. 37. - P. 115-123 Abdel-Latif M. Intratracheal Clara cell secretory protein (CCSP) administration in preterm infants with or at risk of respiratory distress syndrome / Mohamed E Abdel-Latif, David A Osborn // The cochrane collaboration. - 2011. - P. 1-6
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.03.2013	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.02.2016, Бюл.№ 3	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.03.2019, Бюл.№ 5	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2014/030101, 16.03.2014	

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ**(57) Реферат:**

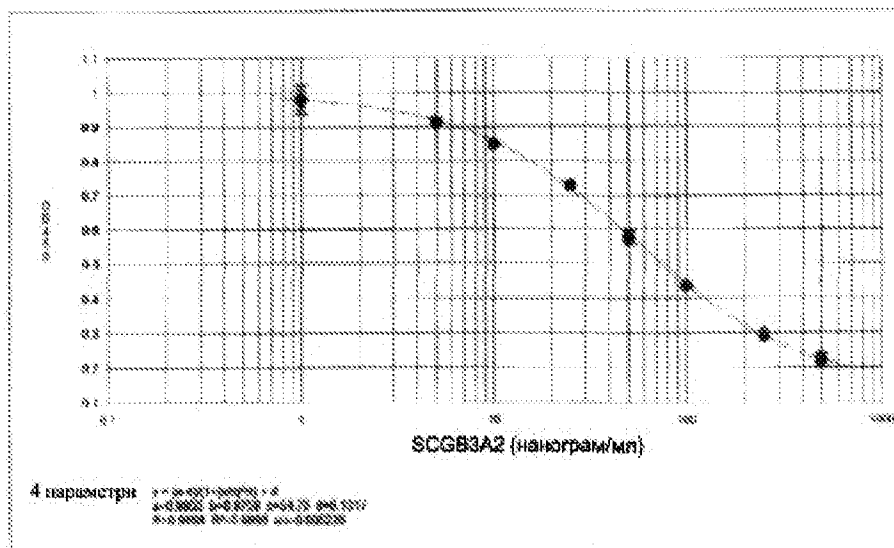
Винахід стосується композиції для лікування захворювань дихальних шляхів, яка складається з

UA 118756 C2

рекомбінантного поліпептиду SCGB3A2 людини з N-кінцем ATA. Також винахід стосується способу синтезу рекомбінантного поліпептиду, який включає: застосування партнера злиття на основі UBL та UBL-протеази, вибір N-кінця, очищення партнера злиття за допомогою IMAC, де UBL-протеаза розпізнає партнера злиття на основі UBL та відщеплює партнера злиття на основі UBL від рекомбінантного поліпептиду з вивільненням інтактного поліпептиду SCGB3A2.

ФІГ. 6. Стандартна крива для конкурентного ELISA SCGB3A2 людини

СТАНДАРТНА КРИВА



Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, способів одержання, аналітичних способів та способів застосування секретоглобінів, у тому числі SCGB1A1 (CC10), SCGB3A1 та SCGB3A2. Були виявлені нові фізіологічні ролі та терапевтичні застосування цих секретоглобінів. Конкретно, даний винахід відноситься до нових способів застосування rhCC10, rhSCGB3A2 та rhSCGB3A1 для попередження або відстрочення госпіталізації внаслідок важких загострень захворювання дихальної системи протягом до 10 місяців після курсу лікування. Даний винахід також відноситься до нових способів одержання та фармацевтичних композицій на основі rhSCGB3A2, які є стабільними та мають протизапальні властивості. Більш конкретно, даний винахід додатково забезпечує спосіб попередження важких загострень захворювання дихальної системи за допомогою введення rhCC10. Даний винахід додатково забезпечує спосіб лікування бронхоектазу та попередження загострень бронхоектазу за допомогою введення rhSCGB3A2. Ще більш конкретно, даний винахід забезпечує спосіб регресії зміни структури повітроносних шляхів при хронічних захворюваннях легенів та попередження зміни структури повітроносних шляхів при гострих ушкодженнях легенів за допомогою введення rhCC10, rhSCGB3A2 або rhSCGB3A1. Ще більш конкретно, ці секретоглобіни модифікують зміну структури повітроносних шляхів непрямым шляхом за допомогою відновлення нормальної кількості клітин Клара та асоційованих із ними структур, що називаються нейроепітеліальними тільцями (також відомі під назвою NEB) або кластерами нейроендокринних клітин (також відомі під назвою NEC), які виявляють завдяки їхній імунореактивності щодо антитіл проти CGRP1, в епітелії повітроносних шляхів. Тоді клітини Клара та інші CGRP1+ клітини секретують ці секретоглобіни та інші компоненти нормального середовища слизової оболонки, що сприяють гомеостазу та нормальному функціонуванню слизової оболонки дихальних шляхів та епітелію, які у цьому випадку є більш стійкими до несприятливих чинників, що вдихаються, без виникнення важких загострень.

Передумови винаходу

Природний 10 кДа білок клітин Клара людини (CC10), також відомий як утероглобін, 16 кДа білок клітин Клара (CC16), секреторний білок клітин Клара (CCSP), бластокінін, білок-1 сечі та секретоглобін 1A1 (SCGB1A1) є представниками родини споріднених білків, що називається секретоглобіни, які як вважається, існують у всіх хребетних тварин. Існують два додаткові секретоглобіни, які також експресуються при дуже високих рівнях у дихальних шляхах, що називаються SCGB3A1 та SCGB3A2 (Porter, 2002). Ці три білки; SCGB1A1, SCGB3A1 та SCGB3A2, у даному документі називаються "секретоглобінами дихальної системи". У таблиці 1 показані ідентифікатори в Genebank та амінокислотні послідовності для кожного секретоглобіну дихальної системи.

Таблиця 1

Секретоглобіни дихальної системи

Білок	Ідентифікатор у Genebank	Амінокислотна послідовність
SCGB1A1 (CC10)	BC004481	EICPSFQRVIETLLMDTPSSYEAAAMELFSPDQDMREAGAQLKKLVDTL PQKPRESIIKLMEKIAQSSLCN
SCGB3A1	NP_443095	AAFLVGSAPVAQPVAALESAAEAGAGTLANPLGTLNPLKLLSSLGIP VNHLEIGSQKCV AELGPQAVGAVKALKALLGALT VFG
SCGB3A2	AAQ89338	ATAFLINKVPLPVDKLA PLPLDNILPFMDPLKLLKTLGISVEHLVEGLRK CVNELGPEASEAVKKLLEALSHLV

Основним джерелом секретоглобінів дихальної системи у ссавців є епітелій легенів та трахеї, а саме бронхіолярні епітеліальні клітини повітроносних шляхів, відмінні від миготливих (передусім клітини Клара), та при цьому вони є дуже поширеними білками, що продукуються у локальному середовищі, у позаклітинній рідині легенів дорослих. Вони також секретуються у назальному епітелії. Таким чином, секретоглобіни дихальної системи характеризуються високим рівнем експресії як у верхніх, так і у нижніх дихальних шляхах; причому верхні дихальні шляхи включають носові ходи та пазухи, а нижні дихальні шляхи включають трахею, бронхи та альвеоли легенів. Значна кількість секретоглобінів дихальної системи також присутня у сироватці крові та сечі, причому у більшості випадків їх одержують з пульмональних джерел. SCGB3A1 також експресується у шлунку, серці, тонкому кишечнику, матці та молочних залозах, а SCGB3A2 характеризується низьким рівнем експресії у цитоподібній залозі (Porter, 2002).

CC10 також продукується тканинами репродуктивних органів (матка, сім'яні міхурці), екзокринними залозами (передміхурова залоза, молочна залоза, підшлункова залоза), ендокринними залозами (щитоподібна залоза, гіпофіз, надниркові залози та яєчники), а також тимусом та селезінкою (Mukherjee, 1999; Mukherjee, 2007). Основна форма CC10 людини *in vivo*, яку можна виділити, являє собою гомодимер, що складається з двох ідентичних мономерів із 70 амінокислот, причому значення ізоелектричної точки становить 4,8. Його молекулярна маса становить 15,8 кДа, хоча він мігрує при аналізі за допомогою SDS-PAGE з одержанням спостережуваної молекулярної маси приблизно 10 кДа. Мономери розташовані в антипаралельній конфігурації, причому N-кінець одного є суміжним з C-кінцем іншого, а у повністю окисненій формі димера мономери з'єднані двома дисульфідними зв'язками (Mukherjee, 1999). Однак, *in vivo* молекулярна форма (мономер, димер або інший комплекс) SCGB3A2 у зразках, одержаних від людини, ще не була описана. Усі три секретоглобіни дихальної системи можна одержати за допомогою синтетичних способів (Nicolas, 2005) або способів з використанням рекомбінантних ДНК (Mantile, 1993), хоча донині не було повідомлень з описом успішного синтезу SCGB3A1 та SCGB3A2 людини та біохімічною характеристикою цих білків *in vitro*.

