

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201690855 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.10.31

(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.10.24

(54) ЭНДОГЛИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 61/896,002

(32) 2013.10.25

(33) US

(86) PCT/US2014/062147

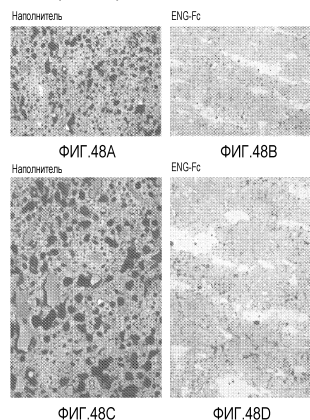
(87) WO 2015/061666 2015.04.30

(71) Заявитель:
АКСЕЛЕРОН ФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Гринберг Ася, Кастонгэй Роузлин,
Вернер Эрик, Кумар Равиндра (US)

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

(57) В определенных аспектах настоящее изобретение относится к неожиданному открытию того, что для лечения фиброзного нарушения можно применять полипептид, содержащий укороченную лиганд-связывающую часть внеклеточного домена эндоглинового (ENG) полипептида.



A1

201690855

201690855

A1

ЭНДОГЛИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи согласно 35 U.S.C. §119 по предварительной патентной заявке США № 61/896002, поданной 25 октября 2013 года и названной *Endoglin Peptides To Treat Fibrotic Diseases*, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фиброз представляет собой образование избытка волокнистой соединительной ткани в органе или ткани. Фиброз может возникать в ответ на физическое или химическое повреждение как часть репаративного или реактивного процесса, также обозначаемого как рубцевание. Фиброз также может возникать в результате патологических аномалий в клетке или ткани без внешнего повреждения. Фиброз приводит к депонированию соединительной ткани, которая может поддерживать гомеостаз ткани и заживление после травмы. Однако избыточный фиброз может приводить к облитерации структуры и затруднять функционирование соответствующего органа или ткани, приводя к фиброзным нарушениям, таким как, например, фиброз печени, легочный фиброз и кистозный фиброз. Как правило, фиброзная ткань не может осуществлять специализированные функции соответствующего органа и не может репарироваться. Таким образом, варианты лечения фиброзных нарушений ограничены подходами замены ткани, такими как трансплантация органа, и паллиативное лечение.

Желательна разработка эффективных композиций и способов ингибирования и лечения фиброза. Они включают способы и композиции, которые могут ингибировать и/или реверсировать избыточный фиброз, ассоциированный с фиброзными нарушениями.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к эндоглиновым (ENG) полипептидам и применению таких эндоглиновых полипептидов для лечения или профилактики фиброзных нарушений. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики фиброзного нарушения у

нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение пациенту эффективного количества эндоглинового полипептида, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления используемый эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 42-333 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фиброзное нарушение является фиброзом печени, сосудистым фиброзом, легочным фиброзом, фиброзом поджелудочной железы, фиброзом почек, скелетно-мышечным фиброзом, фиброзом сердца, фиброзом кожи, фиброзом глаза, диффузной склеродермией (PSS), хронической реакцией "трансплантат против хозяина", болезнью Пейрони, постцистокопическим стенозом уретры, ретроперитонеальным фиброзом, медиастинальным фиброзом, прогрессирующим массивным фиброзом, пролиферативным фиброзом, нефрогенным системным фиброзом, опухолевым фиброзом, болезнью Дюпюитрена, стриктурами, фиброзом, индуцируемым радиацией, кистозным фиброзом, плевральным фиброзом, саркоидозом, склеродермией, повреждением/фиброзом спинного мозга, миелофиброзом, рестенозом сосудов, атеросклерозом, инъекционным фиброзом (который может возникать как осложнение внутримышечных инъекций, особенно у детей) или осложнениями пневмокониоза у работников угольной промышленности. В некоторых вариантах осуществления фиброзное нарушение не является миелофиброзом. В некоторых вариантах осуществления фиброз печени является циррозом печени, алкогольным фиброзом печени, повреждением желчных протоков, первичным билиарным циррозом, инфекционным фиброзом печени, врожденным фиброзом печени или аутоиммунным гепатитом. В некоторых вариантах осуществления инфекционный фиброз печени является бактериально-индуцированным или вирусно-индуцированным. В некоторых вариантах осуществления легочный фиброз является идиопатическим, фармакологически-индуцированным, индуцированным радиацией, хронической обструктивной болезнью легких (COPD) или хронической астмой. В некоторых вариантах осуществления фиброз сердца является эндомикардиальным фиброзом или идиопатической кардиомиопатией. В некоторых вариантах осуществления фиброз кожи

является склеродермией, посттравматическим, оперативным рубцеванием кожи, келоидами или образованием кожных келоидов. В некоторых вариантах осуществления фиброз глаза является глаукомой, склерозом глаз, рубцеванием конъюнктивы, рубцеванием роговицы или птеригиумом. В некоторых вариантах осуществления ретроперитонеальный фиброз является идиопатическим, фармакологически-индуцированным или индуцированным радиацией. В некоторых вариантах осуществления кистозный фиброз является кистозным фиброзом поджелудочной железы или кистозным фиброзом легких. В некоторых вариантах осуществления инъекционный фиброз возникает как осложнение внутримышечной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид, применяемый для лечения фиброзного нарушения по настоящему изобретению, не включает последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, начинающейся с аминокислоты, соответствующей любому из положений 26-42 SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся аминокислотой, соответствующей любому из положений 333-378 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 26-346 SEQ ID NO: 1, аминокислотам 26-359 SEQ ID NO: 1 или аминокислотам 26-378 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид состоит из первой части, состоящей из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотам 26-346 SEQ ID NO: 1, аминокислотам 26-359 SEQ ID NO: 1 или аминокислотам 26-378 SEQ ID NO: 1, и второй части, гетерологичной по отношению к SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления вторая часть эндоглинового полипептида содержит Fc-часть IgG. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид не включает более 50 последовательных аминокислот из последовательности, состоящей из аминокислот 379-586 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид является димером или

мультимером более высокого порядка, содержащим два или более эндоглиновых полипептида, и, необязательно, может являться гомодимером, гетеродимером, гомомультимером или гетеромультимером.

В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид, применяемый для лечения фиброзного нарушения по настоящему изобретению, связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее $5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее $5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее $2,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Необязательно эндоглиновый полипептид, отличающийся любым из указанных выше свойств связывания BMP-9 или BMP-10, является димером или мультимером более высокого порядка. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид не связывается с TGF- β 1 человека, TGF- β 3 человека, VEGF человека или основным фактором роста фибробластов человека (FGF-2). В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид является слитым белком, включающим, помимо части, содержащей аминокислотную последовательность эндоглина, одну или несколько полипептидных частей, повышающих оно или несколько из: стабильности *in vivo*, времени полужизни *in vivo*, захвата/введения, локализации или распределения в тканях, образования белковых комплексов, таких как димеры или мультимеры, и/или очистки. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид включает часть константного домена иммуноглобулина и/или часть сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит домен Fc иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления

домен Fc иммуноглобулина соединяют с полипептидной частью ENG с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 31 (TGGG) или GGG. В некоторых вариантах осуществления домены Fc образуют димер. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид включает один или несколько модифицированных аминокислотных остатка, выбранных из: гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с остатком липида, и аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватизирующим средством.