CC10 являє собою білок із протизапальною та імунomodulatory дією, що був описаний у зв'язку з різними взаємодіями з іншими білками, рецепторами та типами клітин (огляд у Mukherjee, 2007, Mukherjee, 1999 та Pilon, 2000). Більш низькі рівні білка або мРНК CC10 були виявлені у зразках різних тканин та рідин при ряді клінічних станів, що характеризуються деяким ступенем запалення, у тому числі астмі (Lensmar, 2000; Shijubo, 1999; Van Vyve, 1995), пневмонії (Natori, 1995), облітеруючому бронхіті (Nord, 2002), саркоїдозі (Shijubo, 2000), та у пацієнтів, які страждають на хронічний риніт з рецидивуючим синуситом та назальним поліпозом (Liu, 2004). При цих станах на епітеліальні клітини легенів, основне джерело ендогенних CC10 в організмі, часто здійснюється несприятливий вплив, вони виснажуються або навіть руйнуються (Shijubo, 1999).

Миші, нокаутні (KO) по CC10, є важливими для визначення ролі CC10 у гомеостазі легенів, розмноженні та певних типах захворювань нирок. Існують дві лінії мишей CC10 KO, для кожної з яких використовували різні конструкції для генного нокауту та різні вихідні лінії мишей. Одна нокаутна лінія характеризується декількома вираженими фенотипічними характеристиками, у тому числі системним запаленням, слабкою здатністю до розмноження (малий розмір приплоду), та летальним фенотипом нирок, схожим на IgA-нефропатію у людини (Zhang, 1997; Zheng, 1999). Інша нокаутна лінія не характеризується цими вираженими фенотипічними характеристиками та є більш життєздатною, що дає можливість проведення більшої кількості експериментів (Stripp, 1997). Обидві лінії мишей CC10 KO характеризуються набагато більшою чутливістю та значно посиленними запальними реакціями на чинники, які несприятливо впливають на легені, у моделях астми, фіброзу легенів та канцерогенезу, бактеріальних та вірусних інфекцій і впливу кисню та озону (Plopper, 2006; Lee, 2006; Yang, 2004; Wang, 2003; Harrod, 2002; Chen, 2001; Wang, 2001; Hayashida, 2000; Harrod, 1998). Відновлення функції CC10 у цих нокаутних мишей із застосуванням рекомбінантного CC10 людини (rhCC10), як було продемонстровано, послаблює надмірні запальні реакції у легенях у моделях з провокаційною пробою протягом короткого періоду часу з кінцевою точкою до 7 днів (Chen, 2001; Wang, 2003). Що найбільшою мірою стосується даного винаходу, обидві лінії мають фенотип епітелію повітроносних шляхів, що характеризується значно зниженою кількістю клітин Клара та асоційованих структур, що називаються нейроепітеліальними тільцями (NEB; Castro, 2000) або кластерами нейроендокринних клітин (NEC; Hong, 2001; Reynolds, 2000), як виявлено за допомогою позитивного фарбування на білок 1, пов'язаний з геном кальцитоніну (CGRP1). Це зниження кількості клітин Клара та асоційованих структур у 2-10 разів у повітроносних шляхах виникає за відсутності будь-якого типу uszkodження у цих мишей KO.

Недоношені діти, у яких виникає респіраторний дистрес-синдром (RDS), мають недостатню кількість нативного CC10. У клінічному дослідженні одну дозу rhCC10 вводили у день народження та опосередковували сильні короткострокові протизапальні ефекти протягом 3-7 днів у легенях. Аналізи фармакокінетики продемонстрували, що надлишок CC10 виводився протягом 48 годин після введення однієї дози. Незважаючи на протизапальні ефекти, rhCC10 не попереджає розвиток бронхолегеневої дисплазії у новонароджених (BPD) (Levine, 2005), як було визначено за допомогою клінічних параметрів, у тому числі 1) затемнення на рентгенограмі грудної клітки через 28 днів після народження або 2) застосування додаткового кисню при гестаційному віці 36 тижнів (PMA). rhCC10 не зменшує період госпіталізації або кількість днів із застосуванням апарату штучної вентиляції легенів, незважаючи на значне зниження показників запалення легенів, що спостерігали із використанням рідини, аспірованої із

трахеї (ТАФ). Не спостерігали різниці між групами з застосуванням плацебо, лікуванням низькими дозами та високими дозами з кінцевою точкою 12 місяців, як викладено у Levine et al. (2005).

У недоношених дітей з BPD спостерігається схильність до виникнення частих та важких загострень захворювання дихальної системи та при цьому частота їх повторної госпіталізації у перші 1-2 роки життя є високою. Важкі загострення захворювання дихальної системи характеризуються задишкою, утрудненим диханням, закладеністю носа та грудей, надмірним утворенням слизу та іноді респіраторним дистресом. Важкі загострення захворювання дихальної системи спостерігаються, коли на пацієнтів здійснюється вплив факторів навколишнього середовища та інфекцій при вдиханні пилу, диму, алергенів, забруднювачів, хімічних речовин, бактерій, грибів та вірусів.

Багато категорій пацієнтів з хронічними захворюваннями дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, урогенітального тракту схильні до важких загострень під впливом провокуючого фактора навколишнього середовища. Аналогічно, пацієнти із захворюваннями імунної системи, у тому числі аутоімунними та алергічними захворюваннями, також схильні до важких загострень під впливом провокуючого фактора навколишнього середовища. Важкі або сильні загострення вважаються частими, якщо вони відбуваються у пацієнта більш ніж 3 рази на рік. Навіть пацієнти, у яких немає хронічного захворювання, але які зазнають гострого ушкодження легенів (ALI), після ушкодження схильні до частих та важких гострих респіраторних епізодів, що схожі на важкі загострення захворювання дихальної системи. Подразники з навколишнього середовища, які провокують загострення, включають без обмеження пил, тверді частинки, дим, алергени, забруднювачі, хімічні речовини, забруднюючі речовини, бактерії, гриби та віруси, що можуть вдихатися, потрапляти в травну систему, ковтатися, поглинатися через шкіру або іншим шляхом вступати в місцевий контакт з вологою слизовою оболонкою і поверхні організму пацієнта.

Об'єкти винаходу

Виходячи з викладеного вище надається невиключний перелік цілей, що досягаються за допомогою даного винаходу.

Основним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання протягом до 10 місяців після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом до 10 місяців після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення rhCC10 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом до 10 місяців після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення rhSCGB3A2 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом до 10 місяців після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення rhSCGB3A1 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом до 10 місяців після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання протягом щонайменше одного місяця після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом щонайменше одного місяця після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення rhCC10 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом щонайменше одного місяця після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення rhSCGB3A2 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом щонайменше одного місяця після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення rhSCGB3A1 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення основного або хронічного захворювання дихальної системи протягом щонайменше місяця після введення секретоглобіну.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну для збільшення проміжку

часу від одного важкого загострення до наступного у пацієнтів, у яких, як правило, виникають повторні загострення хронічних захворювань.

5 Ще одним об'єктом даного винаходу є збільшення проміжку часу від одного важкого загострення до наступного протягом до 10 місяців після терапії за допомогою дози або курсу секретоглобіну дихальної системи у пацієнтів, у яких виникають повторні загострення хронічних захворювань.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення проміжку часу від одного важкого загострення до наступного у пацієнтів, у яких виникають повторні загострення хронічних захворювань дихальної системи.

10 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для попередження важкого гострого респіраторного епізоду, що схожий на загострення, у пацієнта, який зазнав гострого ушкодження легенів, але у якого хронічне захворювання дихальної системи не було діагностовано до ушкодження.

15 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для попередження важкого загострення після впливу подразника, що вдихається, здатного провокувати загострення, у сприйнятливих пацієнтів з хронічним захворюванням дихальної системи.

20 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну для збільшення проміжку часу від одного важкого загострення аутоімунного захворювання до наступного у пацієнтів, у яких виникають повторні загострення хронічних аутоімунних захворювань.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення проміжку часу від одного важкого загострення до наступного у пацієнтів, у яких виникають часті загострення хронічних захворювань дихальної системи.

25 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення проміжку часу від одного важкого загострення аутоімунного захворювання до наступного у пацієнтів, у яких виникають часті загострення хронічних аутоімунних захворювань.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну під час або після попереднього загострення для попередження наступного загострення.

30 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну за допомогою внутрішньовенної ін'єкції, інтратрахеального вливання, інгаляції, інтраназального вливання, пероральним шляхом, сублінгвальним шляхом або за допомогою крему, гелю або супозиторія для анального або вагінального застосування.

Додатковим об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості секреторних епітеліальних клітин, відмінних від миготливих, та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки.

35 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості секреторних епітеліальних клітин, відмінних від миготливих, у дихальних шляхах, у тому числі верхніх та нижніх дихальних шляхах, та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

40 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості клітин Клара у дихальних шляхах та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

45 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості NEB та NEC у дихальних шляхах та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості одного або декількох нативних секретоглобінів дихальної системи, що циркулюють у крові.

50 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості одного або декількох нативних секретоглобінів дихальної системи, які були виявлені у рідині слизової оболонки, що вистилає повітроносні шляхи дихальної системи (ALF), носових ходів, трахеї або легенів, та/або мокротинні або індукованому мокротинні.