В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, подкожно или перорально.

Настоящее изобретение частично относится к эндоглиновым полипептидам и применению таких эндоглиновых полипептидов в качестве селективных антагонистов BMP9 и/или BMP10. Как представлено в настоящем описании, полипептиды, содержащие часть или весь внеклеточный домен эндоглина (ECD), связываются с BMP9 и BMP10, не демонстрируя существенного связывания с другими членами суперсемейства TGF-бета. В настоящем описании показано, что полипептиды, содержащие часть или весь ECD эндоглина, являются эффективными антагонистами передачи сигнала BMP9 и BMP10 и действуют, ингибируя ангиогенез и рост опухоли *in vivo*. Таким образом, в определенных аспектах настоящее изобретение относится к эндоглиновым полипептидам как антагонистам BMP9 и/или BMP10 для применения в ингибировании ангиогенеза, а также других нарушений, ассоциированных с BMP9 или BMP10, представленных в настоящем описании.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим укороченный внеклеточный домен эндоглина, для применения в ингибировании ангиогенеза и лечении других BMP9-или BMP10-ассоциированных нарушений. Не будучи связанными каким-либо конкретным механизмом действия, ожидают, что такие

полипептиды будут действовать, связывая BMP9 и/или BMP10 и ингибируя способность этих лигандов образовывать сигнальные комплексы с такими рецепторами, как ALK1, ALK2, ActRIIA, ActRIIB и BMPRII. В определенных вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит, состоит или, по существу, состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности аминокислот 42-333, 26-346, 26-359 или 26-378 последовательности эндоглина человека SEQ ID NO: 1. Эндоглиновый полипептид может содержать, состоять или, по существу, состоять из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности аминокислот, начинающейся с любого из положений 26-42 SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся любым из положений 333-378 последовательности эндоглина человека SEQ ID NO: 1. Эндоглиновый полипептид может содержать, состоять или, по существу, состоять из полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в менее строгих, строгих или очень строгих условиях с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: нуклеотидов 537-1412 SEQ ID NO: 2, нуклеотидов 121-1035 SEQ ID NO: 30, нуклеотидов 121-1074 SEQ ID NO: 26, нуклеотидов 121-1131 SEQ ID NO: 24, нуклеотидов 73-1035 SEQ ID NO: 30, нуклеотидов 73-1074 SEQ ID NO: 26 и нуклеотидов 73-1131 SEQ ID NO: 24. В каждом из перечисленных выше случаев эндоглиновый полипептид можно выбирать так, чтобы он не включал полноразмерный ECD эндоглина (например, эндоглиновый полипептид можно выбирать так, чтобы он не включал последовательность аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1, или их часть, или любую дополнительную часть уникальной последовательности SEQ ID NO: 1). Эндоглиновый полипептид можно использовать в качестве мономерного белка или в димеризованной форме. Эндоглиновый полипептид также можно подвергать слиянию со второй полипептидной частью для получения улучшенных свойств, таких как повышенное время полужизни или более высокая легкость получения или очистки. Слияние может являться прямым, или между эндоглиновым полипептидом

и любой другой частью можно встраивать линкер. Линкер может являться структурированным или неструктурированным и может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 50 или более аминокислот, необязательно, с относительно свободной вторичной структурой. Линкер может быть богат остатками глицина и пролина и, например, может содержать последовательность из треонина/серина и глицинов (например, TGGG (SEQ ID NO: 31)) или просто один или несколько остатков глицина (например, GGG (SEQ ID NO: 32)). Для повышения времени полужизни эндоглинового полипептида в сыворотке при системном введении (например, внутривенном, интраартериальном и интраперитонеальном введении) особенно пригодным могут являться слияния с Fc-частью иммуноглобулина или соединение с остатком полиоксиэтилена (например, полиэтиленгликоля). В определенных вариантах осуществления слитый белок эндоглин-Fc содержит полипептид, содержащий, состоящий или, по существу, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности аминокислот, начинающейся с любого из положений 26-42 SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся любым из положений 333-378 последовательности эндоглина человека SEQ ID NO: 1, и, необязательно, может не включать полноразмерный ECD эндоглина (например, эндоглиновый полипептид можно выбирать так, чтобы он не включал последовательность аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1 или ее часть, или так, чтобы он не включал какие-либо 5, 10, 20, 30, 40, 50, 52, 60, 70, 100, 150 или 200 или более других аминокислот из любой части эндоглина или любой части аминокислот 379-581 SEQ ID NO: 1), где полипептид является слитым с Fc-частью иммуноглобулина с промежуточным линкером или без него. Эндоглиновый полипептид, включающий слитый белок эндоглин-Fc, может связываться с BMP9 и/или BMP10 с K_D менее 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или менее или константой диссоциации (k_d) менее 10^{-3} с⁻¹, 3×10^{-3} с⁻¹, 5×10^{-3} с⁻¹ или 1×10^{-4} с⁻¹. Можно выбирать эндоглиновый полипептид, имеющий K_D к BMP9 меньше K_D к BMP10, необязательно, меньше в 5, 10, 20, 30, 40 раз или более. Эндоглиновый полипептид может иметь небольшую аффинность или не иметь значительной аффинности к любому или всем

из TGF- β 1, - β 2 или - β 3 и может иметь K_D к любому или всем из TGF- β 1, - β 2 или - β 3 более 10^{-9} М, 10^{-8} М, 10^{-7} М или 10^{-6} М. Эндоглиновый полипептид может являться димером или мультимером более высокого порядка.

Fc-часть можно выбирать таким образом, чтобы она соответствовала организму. Необязательно, Fc-часть является Fc-частью IgG1 человека. Необязательно, слитый белок эндоглин-Fc содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33, 34, 35 или 36. Необязательно, слитый белок эндоглин-Fc является белком, получаемым посредством экспрессии нуклеиновой кислоты любой из SEQ ID NO: 17, 20, 22, 24, 26, 28 или 30 в линии клеток млекопитающего, в частности, линии клеток китайского хомяка (CHO). Эндоглиновый полипептид можно составлять в виде фармацевтического препарата, по существу, апирогенного. Можно получать фармацевтический препарат для системной доставки (например, внутривенной, внутримышечной, интраартериальной или подкожной доставки) или местной доставки (например, в глаз).