55 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості клітин, що секретують секретоглобін, у дихальних шляхах та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості клітин, що секретують SC10, у дихальних шляхах та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

60 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості клітин, що секретують SCGB3A2, у дихальних шляхах та, таким чином,

відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості клітин, що секретують SCGB3A1, у дихальних шляхах та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки та повітроносних шляхів дихальної системи.

5 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості епітеліальних клітин, що секретують CC10, у жіночому уrogenітальному тракті та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки піхви.

10 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи для збільшення кількості епітеліальних клітин, що секретують CC10, у шлунково-кишковому тракті, у тому числі у роті, горлі, стравоході, шлунку, підшлунковій залозі, жовчних протоках, верхньому та нижньому відділі кишечника і товстій кишці, та, таким чином, відновлення тканин слизової оболонки шлунково-кишкового тракту.

Ще одним об'єктом даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції на основі SCGB3A2 людини з N-кінцем АТА, відмінним від нативного.

15 Ще одним об'єктом даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції на основі SCGB3A2 людини з ізоелектричною точкою, що дорівнює 6,7.

Ще одним об'єктом даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції на основі SCGB3A2 людини з ізоелектричною точкою, що дорівнює 6,3.

20 Ще одним об'єктом даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції на основі SCGB3A2 людини з комбінацією ізоформ з ізоелектричними точками, що дорівнюють 6,3 та 6,7.

Ще одним об'єктом даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції на основі рекомбінантного SCGB3A2 людини, синтезованого у вигляді злиття з іншим білком.

Ще одним об'єктом даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції на основі рекомбінантного SCGB3A2 людини, синтезованого у вигляді злиття з убіквітин-подібним білком.

25 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення бронхоектазу у пацієнта, у якого було діагностовано бронхоектаз.

30 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення фіброзу легенів у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип фіброзу легенів.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення муковісцидозу у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип муковісцидозу.

35 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення COPD у пацієнта, у якого було діагностовано COPD.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення хронічного бронхіту у пацієнта, у якого було діагностовано хронічний бронхіт.

40 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення емфіземи у пацієнта, у якого було діагностовано емфізему.

45 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення астми у пацієнта, у якого було діагностовано астму.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення BPD у пацієнта, у якого було діагностовано BPD.

50 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення секретоглобіну дихальної системи людини для відстрочення або попередження загострення синдрому аспірації меконію (MAS) у пацієнта, у якого було діагностовано MAS.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення CC10 людини для відстрочення або попередження загострення бронхоектазу у пацієнта, у якого було діагностовано бронхоектаз.

55 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення CC10 людини для відстрочення або попередження загострення фіброзу легенів у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип фіброзу легенів.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення CC10 людини для відстрочення або попередження загострення муковісцидозу у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип муковісцидозу.

60 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення CC10 людини для відстрочення або

попередження загострення COPD у пацієнта, у якого було діагностовано COPD.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення СС10 людини для відстрочення або попередження загострення хронічного бронхіту у пацієнта, у якого було діагновствано хронічний бронхіт.

5 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення СС10 людини для відстрочення або попередження загострення емфіземи у пацієнта, у якого було діагностовано емфізему.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення СС10 людини для відстрочення або попередження загострення астми у пацієнта, у якого було діагновостовано астму.

10 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення СС10 людини для відстрочення або попередження загострення BPD у пацієнта, у якого було діагновано BPD.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення CC10 людини для відстрочення або попередження загострення синдрому аспірації меконію (MAS) у пацієнта, у якого було діагновостовано MAS.

15 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення бронхоектазу у пацієнта, у якого було діагновостовано бронхоектаз.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення фіброзу легенів у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип фіброзу легенів.

20 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення муковісцидозу у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип муковісцидозу.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення COPD у пацієнта, у якого було діагновено COPD.

25 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення хронічного бронхіту у пацієнта, у якого було діагновостовано хронічний бронхіт.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення емфіземи у пацієнта, у якого було діагновано емфізему.

30 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення астми у пацієнта, у якого було діагновостовано астму.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення BPD у пацієнта, у якого було діагностовано BPD.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A2 людини для відстрочення або попередження загострення синдрому аспірації меконію (MAS) у пацієнта, у якого було діагностовано MAS.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення бронхоектазу у пацієнта, у якого було діагновостовано бронхоектаз.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення фіброзу легенів у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип фіброзу легенів.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення муковісцидозу у пацієнта, у якого було діагностовано певний тип муковісцидозу.

45 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення COPD у пацієнта, у якого було діагновено COPD.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення хронічного бронхіту у пацієнта, у якого було діагностовано хронічний бронхіт.

50 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення емфіземи у пацієнта, у якого було діагностовано емфізему.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення астми у пацієнта, у якого було діагновостовано астму.

Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення BPD у пацієнта, у якого було діагновостовано BPD.

55 Ще одним об'єктом даного винаходу є введення SCGB3A1 людини для відстрочення або попередження загострення синдрому аспірації меконію (MAS) у пацієнта, у якого було діагностовано MAS.

Короткий опис винаходу

60 Секретоглобіни, які експресуються у дихальних шляхах, забезпечують розвиток клітин Клара та інших епітеліальних клітин дихальної системи та резидентних структур імунної

системи у функціональному епітелії дихальної системи. Існують три секретоглобіни, які характеризуються високим рівнем експресії у дихальних шляхах людини, у тому числі SCGB1A1 (також відомий під назвою CC10, утероглобін, CCSP, CC16 і т.ін.), SCGB3A2 (також відомий під назвою UGRP1, HIN-2) та SCGB3A1 (також відомий під назвою UGRP2, HIN-1).

Даний винахід в цілому відноситься до застосування секретоглобінів дихальної системи для відстрочення та попередження важких загострень хронічних захворювань, спричинених впливом факторів навколишнього середовища, зокрема захворювань дихальної системи. На рівні тканини секретоглобіни дихальної системи опосередковують збільшення кількості клітин, що секретують секретоглобін, та асоційованих структур у тканинах дихальної системи, що можна вимірювати опосередковано за збільшенням кількості продуктів секреції секретоглобіну у рідинах організму. Наприклад, введення rhCC10 опосередковує збільшення кількості клітин Клара, NEB та NEC із відновленням епітелію повітроносних шляхів дихальної системи. На сьогоднішній день ця гіпотеза є єдиною, яка узгоджується з фенотипом епітелію повітроносних шляхів у мишей CC10 KO та пояснює дані щодо недоношених дітей, пов'язані з дуже сильним довготривалим захистом від важких загострень захворювання дихальної системи, але відсутністю попередження BPD новонароджених, що являє собою тип фіброзу легенів.

Хоча rhCC10 не запобігає розвитку BPD новонароджених, він надає довготривалий захист від важких загострень захворювання дихальної системи, за яких потрібна повторна госпіталізація, при цьому цей захист спостерігали у 6 місяців PMA, який є моментом часу, за якого вік дитини був би 6 місяців після 40 тижнів вагітності. Оскільки у дослідження залучали дітей у 24-28 тижнів PMA, ця кінцева точка являє собою до 10 місяців після однієї дози rhCC10.

Короткий опис графічних матеріалів

Фігура 1. Амінокислотні послідовності SCGB3A2 людини, вирівнювання амінокислотних послідовностей SCGB3A2 людини з порівнянням передбаченого та дійсного N-кінців.

Фігура 2. SDS-PAGE очищеного rhSCGB3A2, SDS-PAGE очищеного rhSCGB3A2. Зразки, кожний з яких містив 5 мікрограм, з 1 mM DTT та без 1 mM DTT, змішували з буфером для зразка, що містив SDS, кип'ятили 5 хвилин та завантажували на гель з 10-20% трицину. Здійснювали електрофорез та фарбували Coomassie R250. Гель знебарвлювали та одержували зображення за допомогою цифрової фотокамери.

Фігура 3. Ізоелектричне фокусування очищеного rhSCGB3A2, ізоелектричне фокусування очищеного rhSCGB3A2 у порівнянні з rhCC10 та UBL і Den-1. Зразки, кожний з яких містив 5 мікрограм, завантажували на гель Novex IEF. Здійснювали електрофорез та фарбували Coomassie R250. Гель знебарвлювали та одержували зображення за допомогою цифрової фотокамери. Стрілки вказують на основну та менш поширену ізоформу rhSCGB3A2 з N-кінцем ATA.

Фігура 4. In vitro інгібування sPLA₂-1B із застосуванням панелі A rhSCGB3A2: субстрат UNIBIPY; без PLA₂; без rhSCGB3A2. Панель B: субстрат UNIBIPY з PLA₂; без rhSCGB3A2. Панель C: субстрат UNIBIPY з PLA₂, а також з rhSCGB3A2. Пік № 1 являє собою субстрат на основі фосфоліпіда UNIBIPY, пік № 2 являє собою продукт після розщеплення із використанням sPLA₂.