Эндоглиновые полипептиды, представленные в настоящем описании, можно использовать совместно или последовательно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, включая, например, антиангиогенные средства, антагонисты VEGF, антитела против VEGF, противоопухолевые композиции, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, противогормональные средства и ингибирующие рост средства. Дополнительные примеры каждой из указанных выше категорий молекул представлены в настоящем описании.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза у млекопитающего посредством введения какого-либо из эндоглиновых полипептидов, представленных в настоящем описании в целом или конкретно. Эндоглиновый полипептид можно доставлять местно (например, в глаз) или системно (например, внутривенно, внутримышечно, внутриартериально или подкожно). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования ангиогенеза в глазу млекопитающего посредством введения эндоглинового полипептида

млекопитающему в место, дистальное относительно глаза, например, посредством системного введения.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения опухоли у млекопитающего. Такой способ может включать введение млекопитающему, имеющему опухоль, эффективного количества эндоглинового полипептида. Способ дополнительно может включать введение одного или нескольких дополнительных средств, включая, например, антиангиогенные средства, антагонисты VEGF, антитела против VEGF, противоопухолевые композиции, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, противогормональные средства и ингибирующие рост средства. Опухоль также может являться опухолью, использующей множество проангиогенных факторов, такой как опухоль, резистентная к терапии против VEGF.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения пациентов, имеющих нарушение, связанное с BMP9 или BMP10. Примеры таких нарушений представлены в настоящем описании, и, как правило, они могут включать нарушения сосудистого русла, гипертензию и фиброзные нарушения.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к офтальмологическим составам. Такие составы могут содержать эндоглиновый полипептид, представленный в настоящем описании. В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения фиброзного заболевания глаза или заболевания глаза, связанного с ангиогенезом. Такие способы могут включать системное введение или введение в указанный глаз фармацевтического состава, содержащего эффективное количество эндоглинового полипептида, представленного в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фигуре 1** показана нативная аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 1 (L-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-25) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 587-611).

На **фигуре 2** показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 1 (L-ENG).

Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 414-488) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2172-2246).

На **фигуре 3** показана нативная аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 2 (S-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-25) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 587-611). По сравнению с изоформой 1, изоформа 2 имеет более короткий и отличающийся С-конец, но последовательность внеклеточного домена (см. фигуру 9) является идентичной.

На **фигуре 4** показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 2 (S-ENG). Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 414-488) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2172-2246).

На **фигуре 5** показана нативная аминокислотная последовательность ENG мышцы, изоформа 1 (L-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-26) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 582-606), а внеклеточный домен зрелого пептида выделен квадратными скобками (см. фигуру 10). Изоформа 3 ENG мышцы (инвентарный номер GenBank NM_001146348) отличается от представленной последовательности только лидерной последовательностью, в которой треонин в положении 23 (выделен) подвергнут делеции и есть замена глицина серином в положении 24 (также выделена).

На **фигуре 6** показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мышцы, изоформу 1 (L-ENG). Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 364-441) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2107-2181). Нуклеотидная последовательность, кодирующая изоформу 3 ENG мышцы (инвентарный номер GenBank NM_001146348), отличается от представленной последовательности только лидерной последовательностью, особенно в положениях 430-433 (выделены).

На **фигуре 7** показана нативная аминокислотная

последовательность ENG мыши, изоформа 2 (S-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-26) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 582-606). По сравнению с изоформой 1, изоформа 2 имеет более короткий и отличающийся С-конец, но последовательность внеклеточного домена (см. фигуру 10) является идентичной.

На **фигуре 8** показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 2 (S-ENG). Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 364-441) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2107-2181).

На **фигуре 9** показана аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG человека. Внеклеточные домены двух изоформ человека идентичны по аминокислотной и нуклеотидной последовательности.

На **фигуре 10** показана аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG мыши, на 69% идентичного его аналогу у человека. Внеклеточные домены двух изоформ мыши идентичны по аминокислотной и нуклеотидной последовательности.

На **фигуре 11** показана аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека. Подчеркнутые остатки являются необязательными участками мутаций, как описано в тексте.

На **фигуре 12** показана укороченная с N-конца аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека. Подчеркнутые остатки являются необязательными участками мутаций, как описано в тексте.

На **фигуре 13** показана аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 14** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-586)-hFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 15** показана аминокислотная последовательность

hENG(26-586)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 16** показана аминокислотная последовательность mENG(27-581)-mFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 17** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая mENG(27-581)-mFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 18** показано определение характеристик связывания BMP-9 с hENG(26-586)-hFc, как определяли с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Связывание BMP-9 с иммобилизованным hENG(26-586)-hFc оценивали при концентрациях лиганда 0 и 0,01-0,625 нМ (с двукратными повышениями, за исключением 0,3125 нМ) и использовали нелинейную регрессию для определения K_D как 29 пМ.

На **фигуре 19** показано определение характеристик связывание BMP-10 с hENG(26-586)-hFc, как определяли с помощью анализа на основе SPR. Связывание BMP-10 с иммобилизованным hENG(26-586)-hFc оценивали при концентрациях лиганда 0 и 0,01-1,25 нМ (с двукратными повышениями) и использовали нелинейную регрессию для определения K_D как 400 пМ.

На **фигуре 20** показан эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586), в отношении связывания BMP-9 с ALK1. Концентрации hENG(26-586) 0-50 нМ предварительно смешивали с фиксированной концентрацией BMP-9 (10 нМ) и определяли связывание BMP-9 с иммобилизованным ALK1 с помощью анализа на основе SPR. Преобладающий след соответствует отсутствию hENG(26-586), в то время как наименьший след соответствует соотношению ENG:BMP-9 5:1. Связывание BMP-9 с ALK1 ингибировалось растворимым hENG(26-586) в зависимости от концентрации с IC_{50} 9,7 нМ.

На **фигуре 21** показан эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586), в отношении связывания BMP-10 с ALK1. Концентрации hENG(26-586) 0-50 нМ предварительно смешивали с фиксированной концентрацией BMP-10 (10 нМ) и измеряли связывание BMP-10 с иммобилизованным ALK1 с помощью анализа на основе SPR. Преобладающий след соответствует отсутствию hENG(26-586), и наименьший след соответствует соотношению ENG:BMP-10 5:1. Связывание BMP-10 с ALK1 ингибировалось растворимым hENG(26-586) в зависимости от концентрации с IC₅₀ 6,3 нМ.

На **фигуре 22** показан эффект mENG(27-581)-hFc в отношении образования тяжа эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) в культуре. Данные представляют собой средние значения для двух параллельных культур $\pm$ SD. Индуктор, стимулятор роста эндотелиальных клеток (ECGS), удваивал среднюю длину тяжа по сравнению с отсутствием обработки, и mENG(27-581)-hFc сокращает это повышение на приблизительно 60%. В отсутствие стимуляции (без обработки) mENG(27-581)-hFc имеет низкий эффект.

На **фигуре 23** показан эффект mENG(27-581)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе хориоаллантоиновой мембраны куриного яйца (CAM). Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM; *p<0,05. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых обработкой VEGF, снижалось на 65% при конкурентной обработке mENG(27-581)-hFc.

На **фигуре 24** показан эффект обработки mENG(27-581)-mFc в течение 11 дней в отношении ангиогенеза, стимулируемого комбинацией факторов роста (GF) фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF-2) в анализе ангиореактора мышцы. Ангиогенез в единицах относительной флуоресценции $\pm$ SEM; *p<0,05. mENG(27-581)-mFc полностью блокировал ангиогенез, стимулируемый GF, в этом анализе *in vivo*.

На **фигуре 25** показана доменная структура слитых конструкций hENG-Fc. Полноразмерный внеклеточный домен ENG (остатки 26-586 в верхней структуре) состоит из орфанного домена и N-концевых и C-концевых доменов *zona pellucida* (ZP). Под ней представлена

структура выбранных укороченных вариантов и то, проявляют ли они высокоаффинное связывание (+/-) с BMP-9 и BMP-10 в анализе на основе SPR.

На **фигуре 26** показана аминокислотная последовательность hENG(26-437)-hFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 27** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-437)-hFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 28** показана аминокислотная последовательность hENG(26-378)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 29** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-378)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 30** показана аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 31** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 32** показана аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и

выделены.