Фігура 5. Вестерн-блотинг SCGB3A2 із TAF людини. Вестерн-блотинг рідини, аспірованої із трахеї, одержаної від дітей, у порівнянні з очищеним rhSCGB3A2 з використанням поліклонального антитіла кролика проти rhSCGB3A2. Зразки, кожний з яких містив 20 мікролітрів TAF, завантажували на гель Novex з 10-20% трицину; причому rhSCGB3A2 представлений на доріжці 1 (5 нанограм) та доріжці 8 (1 нанограм). Гель знебарвлювали та одержували зображення за допомогою цифрової фотокамери.

Докладний опис

Три окремі факти об'єднували для створення даного винаходу; у тому числі 1) довготривалий захист від важких загострень захворювання дихальної системи та повторної госпіталізації за допомогою однієї дози rhCC10, що спостерігали у недоношених дітей, 2) фенотип епітелію повітроносних шляхів у мишей CC10 KO та 3) властивості "фактору росту" у SCGB3A2 (Guha, 2012; Kurotani, 2008; Kurotani, 2008a; Inoue, 2008; Niimi, 2001). Незважаючи на дослідження протягом багатьох років, немає єдиного погляду на роль CC10 в епітелії дихальної системи, крім того, що він опосередковує протизапальні ефекти. Нещодавно невдача клінічного дослідження у моделі алергічного риніту з провокаційною пробою за допомогою введення алергену в порожнину носа продемонструвала, що навіть його протизапальні ефекти in vivo не є однаковими проти всіх типів запальних захворювань (Widegren, 2009). Також, незважаючи на повну відсутність CC10, клітини Клара все ще були виявлені у дихальних шляхах обох ліній мишей CC10 KO. Хоча CC10 та SCGB3A2 є подібними за структурою, та, отже, як вважається, мають деякі однакові функції, не повідомлялося про стимуляцію росту або розвитку

епітеліальних клітин повітроносних шляхів за допомогою CC10, до того ж rhCC10, фактично, як добре відомо, пригнічує ріст пухлинних клітин епітеліального походження (Kundu, 1996; Leyton, 1994), у тому числі лінії епітеліальних клітин повітроносних шляхів A549 (Szabo, 1998).

Все ж таки, автори вважають, що rhCC10, який вводили недоношеним дітям у день народження, стимулював розвиток клітин, що секретують CC10, які, у свою чергу, продукували нативні CC10, які стимулювали розвиток більшої кількості клітин, що секретують CC10, і так далі. Кінцевим результатом був більш нормальний та життєздатний епітелій дихальної системи у дітей, яких лікували за допомогою rhCC10, які були більш витривалими до несприятливих чинників навколишнього середовища (пил, дим, алергени, інфекція RSV, інфекція вірусом грипу і т.ін.) у порівнянні з дітьми, яких лікували із використанням плацебо. Одна доза rhCC10 у день народження надавала 100% захист від повторної госпіталізації внаслідок важкого загострення захворювання дихальної системи порівняно з 50% показником повторної госпіталізації, що спостерігалось у дітей, яких лікували із використанням плацебо.

Також автори вважають, що застосування CC10 для стимуляції розвитку клітин, що секретують CC10, в епітелії дихальної системи також буде давати результат у дорослих з хронічними захворюваннями дихальної системи, за яких зміна структури дихальних шляхів приводила у результаті до втрати клітин Клара. Курс лікування із використанням rhCC10 може невилікувати захворювання, але, як вважають автори, буде деякою мірою відновлювати клітини Клара та асоційовані структури, що приводить у результаті до більш нормального епітелію, який у цьому випадку є більш витривалим до подальших несприятливих чинників навколишнього середовища. Клінічним результатом курсу лікування за допомогою rhCC10 у цьому випадку буде збільшення проміжку часу до наступного важкого загострення.

Також автори вважають, що фенотип епітелію повітроносних шляхів з недостатньою кількістю клітин Клара у мишей CC10 KO дозволяє припустити, що CC10 являє собою аутокринний та паракринний фактор, необхідний для розвитку клітин Клара, асоційованих структур, та інших нормальних популяцій клітин епітелію повітроносних шляхів. Автори вважають, що CC10 являє собою аутокринний та паракринний фактор, необхідний для розвитку та підтримання клітин, що секретують CC10, за межами дихальних шляхів, у тому числі у шлунково-кишковому тракті та урогенітальному тракті. Існує багато міркувань, що оскільки секретоглобіни характеризуються структурною подібністю, вони також характеризуються подібною функцією, однак, як було продемонстровано раніше, будь-які два секретоглобіни ні в якому випадку не характеризувалися однаковою біологічною активністю, ані *in vitro*, ані *in vivo*. У даному документі автори повідомляють, що rhSCGB3A2 та CC10 характеризуються здатністю інгібувати фосфоліпазу A₂ із підшлункової залози свиней *in vitro*. Це перше повідомлення про те, що який-небудь інший секретоглобін, крім CC10, дійсно інгібує яку-небудь фосфоліпазу A₂ або характеризується будь-яким типом протизапальної активності. Виходячи з цих результатів, автори дійшли висновку, що інші секретоглобіни, у тому числі секретоглобіни дихальної системи, які характеризуються структурною подібністю з rhCC10, можуть стимулювати розвиток та підтримання клітин, що секретують їх, із досягненням довготривалого клінічного результату, наприклад, збільшення проміжку часу до наступного загострення, зменшення важкості наступного загострення та попередження важких загострень після гострого ушкодження.

Приклади

Приклад 1. Довготривалий захист за допомогою rhCC10 у недоношених дітей з RDS

Безпеку, фармакокінетичні властивості та протизапальні властивості rhCC10 оцінювали у рандомізованому, плацебо-контрольованому, подвійному сліпому, багатоцентровому дослідженні за участю 22 недоношених дітей з респіраторним дистрес-синдромом (RDS) з середнім значенням маси при народженні 932 г та середньому значенні гестаційного віку 26,9 тижня, які одержували одну інтратрахеальну (IT) дозу плацебо (n=7), 1,5 мг/кг (n=8) або 5,0 мг/кг (n = 7) rhCC10 після лікування за допомогою сурфактанта (Levine, 2005). Діти, яких лікували за допомогою rhCC10, демонстрували значуще зменшення загальної кількості клітин у TAF (P<0,001), кількості нейтрофілів (P<0,001) і значень концентрації загального білка (P<0,01) та зниження IL-6 (P<0,07) протягом перших 3 днів життя. rhCC10 був безпечним та характеризувався хорошою переносимістю.

Слід відзначити, незважаючи на невелику кількість учасників дослідження, що при подальшому спостереженні 17 дітей у 6 місяців з поправкою на гестаційний вік (SGA) виявили, що 0 з 11, які одержували rhCC10, були повторно госпіталізовані, що обумовлено причинами, пов'язаними з дихальною системою, у порівнянні з 3 із 6, які одержували плацебо, як показано у таблиці 2 (P<0,05, точний критерій Фішера, двосторонній).

Таблиця 2

Повторні госпіталізації, обумовлені важкими загостреннями захворювання дихальної системи

	6 місяців CGA
Плацебо (7 залучених у дослідження)	3/6
1,5 мг/кг (8 залучених у дослідження)	0/6
5 мг/кг (7 залучених у дослідження)	0/5

Цей результат є навіть більш значним, якщо взяти до уваги, що 6 місяців CGA, у цьому випадку, означає період часу, що відповідає 6 місяцям після того, як дитина прожила б 40 тижнів вагітності, та при цьому деякі діти у дослідженні при народженні мали гестаційний вік 24 тижні (РМА), таким чином момент часу подальшого спостереження 6 місяців CGA настав аж через 10 місяців після введення однієї дози rhCC10 у день народження. З точки зору статистики, результати продемонстрували щонайменше 57% частоту повторної госпіталізації у групі плацебо порівняно із щонайменше 27% у групі rhCC10. Спостерігали дуже потужний довготривалий ефект, та при цьому ці дані проілюстрували значущий та безпрецедентний довготривалий результат введення rhCC10.

Виявлення такого суттєвого довготривалого результату є навіть більш значним, після того, як аналізи фармакокінетики продемонстрували, що надлишок CC10 виводився протягом 48 годин після введення, причому час напівжиття у сироватці крові складав 9-11 годин (Levine, 2005). Значну кількість rhCC10 спостерігали у рідині, аспірованій із трахеї, протягом приблизно 2 днів, та він досягав концентрації у сироватці крові до моменту часу 6 годин, але потім відфільтровувався нирками та виділявся з сечею до моменту часу 12 годин. rhCC10 відповідав природному фізіологічному шляху розподілу із легень у кров, а далі у сечу та продемонстрував довготривалі результати, незважаючи на швидке виведення.

Приклад 2. Клонування та експресія rhSCGB3A2

На Фігурі 1 показана амінокислотна послідовність rhSCGB3A2, що був одержаний для цих досліджень. Використовували послідовність з ідентифікатором в Genbank AAQ89338. У результаті способу одержання рекомбінантного продукту з використанням системи злиття на основі убіквітин-подібного білка (UBL) та вивільнення продукту у вигляді rhSCGB3A2 з UBL за допомогою UBL-протеази N-кінець відрізняється від N-кінців, передбачених для нативного білка з використанням консенсусних сайтів розщеплення одного пептиду для секретованих білків ссавців. Також він відрізняється від N-кінців дійсних пептидів, виділених із зразків біологічної рідини людини. Викладений перший опис синтезу SCGB3A2 людини без гістидинової мітки для очищення, та при цьому ефекти N-кінця на стабільність та активність білка не можна передбачити. Амінокислотна послідовність rhSCGB3A2 була показана у таблиці 1 та мала передбачену молекулярну масу 8147,82 дальтона та передбачену ізоелектричну точку, що дорівнювала 6,1.