На **фигуре 33** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 34** показана аминокислотная последовательность hENG(26-346)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 35** показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-346)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На **фигуре 36** показаны эксклюзионные хроматограммы hENG(26-586)-hFc (A), hENG(26-359)-hFc (B) и hENG(26-346)-hFc (C) после очистки соответствующих белков, полученных из клеток CHO, с помощью аффинной хроматографии с протеином А. Процент выделения мономерного hENG(26-346)-hFc равен таковому в случае hENG(26-586)-hFc. Напротив, выделение мономерного hENG(26-359)-hFc снижалось в присутствии дополнительных высокомолекулярных агрегатов, таким образом, требуя дополнительных способов для достижения чистоты, эквивалентной чистоте для других конструкций.

На **фигуре 37** показано определение кинетических характеристик связывания BMP-9 с hENG(26-586)-hFc (A), hENG(26-359)-hFc (B) и hENG(26-346)-hFc (C), как определяли в анализе на основе SPR. Связывание BMP-9 с иммобилизованными белками, полученными из клеток CHO, оценивали при концентрациях лиганда 0,0195-0,625 нМ с двукратными повышениями. RU, единицы ответа. Необходимо отметить более низкие скорости обратной реакции для укороченных вариантов по сравнению с hENG(26-586)-hFc.

На **фигуре 38** показан эффект hENG(26-359)-hFc в отношении

ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе CAM. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM; $*p<0,05$. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых обработкой VEGF, снижалось на 75% при конкурентной обработке hENG(26-359)-hFc, хотя hENG(26-359)-hFc не связывается с VEGF.

На **фигуре 39** показан эффект обработки hENG(26-346)-hFc в течение 11 дней в отношении ангиогенеза, стимулируемого комбинацией факторов роста (GF) VEGF и FGF-2 в анализе ангиореактора мыши. А. Ангиогенез в единицах относительной флуоресценции $\pm$ SEM; $*p<0,05$. В. Фотографии отдельных ангиореакторов (четыре на мышь), распределенных по исследуемым группам, с образованием кровеносного сосуда, видимым в виде затененных включений. Хотя сам по себе он не способен связываться с VEGF или FGF-2, в этом анализе *in vivo* hENG(26-346)-hFc полностью блокировал ангиогенез, стимулируемый GF.

На **фигуре 40** показан эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста ксенотрансплантатов опухоли молочной железы 4T1 у мышей. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM. Ко дню 24 после имплантации объем опухоли составлял на 45% меньше ($p<0,05$) у мышей, которым вводили mENG(27-581)-mFc, по сравнению с наполнителем.

На **фигуре 41** показан эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста ксенотрансплантатов опухоли Colon-26 у мышей. Обработка mENG(27-581)-mFc ингибировала рост опухоли дозозависимым образом, при этом объем опухоли в группе высокой дозы составлял на приблизительно 70% меньше, чем в случае наполнителя, ко дню 58 после имплантации.

На **фигуре 42** показана печень как % массы тела в модели фиброза печени мыши CCl₄ с введением эндоглина (mENG(27-581)-mFc) или без него.

На **фигуре 43** показано окрашивание ткани печени гематоксилин-эозином у ложно-инъецированных мышей (PBS).

На **фигуре 44** показано окрашивание ткани печени гематоксилин-эозином у мышей, которым инъецировали mENG(27-581)-mFc.

На **фигуре 45** показано окрашивание ткани печени трихромом по Массону у мышей с индуцированной CCl₄.

На **фигуре 46** показано окрашивание ткани печени масляным красным O у CCl₄-индуцированных мышей, которым инъецировали PBS или mENG(27-581)-mFc. Животные, которым вводили mENG(27-581)-mFc, имели наименьшую процентную долю печеней с обширным положительным окрашиванием масляным красным O.

На **фигуре 47** показаны уровни щелочной фосфатазы в сыворотке у CCl₄-индуцированных и ложно-индуцированных (оливковым маслом) мышей, которым вводили mENG(27-581)-mFc или PBS. АР в сыворотке была более низкой в когортах, которым вводили эндоглин.

На **фигуре 48** показан эффект введения ENG-Fc в отношении печеночного депонирования липидов у мышей MCDD, модели фиброза печени, вызываемого пищевой недостаточностью метионина и холина. По сравнению с наполнителем (A, C), введение mENG(27-581)-mFc в течение 3 недель значительно снижало печеночное депонирование липидов (B, D) у мышей MCDD. Отложения липидов идентифицировали по интенсивному окрашиванию масляным красным O, растворимым в липидах диазокрасителем. Увеличение в 100 раз (A, B) и 200 раз (C, D).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Обзор

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам ENG. ENG (также известный как CD105) обозначают как корецептор лигандов суперсемейства трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), и он участвует в нормальном и патологическом фиброзе и ангиогенезе. Экспрессия ENG является низкой в покоем сосудином эндотелии, но повышающе регулируется в эндотелиальных клетках заживающих ран, развивающихся эмбрионов, воспаленных тканях и солидных опухолях (Dallas et al, 2008, Clin Cancer Res 14:1931-1937). Мыши, гомозиготные по нулевым аллелям ENG, умирают рано в период беременности по причине дефектного развития сосудов (Li et al, 1999, Science 284:1534-1537), в то время как мыши, гетерозиготные по нулевому аллелю ENG, демонстрируют аномалии ангиогенеза во взрослом возрасте (Jerkic et al, 2006, Cardiovasc Res 69:845-854). У людей идентифицированы мутации гена ENG,

являющиеся причиной наследственной геморрагической телеангиэктазии (болезни Рандю-Вебера-Ослера) типа-1 (ННТ-1), аутосомно-доминантной формы сосудистой дисплазии, отличающейся артериовенозными мальформациями, приводящими к прямому току (соединению) артерии с веной (артериовенозному шунту) без участия капиллярного русла (McAllister et al, 1994, Nat Genet 8:345-351; Fernandez-L et al, 2006, Clin Med Res 4:66-78). Типичные симптомы у пациентов с ННТ включают рецидивирующий повторяющийся время от времени эпистаксис, желудочно-кишечное кровотечение, кожные и кожно-слизистые телеангиэктазы и артериовенозные мальформации в легочном, мозговом или печеночном сосудистом русле.

Хотя конкретную роль ENG в фиброзе и ангиогенезе еще предстоит определить, вероятно, она связана со значительной ролью системы передачи сигнала TGF- β в этом процессе (Cheifetz et al, 1992, J Biol Chem 267:19027-19030; Pardali et al, 2010, Trends Cell Biol 20:556-567). Примечательно, что экспрессия ENG повышающе регулируется в пролиферирующих клетках эндотелия сосудов в опухолевых тканях (Burrows et al, 1995, Clin Cancer Res 1:1623-1634; Miller et al, 1999, Int J Cancer 81:568-572), и количество экспрессирующих ENG кровеносных сосудов в опухоли отрицательно коррелирует с выживаемостью для широкого диапазона опухолей человека (Fonsatti et al, 2010, Cardiovasc Res 86:12-19). Таким образом, ENG является многообещающей мишенью для антиангиогенной терапии в целом и для злокачественных новообразований в частности (Dallas et al, 2008, Clin Cancer Res 14:1931-1937; Bernabeu et al, 2009, Biochim Biophys Acta 1792:954-973).