Синтетична кодуєча послідовність ДНК для rhSCGB3A2 була створена за допомогою jcat (www.jcat.de) з оптимізацією згідно з частотою використання кодонів для експресії у бактеріях E. coli штаму K12. Після одержання послідовності ДНК додавали сайти рестрикції на кінцях для забезпечення спрямованого клонування гена у бактеріальний вектор експресії, pTXB1, що вже містив UBL. SCGB3A2 клонували як продовження UBL по С-кінцю. Сайт AflIII розташовували на 5'-кінці та сайт BamHI розташовували на 3'-кінці для спрямованого клонування.

Новий ген для rhSCGB3A2 синтезували з використанням олігонуклеотидів, що перекриваються, за допомогою ПЛР. Послідовність ДНК для гена rhSCGB3A2 була наступною:

CTTAAGAGGTGGTGGTACCGCTTTCCTGATCAACAAAGTTCCGCTGCCGGTTGACAAACTGG
 STCCGCTGCCGCTGGACAACATCCTGCCGTTTCATGGACCCGCTGAAACTGCTGCTGAAAACCCCT
 GGGTATCTCTGTTGAACACCTGGTTGAAGGTCTGCGTAAATGCGTTAACGAAGTGGGTCCGGAA
 GCTTCTGAAGCTGTTAAAAAACTGCTGGAAGCTCTGTCTCACCTGGTTTAAAGTAAAGGATCC.

Плазмідною рTXB1, що містила злиття UBL-rhSCGB3A2, трансформували E. coli штаму HMS174/DE3, які містили профаг DE3, що кодує РНК-полімеразу T7, яка забезпечує індукцибельну експресію білка злиття. Проводили скринінг колоній щодо експресії білка злиття, та при цьому присутність гена rhSCGB3A2 повторно підтверджували за допомогою секвенування ДНК у випадку високого рівня експресії.

Чотири літри культури для ферментації, що містила середовище SuperBroth з ампіциліном, інокулювали 120 мл культури, одержаної протягом ночі, клону з найвищим рівнем експресії та вирощували при 37°C. У культурі індукували надекспресію білка злиття UBL-rhSCGB3A2 при

значенні OD₆₀₀, що дорівнювало 8,75, із використанням 0,3 мМ IPTG, далі давали можливість рости протягом ще 2 годин. Клітинну масу збирали за допомогою центрифугування, та при цьому вихід вологої клітинної маси складав 67 грамів. Клітинну масу далі використовували для очищення rhSCGB3A2.

5 Приклад 3. Очищення rhSCGB3A2

Клітинну масу ресуспендували у 20 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, pH 7,2, далі клітини руйнували за допомогою заморожування-відтавання з одержанням неочищеного лізату. Неочищений лізат очищували від домішок за допомогою центрифугування при 19800 x g протягом 20 хвилин при 4°C. ДНК, ендотоксини та інші забруднюючі речовини бактеріального походження осаджували із супернатанта очищеного від домішок лізату із використанням поліетиленіміну (PEI) при концентрації 0,025% та другого центрифугування при 19800 x g протягом 10 хвилин при 4°C. Супернатант з PEI далі фільтрували через 0,22 мікронний фільтр та до фільтрату додавали 10 мМ імідазолу. Як UBL, так і UBL-протеаза містила гістидинову мітку, таким чином вони зв'язувалися з іммобілізованими іонами металів у колонці для афінної хроматографії. Фільтрат, що містив білок злиття UBL-rhSCGB3A2, далі пропускали через колонку IMAC (Chelating Sepharose Fast Flow з іонами нікелю), попередньо урівноважену за допомогою 20 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 10 мМ імідазолу, pH 7,2, причому колонку промивали тим же буфером, далі білок злиття UBL-rhSCGB3A2 елюювали 20 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 300 мМ імідазолу, pH 7,2. Елюат із IMAC далі концентрували та замінювали буфер за допомогою фільтрації тангенційним потоком із використанням 5 кДа фільтра NMWCO у 15 мМ Tris, 15 мМ BisTris, 40 мМ NaCl, pH 7,0. UBL-rhSCGB3A2 додатково очищували за допомогою колонки Macro Prep High Q (BioRad), у якій зв'язувалися забруднюючі речовини, а UBL-rhSCGB3A2 проходив через неї. rhSCGB3A2 далі відокремлювали від UBL шляхом розщеплення за допомогою UBL-протеази Den-1 (молярне співвідношення 1:100) у 5 мМ DTT, причому pH доводили до 6,5 за допомогою HCl, при 37°C протягом 2 годин. rhSCGB3A2 далі очищували із суміші продуктів розщеплення за допомогою катіонообмінної хроматографії (GE Sepharose SP High Performance). Колонку SP урівноважували за допомогою 15 мМ Tris, 15 мМ BisTris, 40 мМ NaCl, pH 6,5, завантажували суміш продуктів розщеплення, та при цьому забруднюючі речовини зв'язувалися з колонкою, у той час як rhSCGB3A2 проходив через неї. Далі здійснювали інтенсивний діаліз того, що пройшло через SP, проти 0,9% NaCl із використанням 3,5 кДа мембрани MWCO із регенованої целюлози. Зразок концентрували із використанням центрифуг-концентраторів (3,5 кДа MWCO), далі фільтрували через 0,22 мікронний фільтр. Фільтрат являв собою очищений rhSCGB3A2. На Фігурі 2 показаний аналіз остаточно очищеного білка за допомогою SDS-PAGE. Він був чистим на >97%, як визначено за допомогою денситометрії при SDS-PAGE, та містив приблизно 95% димера та 5% мономера. Як і rhCC10, важко повністю відновити димер з одержанням мономера з використанням відновника.

35 Приклад 4. Ізоелектрична точка для rhSCGB3A2

Ізоелектрична точка (pI) білка являє собою міру загального поверхневого заряду цього білка. Значення pI вимірюють із використанням стандартних способів ізоелектричного фокусування (IEF). Приблизно 5 мікрограм rhSCGB3A2, rhCC10, UBL та Den-1 завантажували на гель IEF (Novex) для визначення pI rhSCGB3A2, як показано на Фігурі 3. Якщо білок мігрує у вигляді однієї смуги при SDS-PAGE, а у гелі IEF спостерігають декілька смуг, то, ймовірно, що присутні альтернативні ізоформи білка. На відміну від rhCC10, який характеризується однією смугою при pI 4,8, rhSCGB3A2 характеризується двома смугами при pI 6,7 та 6,3. Передбачене значення pI для послідовності rhSCGB3A2 згідно з даним винаходом дорівнює 6,1 (www.exrasy.edu; інструмент для білка "Розрахувати MW/pI"), при цьому абсолютна більшість молекул білка мігрує у положення, що відповідає значенню pI 6,7. Навіть менша смуга при 6,3 не відповідає передбаченому значенню pI 6,1. Те, що існують дві смуги rhSCGB3A2 в IEF, означає, що або присутні альтернативно згорнуті ізоформи, або вони відображають мономери та димери, як наочно представлено за допомогою SDS-PAGE у невідновлювальних умовах.

За допомогою цих значень pI також продемонстровано, що цей препарат являє собою невідому та непередбачену ізоформу rhSCGB3A2, що є унікальною. Унікальний патерн згортання рекомбінантного білка часто визначають за допомогою способу синтезу, у цьому випадку, вибору N-кінця, експресії білка у вигляді C-кінцевого злиття з убіквітин-подібним білком, очищення білка злиття за допомогою IMAC, відщеплення SCGB3A2 від UBL та відокремлення SCGB3A2 від UBL та UBL-протеази. Таким чином, унікальність цього препарату може бути обумовлена способом синтезу, N-кінцем, відмінним від нативного, або поєднанням цих або інших невідомих факторів.

55 Приклад 5. Інгібування PLA₂ за допомогою rhSCGB3A2

60 Біологічну активність rhSCGB3A2 оцінювали за допомогою кількісного аналізу HPLC з

детектором флуоресценції, в якому оцінювали інгібування секреторного ферменту PLA₂ (sPLA₂) із підшлункової залози свиней, причому аналіз був розроблений для оцінки ефективності різних партій rhCC10. Інгібування ферментів PLA₂ вважається основним протизапальним механізмом дії CC10. Існує багато міркувань, що інші секретоглобіни також можуть інгібувати ферменти PLA₂, внаслідок їх структурної подібності з CC10. rhSCGB3A2 (5,5 мікрограма) змішували зі 100 нанограмами свинячого sPLA₂ 1B (0,1 мікрограма) та інкубували при 37°C. Реакцію починали з додавання флуоресцентного аналога фосфоліпіда 2-деканойл-1-(O-(11-(4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-діаза-8-індацен-3-пропіоніл)аміно)ундецил)-sn-гліцеро-3-фосфохоліну (також відомого під назвою UNIBIPY; 47,6 нанограма). Через 15 хвилин реакцію припиняли за допомогою додавання 2-пропанолу/н-гексану. Продукт розщеплення відокремлювали від субстрату за допомогою колонки для HPLC на силікагелі Waters Spherisorb. Продукт відокремлення проходив через детектор флуоресценції G1321A.

Результати аналізу показані на Фігурі 4. На панелі А показаний субстрат UNIBIPY без sPLA₂ або rhSCGB3A2; на панелі В показаний субстрат UNIBIPY з sPLA₂, та на панелі С показаний субстрат UNIBIPY з sPLA₂, а також з rhSCGB3A2. sPLA₂ розщеплює субстрат (пік № 1), що приводить до одержання продукту (пік № 2). У присутності rhSCGB3A2 спостерігається значуще зменшення піка продукту. Кожну реакцію проводили у двох повторностях. В аналізі rhSCGB3A2 продемонстрував 83% інгібування активності sPLA₂-1B, що можна порівняти з білком rhCC10 (дані не показані).

Процентне інгібування розраховували наступним чином:

$$\% \text{ інгібування} = \{1 - (\text{середня площа для продукту розщеплення з rhSCGB3A2} / \text{середня площа для продукту розщеплення без rhSCGB3A2})\} \times 100$$

Дійшли висновку, що rhSCGB3A2 інгібує sPLA₂ із підшлункової залози свиней та рівень активності можна порівняти з rhCC10.

Приклад 6. Порівняння rhSCGB3A2 з нативним SCGB3A2 у біологічних рідинах людини

Очищений rhSCGB3A2 використовували для імунізації двох новозеландських білих кроликів із використанням стандартного протоколу імунізації. Білок був кон'югований з KLH, його змішували з ад'ювантом Фрейнда та вводили тваринам шляхом ін'єкції. У обох тварин спостерігали чудовий рівень імунної відповіді з дуже високими титрами. IgG очищували із кожного набору зразків сироватки крові тварин із використанням набору Pierce Protein A IgG Purification Kit та очищені IgG діалізували в PBS, pH 7,2, відбирали аліквоти та зберігали при -80°C.

Антитіла якісно визначали за допомогою вестерн-блотингу із використанням рідини, аспірованої із трахеї (TAF), одержаної від недоношених дітей. Зразки, що містили 20 мікролітрів TAF, від 6 дітей аналізували за допомогою SDS-PAGE у невідновлювальних умовах та порівнювали з rhSCGB3A2 (5 нанограм). Здійснювали електроблотинг із гелю на мембрану PVDF, блокували 4% знежиреним молоком, далі з блотом інкубували найвищий титр IgG кролика проти rhSCGB3A2 (розведення 1:5000), а далі з кон'югатом антитіла кози проти IgG кролика з HRP (розведення 1:20000). Блот проявляли із використанням посиленої хемілюмінісценції (4IPBA-ECL - 100 mM Tris/HCl, pH 8,8, 1,25 mM люмінолу, 5,3 mM перекису водню та 2 mM 4IPBA). Смуги, що відповідають імунній реакції, з'явилися у 5 з 6 зразків TAF. Два зразки (доріжка 3 та доріжка 6) містили смуги, які мігрували, такого ж розміру, що і гомодимер rhSCGB3A2, що вказувало на те, що препарат rhSCGB3A2 був схожий на нативний SCGB3A2 людини у деяких пацієнтів. Гетерологічна експресія рекомбінантних білків, а саме гідрофобних білків, для застосування у дослідженнях на тваринах або за участю людей часто приводила до неправильно згорнутих, неактивних, імуногенних білків або препаратів, які не можна використовувати з іншої причини. Враховуючи те, що дійсний N-кінець нативного SCGB3A2 невідомий та значення pI для rhSCGB3A2 відрізняється від передбаченого, спостереження того, що щонайменше деякі зразки, одержані від людини, містили подібні білки, підтвердило синтетичний підхід, запропонований авторами, та препарат rhSCGB3A2. Всі 5 зразків, у яких відбувалась реакція, містили молекули з високою молекулярною масою порядку 200 кДа, та при цьому всі містили декілька окремих смуг, що мали розмір у діапазоні 8-13 кДа, причому деякі з них можуть відповідати мономерам, димерам та альтернативним ізоформам. Два зразки (доріжки 3 та 7) також містили плями, що відповідають імунній реакції, менше 3,5 кДа, що, ймовірно, відображають продукти розпаду SCGB3A2. Вперше нативний SCGB3A2 був візуалізований за допомогою вестерн-блотингу. Антитіло проти rhSCGB3A2, яке використовували для вестерн-блотингу, далі використовували для розробки ELISA щодо SCGB3A2 людини.

Приклад 7. Розробка ELISA щодо rhSCGB3A2

Конкурентний ELISA розробляли за допомогою стандартних способів. У форматі

конкурентного аналізу лунки мікротитрувального планшета покривають антитілом, за допомогою якого захоплюють мішень, далі молекулу мішені, кон'юговану з ферментом (мічену мішень), використовують для конкуренції з некон'югованою мішенню у зразку за зв'язування з доступними сайтами у лунці. Зі збільшенням концентрації мішені у зразку зменшується кількість міченої мішені, що зв'язується з лунками. Антитілом кролика проти rhSCGB3A2 покривали 96-лункові планшети Maxisorb (200 нг/лунка), далі лунки блокували 5% сахарози, 2,5% BSA у PBS, далі планшети висушували та зберігали при 4°C. Одержували кон'югат пероксидази хрому (HRP) та rhSCGB3A2 (набір Pierce - EZ-Link Maleimide Activated HRP kit, № у каталозі 31494) та використовували в аналізі із розведенням 1:130000. Калібратори (1-500 нг) одержували із використанням rhSCGB3A2 та одержували стандартну криву, як показано на Фігурі 6. Далі кількісно визначали нативний SCGB3A2 у зразках TAF, одержаних від людини, як показано у таблиці 3.

Таблиця 3

Нативний SCGB3A2 у TAF людини

Доріжка	Зразок	[SCGB3A2] (нг/мл)*
1	Rh-SCGB3A2 (5 нг)	
2	TAF дитини; білок 6	774
3	TAF дитини; білок 7	804
4	TAF дитини; білок 12	Не визначено
5	TAF дитини; білок 15	540
6	TAF дитини; білок 17	468
7	TAF дитини; білок 19	395
8	Rh-SCGB3A2 (1 нг)	

SCGB3A2 також вимірювали у зразках сироватки крові від 3 дорослих людей; причому одержали значення 0, 29 та 32 нг/мл. SCGB3A2 не можна було виявити у неконцентрованій сечі людини або у сечі, концентрованій у 10 разів. Межа визначення аналізу дорівнювала 5 нг/мл.

Приклад 8

а) Спосіб застосування rhCC10 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення захворювання дихальної системи у пацієнта з гострим ушкодженням легенів протягом періоду до десяти місяців після введення.

б) Спосіб застосування rhCC10 для попередження важкого загострення захворювання дихальної системи у пацієнта, у якого виникають часті загострення, протягом щонайменше одного місяця після введення.

в) Спосіб застосування rhCC10 для попередження госпіталізації внаслідок важких загострень захворювання дихальної системи у пацієнта з хронічним станом дихальної системи протягом періоду щонайменше один місяць після введення.

д) Спосіб згідно з будь-яким із прикладів а-с, де хронічний стан дихальної системи являє собою COPD.

е) Спосіб згідно з будь-яким із прикладів а-с, де хронічний стан дихальної системи являє собою астму.

ф) Спосіб застосування rhSCGB3A2 для попередження госпіталізації внаслідок важкого загострення захворювання дихальної системи у пацієнта з гострим ушкодженням легенів протягом періоду до десяти місяців після введення.

г) Спосіб застосування rhSCGB3A2 для попередження важкого загострення захворювання дихальної системи у пацієнта, у якого виникають часті загострення, протягом щонайменше двох місяців після введення.

х) Спосіб застосування rhSCGB3A2 для попередження госпіталізації внаслідок важких загострень захворювання дихальної системи у пацієнта з хронічним станом дихальної системи протягом періоду щонайменше один місяць після введення.

і) Спосіб застосування rhSCGB3A2 для попередження госпіталізації внаслідок важких загострень захворювання дихальної системи у пацієнта з хронічним станом дихальної системи протягом періоду щонайменше 2 місяці після введення.

ж) Спосіб згідно з будь-яким із прикладів г-і, де хронічний стан дихальної системи являє собою фіброз легенів.

к) Спосіб згідно з будь-яким із прикладів г-і, де хронічний стан дихальної системи являє

собою бронхоектаз.

SCGB3A2.

l) Композиція, яка містить рекомбінантний білок SCGB3A2 людини з N-кінцем АТА, що містить SEQ ID 1.

5 m) Спосіб синтезу рекомбінантного SCGB3A2 людини із застосуванням білка злиття на основі UBL та UBL-протеази, яка розпізнає партнера злиття та відщеплює партнера злиття від SCGB3A2 з вивільненням інтактного білка SCGB3A2 згідно з SEQ ID 1.

n) Фармацевтична композиція на основі rhSCGB3A2, який інгібує ферменти PLA₂.