Структурно ENG является гомодимерным гликопротеином поверхности клетки. Он принадлежит к семейству белков *zona pellucida* (ZP) и состоит из короткого С-концевого цитоплазматического домена, одного гидрофобного трансмембранного домена и длинного внеклеточного домена (ECD) (Gougos et al, 1990, J Biol Chem 265:8361-8364). Как определяли с помощью электронной микроскопии, мономерный ECD ENG состоит из двух областей ZP и орфанного домена, локализованного на N-конце (Llorca et al, 2007, J Mol Biol 365:694-705). У людей альтернативный сплайсинг

первичного транскрипта приводит к образованию двух изоформ ENG, одна из которых состоит из 658 остатков (длинная, L, SEQ ID NO: 1), и другая - из 625 остатков (короткая, S, SEQ ID NO: 3), отличающихся только их цитоплазматическим доменом (Bellon et al, 1993, 23:2340-2345; ten Dijke et al, 2008, Angiogenesis 11:79-89). ENG мыши существует в виде трех изоформ: L-ENG (SEQ ID NO: 5), S-ENG (SEQ ID NO: 7) и третьего варианта (изоформы 3) с неизвестным функциональным значением, идентичной L-ENG, за исключением изменений в двух положениях в лидерной последовательности (Perez-Gomez et al, 2005, Oncogene 24:4450-4461). ECD ENG мыши демонстрирует идентичность аминокислот 69% по отношению к таковому в ENG человека, и в нем отсутствует интегриновый мотив взаимодействия Arg-Gly-Asp (RGD), обнаруживаемый в белке человека. Недавно полученные данные позволяют предполагать, что изоформы L-ENG и S-ENG могут играть разные функциональные роли *in vivo* (Blanco et al, 2008, Circ Res 103:1383-1392; ten Dijke et al, 2008, Angiogenesis 11:79-89).

Считают, что в качестве корецептора ENG модулирует ответы других рецепторов на лиганды семейства TGF- β без прямого опосредования передачи сигнала самого лиганда. Лиганды семейства TGF- β , как правило, передают сигнал посредством связывания с гомодимерным рецептором типа II, запускающим рекрутирование и трансфосфорилирование гомодимерного рецептора типа I, таким образом, приводя к фосфорилированию белков Smad, отвечающих за активацию транскрипции конкретных генов (Massague, 2000, Nat Rev Mol Cell Biol 1:169-178). С учетом анализа эктопической клеточной экспрессии, сообщалось, что ENG не может связываться с лигандами самостоятельно, и что для его связывания с TGF- β 1, TGF- β 3, активином A, морфогенетическим белком кости-2 (BMP-2) и BMP-7 необходимо наличие соответствующего рецептора типа I и/или типа II (Barbara et al, 1999, J Biol Chem 274:584-594). Как бы то ни было, есть доказательство того, что ENG, экспрессируемый клеточной линией фибробластов, может связываться с TGF- β 1 (St.-Jacques et al, 1994, Endocrinology 134:2645-2657), и результаты, полученные

недавно с помощью клеток COS, свидетельствуют о том, что трансфицированный полноразмерный ENG может связываться с BMP-9 в отсутствие трансфицированных рецепторов типа I или типа II (Scharpfenecker et al, 2007, J Cell Sci 120:964-972).

В дополнение к изложенному выше, ENG может находиться в растворимой форме *in vivo* в конкретных условиях после протеолитического расщепления полноразмерного мембраносвязанного белка (Hawinkels et al, 2010, Cancer Res 70:4141-4150). Наблюдали повышенные уровни растворимого ENG в кровотоке пациентов со злокачественными новообразованиями и преэклампсией (Li et al, 2000, Int J Cancer 89:122-126; Calabro et al, 2003, J Cell Physiol 194:171-175; Venkatesha et al, 2006, Nat Med 12:642-649; Levine et al, 2006, N Engl J Med 355:992-1005). Хотя роль эндогенного растворимого ENG плохо понятна, предполагают, что белок, соответствующий остаткам 26-437 предшественника ENG (аминокислотам 26-437 SEQ ID NO: 1), действует как скавенджер или ловушка для лигандов семейства TGF- β (Venkatesha et al, 2006, Nat Med 12:642-649; WO-2007/143023), из которых лишь TGF- β 1 и TGF- β 3 специфически вовлечены в этот процесс.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим укороченную часть внеклеточного домена ENG, селективно связывающимся с BMP9 и/или BMP10 и которые могут действовать как антагонисты BMP9 и/или BMP10, имеющим полезные свойства относительно полноразмерного внеклеточного домена и которые можно использовать для ингибирования фиброза. Настоящее изобретение частично относится к особенности физиологических, высокоаффинных лигандов для растворимых полипептидов ENG. Неожиданно, в настоящем описании показано, что растворимые полипептиды ENG обладают высокоспецифичным, высокоаффинным связыванием с BMP-9 и BMP-10, в то же время не проявляя какого-либо значимого связывания с TGF- β 1, TGF- β 2 или TGF- β 3, и, кроме того, в настоящем описании показано, что растворимые полипептиды ENG ингибируют взаимодействие BMP9 и BMP10 с рецепторами типа II, таким образом, ингибируя передачу клеточного сигнала. В описании также показано, что полипептиды ENG

ингибируют фиброз. Кроме того, данные свидетельствуют о том, что полипептид ENG может иметь антиангиогенный эффект несмотря на обнаружение того, что полипептид ENG не проявляет значимое связывание с TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF или FGF-2.

Таким образом, в определенных аспектах настоящее изобретение относится к эндоглиновым полипептидам как антагонистам BMP-9 или BMP-10 для применения в ингибировании какого-либо нарушения, связанного с BMP-9 или BMP-10, в целом и в ингибировании фиброза и/или ангиогенеза в частности, включая VEGF-зависимый ангиогенез и VEGF-независимый ангиогенез. Однако, следует отметить, что ожидают, что антитела против самого ENG будут иметь другие эффекты полипептида ENG. Ожидают, что пан-нейтрализующее антитело против ENG (ингибирующее связывание всех сильных и слабых лигандов) будет ингибировать передачу сигнала таких лигандов через ENG, но не будет ингибировать способность таких лигандов передавать сигнал через другие рецепторы (например, ALK-1, ALK-2, BMPRII, ActRIIA или ActRIIB в случае BMP-9 или BMP-10). Также следует отметить, что, учитывая существование циркулирующих нативных растворимых полипептидов ENG, которые, учитывая представленные в настоящем описании данные, предположительно, действуют как природные антагонисты BMP-9/10, не ясно, будет ли нейтрализующее антитело против ENG, главным образом, ингибировать мембраносвязанную форму ENG (таким образом, действуя как антагонист ENG/BMP-9/10) или растворимую форму ENG (таким образом, действуя как агонист ENG/BMP-9/10). С другой стороны, с учетом настоящего описания, ожидают, что полипептид ENG будет ингибировать все лиганды, с которыми он сильно связывается (включая BMP-9 или BMP-10 в случае конструкций, таких как описанные в примерах), но не будет влиять на лиганды, с которыми он слабо связывается. Таким образом, хотя пан-нейтрализующее антитело против ENG будет блокировать передачу сигнала BMP-9 и BMP-10 через ENG, оно не будет блокировать передачу сигнала BMP-9 или BMP-10 через другой рецептор. Кроме того, хотя полипептид ENG может ингибировать передачу сигнала BMP-9 через все рецепторы (включая рецепторы помимо ENG), ожидают, что он будет ингибировать передачу сигнала слабо связывающегося

лиганда через любой рецептор, даже ENG.