10 o) Фармацевтична композиція на основі rhSCGB3A2, який мігрує в гелі для ізоелектричного фокусування так, що його положення відповідає ізоелектричній точці у діапазоні 6,3-6,7.

p) Фармацевтична композиція на основі rhSCGB3A2, який містить гомодимер.

q) Фармацевтична композиція на основі rhSCGB3A2, який містить гомодимер зі значенням pI, що дорівнює 6,7, який інгібує ферменти PLA₂.

15 У той час як даний винахід був описаний у зв'язку з тим, що в даний час вважається найбільш практичними та переважними варіантами здійснення, слід розуміти, що даний винахід не повинен обмежуватися розкритими варіантами здійснення, але, навпаки, передбачає охоплення різних модифікацій та еквівалентних структур, що знаходяться у межах сутності та об'єму формули винаходу, що додається.

Скорочення та визначення

20 CC10: 10 кДа білок клітин Клара;

CCSP: секреторний білок клітин Клара;

CC16: 16 кДа білок клітин Клара;

SCGB1A1: білок, який кодується геном SCGB1A1, причому він також називається CC10, CCSP, CC16, утероглобін;

25 SCGB3A1: білок, який кодується геном SCGB3A1, причому він також називається HIN-1 та UGRP2;

SCGB3A2: білок, який кодується геном SCGB3A2, причому він також називається HIN-2 та UGRP1;

HIN-1: білок 1 high-in-normal;

30 HIN-2: білок 2 high-in normal;

UGRP1: білок 1, пов'язаний з геном утероглобіну;

UGRP2: білок 2, пов'язаний з геном утероглобіну.

Секретоглобін: білок із родини структурно споріднених білків, що характеризуються чотирма мономерами у вигляді спіральних пучків, з'єднаними дисульфідними зв'язками.

35 Секретоглобіни дихальної системи: секретоглобіни, які характеризуються високим рівнем експресії та поширені у дихальних шляхах, у тому числі SCGB1A1, SCGB3A1 та SCGB3A2.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Кларасанц, Інк.

<120> Поліпшені способи застосування рекомбінантних секретоглобінів людини

<130> 116142/00500

<140> 13.843289

<141> 2013-03-15

<160> 10

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 250

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

cttaagagggt gggtctaccg ctctctgat caacaaagtt ccgctgcagg ttgacaaact 60

ggctccgctg ccgctggaca acatctgccc gttaaggac ccgctgaac tgcgtctgaa 120

aacctgggt atctctgttg aacacctggt tgaaggtctg cgttaaatgc gtaacgaact 180

gggtccgcaa gcttcgaag ctgttaaaa actgctggaa gctctgtctc acctggta 240

gttaaggatcc 250

<210> 2

<211> 93

<212> EUIOK

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Val Thr Ile Phe Leu Leu Val Thr Ile Ser Leu Cys Ser

1 5 10 15

Tyr Ser Ala Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp

20 25 30

Lys Leu Ala Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro

35 40 45

Leu Lys Leu Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val

50 55 60

Glu Gly Leu Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu

65 70 75 80

Ala Val Lys Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

85 90

<210> 3

<211> 75

<212> EUIOK

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu

1 5 10 15

Ala Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys

20 25 30

Leu Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly

35 40 45

Leu Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val

50 55 60

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

65 70 75

<210> 4

<211> 72

<212> BLUOK

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro Leu

1 5 10 15

Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu Leu

20 25 30

Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg Lys

35 40 45
 Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys Leu
 50 55 60
 Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
 65 70
 <210> 5
 <211> 73
 <212> BLTOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro
 1 5 10 15
 Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu
 20 25 30
 Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg
 35 40 45
 Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys
 50 55 60
 Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
 65 70

<210> 6

<211> 93

<212> BLTOK

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys Leu Val Thr Ile Phe Leu Leu Val Thr Ile Ser Leu Cys Ser

1 5 10 15

Tyr Ser Ala Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp

20 25 30

Lys Leu Ala Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro

35 40 45

Leu Lys Leu Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val

50 55 60

Glu Gly Leu Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu

65 70 75 80

Ala Val Lys Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

85 90

<210> 7

<211> 74

<212> BLTOK

<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala

1 5 10 15

Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu

20 25 30

Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu

35 40 45

Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys

50 55 60

Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

65 70

<210> 8

<211> 72

<212> EUFOX

<213> Homo sapiens

<400> 8

Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro Leu

1 5 10 15

Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu Leu

20 25 30
 Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg Lys
 35 40 45
 Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys Leu
 50 55 60
 Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
 65 70
 <210> 9
 <211> 58
 <212> BLOCK
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu
 20 25 30
 Arg Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys
 35 40 45
 Lys Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val
 50 55

<210> 10

<211> 73

<212> БІЛІОК

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Phe Leu Ile Asn Lys Val Pro Leu Pro Val Asp Lys Leu Ala Pro

1 5 10 15

Leu Pro Leu Asp Asn Ile Leu Pro Phe Met Asp Pro Leu Lys Leu Leu

20 25 30

Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ser Val Glu His Leu Val Glu Gly Leu Arg

35 40 45

Lys Cys Val Asn Glu Leu Gly Pro Glu Ala Ser Glu Ala Val Lys Lys

50 55 60

Leu Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Val

65 70

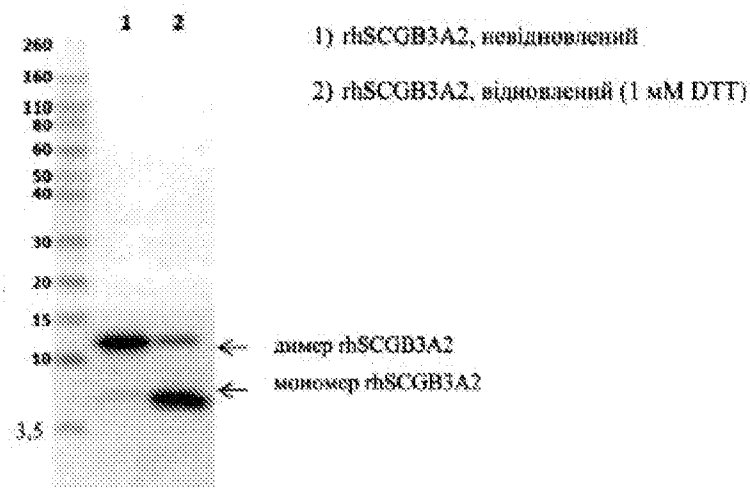
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Композиція для лікування захворювань дихальних шляхів, яка складається з рекомбінантного поліпептиду SCGB3A2 людини з N-кінцем ATA, а саме SEQ ID NO: 3.
2. Композиція за п. 1, де рекомбінантний поліпептид інгібує ферменти PLA2.
3. Композиція за п. 1, де рекомбінантний поліпептид мігрує в гелі для ізоелектричного фокусування так, що його положення відповідає ізоелектричній точці у діапазоні 6,3-6,7.
4. Композиція за п. 1, де рекомбінантний поліпептид є частиною гомодимеру.
5. Композиція за п. 4, де рекомбінантний поліпептид є частиною гомодимеру зі значенням pI, що дорівнює 6,7.
6. Спосіб синтезу рекомбінантного поліпептиду, згаданого в п. 1, який включає: застосування партнера злиття на основі UBL та UBL-протеази, вибір N-кінця, очищення партнера злиття за допомогою IMAC, де UBL-протеаза розпізнає партнера злиття на основі UBL та відщеплює партнера злиття на основі UBL від рекомбінантного поліпептиду, згаданого в п. 1, з вивільненням інтактного поліпептиду SCGB3A2.

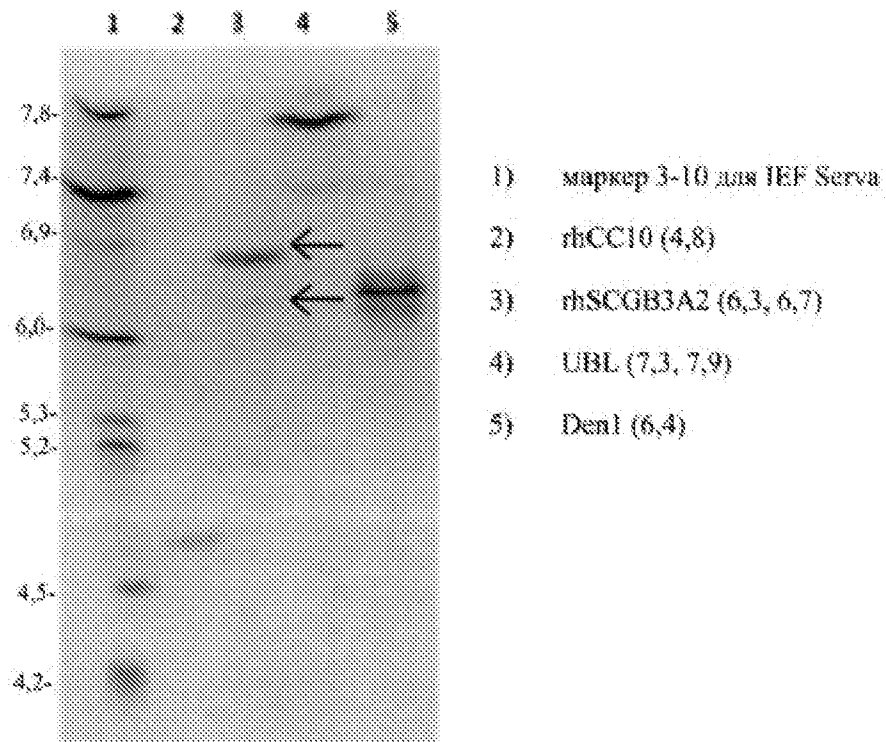
ФІГ. 1. Амінокислотні послідовності SCGB3A2 людини (також відомого як Hn-2, UGRP1)