Если не указано иначе, белки, представленные в настоящем описании, являются человеческими формами. Ссылки Genbank для белков являются следующими: изоформа 1 ENG человека (L-ENG), NM_001114753; изоформа 2 ENG человека (S-ENG), NM_000118; изоформа 1 ENG мыши (L-ENG), NM_007932; изоформа 2 ENG мыши (S-ENG), NM_001146350; изоформа 3 ENG мыши, NM_001146348. Последовательности нативных белков ENG человека и мыши приведены на фигурах 1-8.

Термины, используемые в настоящем описании, как правило, имеют значения, общепринятые в этой области, в контексте настоящего описания и в конкретном контексте, в котором используют каждый термин. Конкретные термины представлены в описании для обеспечения дополнительного руководства для практикующего специалиста в описании композиций и способов, представленных в настоящем описании, и их получении и применении. Объем или значение любого использования термина будут очевидны из конкретного контекста, в котором используют термин.

2. Терапевтические способы и применение полипептидов ENG

Фиброз и фиброзные нарушения

Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны на неожиданном наблюдении того, что полипептиды ENG можно применять для ингибирования и/или лечения фиброзных нарушений. Настоящее изобретение относится к способам ингибирования фиброза у млекопитающего посредством введения эффективного количества полипептида ENG, например, полипептида ENG, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 42-333 SEQ ID NO: 1, включая слитый белок ENG-Fc или антагонисты нуклеиновой кислоты (например, антисмысловую или мипНК) указанного выше. Эти полипептиды ENG, слитые белки ENG-Fc и антагонисты нуклеиновой кислоты в настоящем описании в совокупности обозначают как "терапевтические средства".

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам ENG и способам применения таких полипептидов, применимых в лечении, ингибировании или профилактике

фиброза. Как применяют в настоящем описании, термин "фиброз" относится к аномальному образованию или развитию избыточной волокнистой соединительной ткани клетками в органе или ткани. Хотя процессы, относящиеся к фиброзу, могут возникать как часть образования нормальной ткани или заживления, дисрегуляция этих процессов может приводить к изменению клеточного состава и избыточному депонированию соединительной ткани, постепенно нарушающему функционирование ткани или органа. Образование волокнистой ткани может являться результатом репаративного или реактивного процесса.

Фиброзные нарушения или состояния, которые можно лечить полипептидами ENG и терапевтическими способами с применением таких полипептидов по настоящему изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, фибрознопролиферативные нарушения, связанные с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как заболевание сердца, заболевание мозга и заболевание периферических сосудов, а также систем тканей и органов, включая сердце, кожу, почки, легкие, брюшную полость, кишечник и печень (как описано, например, в Wynn, 2004, Nat Rev 4:583-594, включенном в настоящее описание посредством ссылки). Примеры нарушений, которые можно лечить, включают, в качестве неограничивающих примеров, фиброз почек, включая нефропатии, ассоциированные с травмой/фиброзом, например, хронические нефропатии, ассоциированные с диабетом (например, диабетическую нефропатию), волчанку, склеродермию, гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз и IgA-нефропатию; легочный фиброз, например, идиопатический легочный фиброз, фиброз, индуцируемый радиацией, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), склеродермию и хроническую астму; фиброз кишечника, например, склеродермию и фиброз кишечника, индуцированный радиацией; фиброз печени, например, цирроз, алкогольный фиброз печени, повреждение желчных протоков, первичный билиарный цирроз, фиброз печени, индуцируемый инфекцией или вирусом, врожденный фиброз печени и аутоиммунный гепатит; и другие фиброзные состояния, такие как кистозный фиброз, эндомиокардиальный фиброз, медиастинальный фиброз, плевральный

фиброз, саркоидоз, склеродермия, повреждение/фиброз спинного мозга, миелофиброз, рестеноз сосудов, атеросклероз, кистозный фиброз поджелудочной железы и легких, инъекционный фиброз (который может возникать как осложнение внутримышечных инъекций, особенно у детей), эндомикардиальный фиброз, идиопатический легочный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности и нефрогенный системный фиброз.

Как применяют в настоящем описании, термины "фиброзное нарушение", "фиброзное состояние" и "фиброзное заболевание" взаимозаменяемо используют в отношении нарушения, состояния или заболевания, отличающегося фиброзом. Примеры фиброзных нарушений включают, в качестве неограничивающих примеров, сосудистый фиброз, легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз), фиброз поджелудочной железы, фиброз печени (например, цирроз), фиброз почек, скелетно-мышечный фиброз, фиброз сердца (например, эндомикардиальный фиброз, идиопатическую кардиомиопатию), фиброз кожи (например, склеродермию, посттравматическое, оперативное рубцевание кожи, келоиды и образование келоидов кожи), фиброз глаза (например, глаукому, склероз глаз, рубцевание конъюнктивы и роговицы и птеригиум), диффузную склеродермию (PSS), хроническую реакцию "трансплантат против хозяина", болезнь Пейрони, постцистокопический стеноз уретры, идиопатический и фармакологически-индуцированный ретроперитонеальный фиброз, медиастинальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, пролиферативный фиброз и опухолевый фиброз.

Как применяют в настоящем описании, термин "клетка" относится к любой клетке, подверженной фиброзирующему ответу, включая, в качестве неограничивающих примеров, отдельные клетки, ткани и клетки в тканях и органах. Как применяют в настоящем описании, термин "клетка" включает саму клетку, а также внеклеточный матрикс (ECM), окружающий клетку. Например, ингибирование фиброзного ответа клетки включает, в качестве неограничивающих примеров ингибирование фиброзного ответа одной или нескольких клеток в легком (или ткани легкого); одной или нескольких клеток в печени

(или ткани печени); одной или нескольких клеток в почке (или ткани почки); одной или нескольких клеток в мышечной ткани; одной или нескольких клеток в сердце (или ткани сердца); одной или нескольких клеток в поджелудочной железе; одной или нескольких клеток в коже; одной или нескольких клеток в кости, одной или нескольких клеток в сосудистом русле, одной или нескольких стволовых клеток или одной или нескольких клеток в глазу.

Способы и композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения и/или профилактики фиброзных нарушений. Примеры типов фиброзных нарушений включают, в качестве неограничивающих примеров, сосудистый фиброз, легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз), фиброз поджелудочной железы, фиброз печени (например, цирроз), фиброз почек, скелетно-мышечный фиброз, фиброз сердца (например, эндомиокардиальный фиброз, идиопатическую кардиомиопатию), фиброз кожи (например, склеродермию, посттравматическое, оперативное рубцевание кожи, келоиды и образование келоидов кожи), фиброз глаза (например, глаукому, склероз глаз, рубцевание конъюнктивы и роговицы и птеригиум), диффузную склеродермию (PSS), хроническую реакцию "трансплантат-против-хозяина", болезнь Пейрони, постцистокопический стеноз уретры, идиопатический и фармакологически-индуцированный ретроперитонеальный фиброз, медиастинальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, пролиферативный фиброз, опухолевый фиброз, болезнь Дюкитрена, стриктуры и фиброз, индуцируемый радиацией. В конкретном варианте осуществления фиброзное нарушение не является миелофиброзом.

Способы и композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения и/или профилактики нарушения печени, проявляющихся фиброзом печени или приводящих к нему, включая неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH) и острые фиброзные нарушения, которые могут являться результатом длительного избыточного потребления алкоголя, холестаза, аутоиммунные болезни печени, избыток железа или меди и хронический вирусный гепатит. NAFLD является результатом метаболических состояний ожирения и диабета типа 2. Пациенты с

NAFLD могут проявлять диапазон гистопатологических признаков, включая от отдельного стеатоза (жировой инфильтрации печени) до некровоспаления, часто обозначаемого как NASH. NAFLD и NASH у пациентов могут прогрессировать до состояний фиброза на более поздней стадии, включая фиброз на поздней стадии и цирроз. У пациентов с NASH развивается прогрессирующий фиброз в 25%-50% в течение периода от 4 до 6 лет, и NASH у 15%-25% индивидуумов может прогрессировать до цирроза. Цирроз при NASH является основной причиной трансплантации печени в США и связан с повышенным риском печеночноклеточной карциномы и смертностью среди пациентов, ожидающих трансплантацию печени. Алкоголизм и вирусная инфекция также могут вызывать повреждение печени, прогрессирующее до фиброза печени и цирроза. Можно использовать множество инструментов для оценки состояния печени и прогрессирования фиброзного заболевания. Биопсия печени позволяет оценивать гистологические свойства ткани печени, включая окрашивание на коллаген и количественный анализ уровней коллагена в ткани, а также уровней липидов в случае стеатоза. Шкала активности NAFLD (NAS) представляет собой балльную оценку и является суммой отдельных баллов для стеатоза (0-3), баллонной дистрофии гепатоцитов (0-2) и лобулярного воспаления (0-3), при этом большинство пациентов с NASH имеют баллы NAS ≥ 5 . См. Kleiner et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41(6), 1313-1321 (2005). Сывороточные маркеры включают маркеры функции печени, АЛТ и АСТ, и маркеры образования внеклеточного матрикса, маркеры фибролитического процесса, маркеры деградации внеклеточного матрикса и конкретные цитокины.

Настоящее изобретение относится к применению полипептидов ENG в комбинации с одними или несколькими другими способами лечения. Таким образом, в дополнение к применению полипептидов ENG, по отношению к индивидууму также можно использовать один или несколько "стандартных" способов терапии для лечения фиброзных нарушений. Например, полипептиды ENG можно вводить в комбинации с (т.е. совместно с) цитотоксинами, иммуносупрессорными средствами,

радиотоксичными средствами и/или терапевтическими антителами. Конкретные котерапевтические средства, предусматриваемые в настоящем изобретении, включают, в качестве неограничивающих примеров, стероиды (например, кортикостероиды, такие как преднизон), иммуносупрессорные и/или противовоспалительные средства (например, гамма-интерферон, циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат, пеницилламин, циклоспорин, колхицины, антитимоцитарный глобулин, микофенолат мофетил и гидроксихлорохин), цитотоксические лекарственные средства, блокаторы кальциевых каналов (например, нифедипин), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ACE), парааминобензойную кислоту (PABA), диметилсульфоксид, ингибиторы трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β), ингибиторы интерлейкина-5 (ИЛ-5) и пан-ингибиторы каспаз.

Дополнительные противофиброзные средства, которые можно использовать в комбинации с полипептидами ENG, включают, в качестве неограничивающих примеров, лектины (как описано, например, в патенте США №: 7026283, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме), а также противофиброзные средства, описываемые Wynn et al (2007, J Clin Invest 117:524-529, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Например, дополнительные противофиброзные средства и способы терапии включают, в качестве неограничивающих примеров, различные противовоспалительные/иммуносупрессорные/цитотоксические лекарственные средства (включая колхицин, азатиоприн, циклофосфамид, преднизон, талидомид, пентоксифиллин и теофиллин), модификаторы передачи сигнала TGF- β (включая релаксин, SMAD7, HGF, и BMP7, а также ингибиторы TGF- β 1, TGF β RI, TGF β RII, EGR-I и CTGF), цитокин и антагонисты рецепторов цитокинов (ингибиторы ИЛ-1 β , ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-21, ИЛ-4R, ИЛ-13R α 1, ГМ-КСФ, ФНО, онкостатина М, WISP-I и PDGF), цитокины и хемокины (ИФН γ , ИФН α/β , ИЛ-12, ИЛ-10, HGF, CXCL10 и CXCL11), антагонисты хемокинов (ингибиторы CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17 и CCL18), антагонисты

рецепторов хемокинов (ингибиторы CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 и CXCR4), антагонисты TLR (ингибиторы TLR3, TLR4 и TLR9), антагонисты ангиогенеза (VEGF-специфические антитела и заместительная терапия аденозиндезаминазой), гипотензивные лекарственные средства (бета-блокаторы и ингибиторы ANG 11, ACE и альдостерона), вазоактивные вещества (антагонисты рецептора ET-1 и бозентан), ингибиторы ферментов, синтезирующих и процессирующих коллаген (ингибиторы пролилгидроксилазы), антагонисты В-клеток (ритуксимаб), антагонисты интегринов/молекул адгезии (молекулы, блокирующие интегрины $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha v\beta 6$, а также ингибиторы интегрин-зависимых киназ и антитела против ICAM-I и VCAM-I), проапоптотические лекарственные средства, направленные против миофибробластов, ингибиторы MMP (ингибиторы MMP2, MMP9 и MMP12), и ингибиторы TIMP (антитела против TIMP-1).

Полипептид ENG и котерапевтическое средство или котерапию можно использовать в одном составе или отдельно. В случае отдельного введения полипептид ENG можно вводить до, после или одновременно с котерапевтическим средством или котерапией. Одно средство может предшествовать или следовать после введения другого средства через интервалы в диапазоне от минут до недель. В вариантах, осуществления в которых индивидууму отдельно вводят два или более различных типа терапевтических средств, как правило, будут обеспечивать, чтобы между временем каждой доставки не прошел значительный период времени, таким образом, чтобы эти разные типы средств все равно были способны иметь преимущественно комбинированный эффект в отношении тканей или клеток-мишеней.

Ангиогенез

Ангиогенез, процесс образования новых кровеносных сосудов, критичен при многих нормальных и аномальных физиологических состояниях. В нормальных физиологических условиях у людей и животных ангиогенез происходит в конкретных и ограниченных ситуациях. Например, в норме ангиогенез наблюдают при заживлении ран, эмбриональном развитии и образовании *corpus luteum*, эндометрия и плаценты.

Нежелательный или неправильно регулируемый ангиогенез

возникает при многих нарушениях, при которых аномальный рост эндотелия может вызывать патологический процесс или участвовать в нем. Например, ангиогенез участвует в росте многих опухолей. Нерегулируемый ангиогенез вовлечен в такие патологические процессы, как ревматоидный артрит, ретинопатии, гемангиомы и псориаз. Различные патологические состояния, при которых имеет место нерегулируемый ангиогенез, классифицируют как заболевания, ассоциированные с ангиогенезом.