SEQ ID NO 1:	10 20 30 40 50 60 70 80 90	Вихідна послідовність, № у Genbank AAQ89338
SEQ ID NO 2:	10 20 30 40 50 60 70 80 90	Варіант, озержаний Claressance, rhSCGB3A2
Інші опубліковані послідовності		
SEQ ID NO 3:	10 20 30 40 50 60	US20950054822 (консенсус)
SEQ ID NO 4:	10 20 30 40 50 60	Інструмент для передбачення N-кінця (www.expasy.org)
SEQ ID NO 5:	10 20 30 40 50 60	CA 2331934 (2001)
SEQ ID NO 6:	10 20 30 40 50 60	передбаченої стиг. пепт. 1-18
SEQ ID NO 7:	10 20 30 40 50 60	передбаченої стиг. пепт. 1-21
SEQ ID NO 8:	10 20 30 40 50 60	дійсний виділений пептид
SEQ ID NO 9:	10 20 30 40 50 60	дійсний виділений пептид

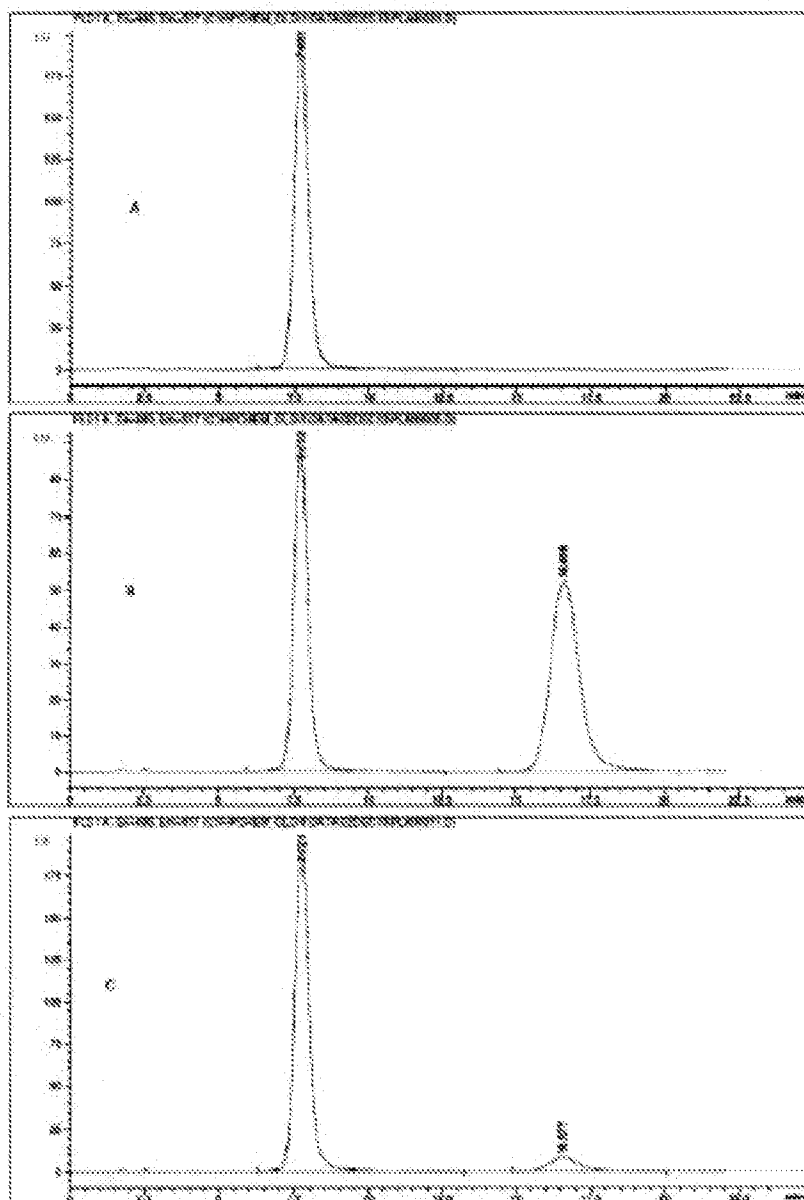
ФІГ. 2. SDS-PAGE очищеного rhSCGB3A2



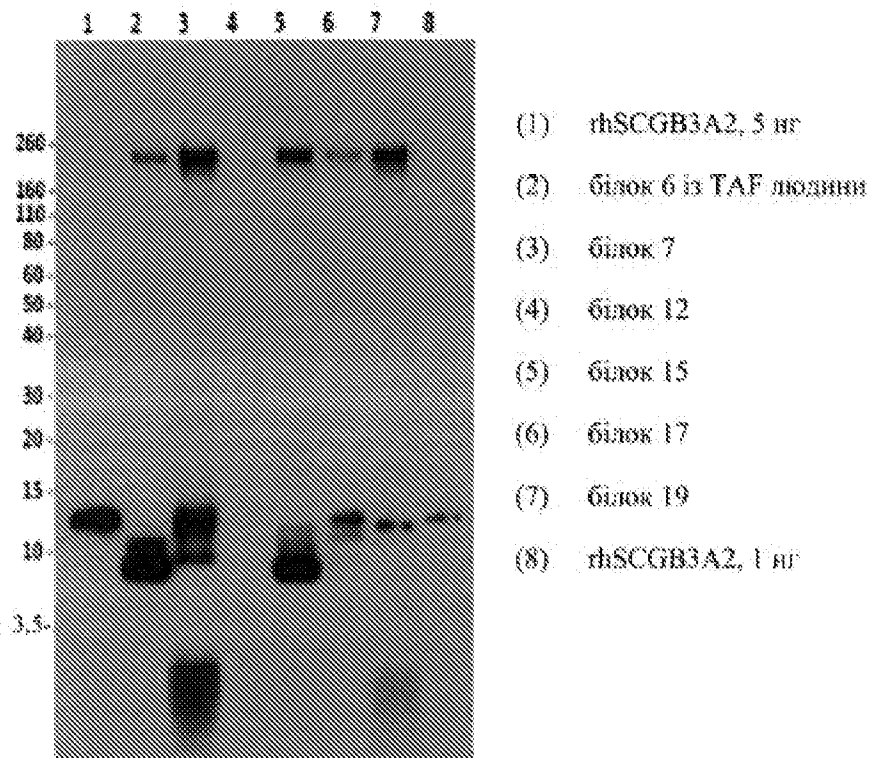
ФІГ. 3. Ізoeлeктpичне фoкyсyвaння oчищeнoгo rhSCGB3A2



ФІГ. 4. Інгібування PLA_2 за допомогою rhSCGB3A2

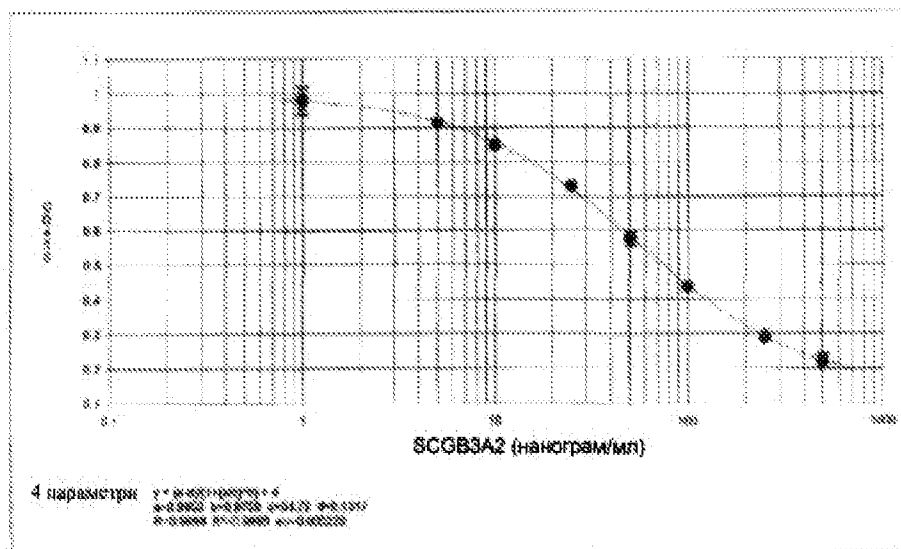


ФІГ. 5. Вестерн-блотинг SCGB3A2 із TAF людини



ФІГ. 6. Стандартна крива для конкурентного ELISA SCGB3A2 людини

СТАНДАРТНА КРИВА



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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