Считают, что контролируемый и неконтролируемый ангиогенез происходит схожим образом. Капилляры, главным образом, состоят из эндотелиальных клеток и перицитов, окруженных базальной мембраной. Ангиогенез начинается с эрозии базальной мембраны ферментами, высвобождаемыми эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Затем эндотелиальные клетки, выстилающие просвет кровеносных сосудов, выступают через базальную мембрану. Ангиогенные факторы заставляют эндотелиальные клетки мигрировать через эродированную базальную мембрану. Мигрирующие клетки образуют "отросток", выступающий из родительского кровеносного сосуда, где эндотелиальные клетки подвергаются митозу и пролиферируют. Эндотелиальные отростки соединяются друг с другом с образованием капиллярных петель, создавая новый кровеносный сосуд.

Доказано, что средства, ингибирующие ангиогенез, являются эффективными в лечении множества нарушений. Avastin[™] (бевацизумаб), моноклональное антитело, связывающееся с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), используют в лечении множества злокачественных новообразований. Доказано, что Macugen[™], аптамер, связывающийся с VEGF, является эффективным в лечении неоваскулярной (влажной) возрастной дегенерации желтого пятна. Антагонисты пути передачи сигнала SDF/CXCR4 ингибируют неоваскуляризацию опухоли и эффективны против злокачественного новообразования в моделях на мышцах (Guleng et al. Cancer Res. 2005 Jul 1;65(13):5864-71). В лечении различных типов опухолей в качестве антиангиогенных средств используют множество, так называемых, многоцелевых ингибиторов тирозинкиназ, включая вандетаниб, сунитиниб, акситиниб, сорафениб, ваталаниб и пазопаниб. Талидомид и

родственные соединения (включая помалидомид и леналидомид) демонстрируют благоприятные эффекты в лечении злокачественных новообразований, и хотя молекулярный механизм действия неясен, ингибирование ангиогенеза, по-видимому, является важным компонентом противоопухолевого эффекта (см., например, Dredge et al. *Microvasc Res.* 2005 Jan;69(1-2):56-63). Хотя многие антиангиогенные средства обладают эффектом в отношении ангиогенеза независимо от затронутой ткани, другие ангиогенные средства, как правило, могут иметь ткане-специфичный эффект.

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения или профилактики состояний нерегулируемого ангиогенеза, включая неопластические и ненеопластические нарушения. Кроме того, изобретение относится к способам и композициям для лечения или профилактики конкретных сердечно-сосудистых нарушений. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения нарушений, ассоциированных с активностью BMP9 и/или BMP10.

Настоящее изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза у млекопитающего посредством введения индивидууму эффективного количества полипептида ENG, включая слитый белок ENG-Fc или антагонисты нуклеиновых кислот (например, антисмысловой или миРНК) указанного выше, в совокупности обозначаемых в настоящем описании как "терапевтические средства". Представленные данные конкретно указывают на то, что антиангиогенные терапевтические средства, представленные в настоящем описании, можно применять для ингибирования ангиогенеза, ассоциированного с опухолями. Ожидает, что эти терапевтические средства также будут применимы в ингибировании ангиогенеза в глазу.

Заболевания, ассоциированные с ангиогенезом, включают, в качестве неограничивающих примеров, ангиогенез-зависимое злокачественное новообразование, включая, например, солидные опухоли, гемобластозы, такие как лейкозы, и опухолевые метастазы; доброкачественные опухоли, например гемангиомы, невриномы слухового нерва, нейрофибромы, трахомы и пиогенные гранулемы; ревматоидный артрит; псориаз; рубец; болезнь Рандю-Вебера-Ослера; ангиогенез миокарда; неоваскуляризацию бляшек; телеангиэктазию;

гемофилический артрит и ангиофиброму.

В частности, полипептидные терапевтические средства по настоящему изобретению применимы для лечения или профилактики злокачественного новообразования (опухоли) и, в частности, таких злокачественных новообразований, о которых известно, что они основаны на ангиогенных процессах для поддержания роста. В отличие от большинства антиангиогенных средств, полипептиды ENG влияют на ангиогенез, индуцируемый множеством факторов. Это весьма актуально в случае злокачественных новообразований, где злокачественное новообразование часто имеет множество факторов, поддерживающих ангиогенез в опухоли. Таким образом, терапевтические средства, представленные в настоящем описании, будут особенно эффективными в лечении опухолей, резистентных к лечению лекарственным средством, направленным против отдельного ангиогенного фактора (например, бевацизумабом, направленным против VEGF), а также могут являться особенно эффективными в комбинации с другими антиангиогенными соединениями, действующим за счет другого механизма.

Дисрегуляция ангиогенеза может приводить ко многим нарушениям, которые можно лечить композициями и способами по изобретению. Эти нарушения включают неопластические и ненеопластические состояния. Термины "злокачественное новообразование" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, как правило, отличающемуся повышающе регулируемым ростом/пролиферацией клеток. Примеры злокачественного новообразования или неопластических нарушений включают, в качестве неограничивающих примеров, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких злокачественных новообразований включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, печеночно-клеточный рак, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, карциному эндометрия или тела матки, карциному слюнной железы, рак

почки, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи, включая плоскоклеточный рак головы и шеи. Другие примеры неопластических нарушений и родственных состояний включают карциномы пищевода, текомы, арренобластомы, гиперплазию эндометрия, эндометриоз, фибросаркомы, хориокарциному, назофарингеальную карциному, ларингеальные карциномы, гепатобластому, саркому Капоши, карциномы кожи, гемангиому, кавернозную гемангиому, гемангиобластому, ретинобластому, астроцитому, глиобластому, шванному, олигодендроглиому, медуллобластому, нейробластому, рабдомиосаркому, остеогенную саркому, лейомиосаркомы, карциномы мочевыводящих путей, опухоль Вильмса, почечноклеточную карциному, карциному предстательной железы, аномальную пролиферацию сосудов, ассоциированную с факоматозом, и синдром Мейгса. Злокачественное новообразование, в частности, поддающееся лечению терапевтическими средствами, представленными в настоящем описании, может отличаться одним или несколькими из следующего: злокачественное новообразование имеет ангиогенную активность, повышенные уровни ENG, определяемые в опухоли или сыворотке, повышенные уровни экспрессии или биологической активности BMP-9 или BMP-10, метастазирует или имеет риск метастазирования, или любую их комбинацию.

Ненеопластические нарушения с нерегулируемым ангиогенезом, поддающиеся лечению полипептидами ENG, применимыми в изобретении, включают, в качестве неограничивающих примеров, нежелательную или аномальную гипертрофию, артрит, ревматоидный артрит, псориаз, псориатические бляшки, саркоидоз, атеросклероз, атеросклеротические бляшки, диабетические и другие пролиферативные ретинопатии, включая синдром Терри, ретролентальную фиброплазию, неоваскулярную глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетический отек желтого пятна, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризация трансплантата роговицы, отторжение трансплантата роговицы, неоваскуляризацию сетчатки/сосудистой оболочки, неоваскуляризацию радужки (рубхоз), болезнь неоваскуляризации

глаза, рестеноз сосудов, артериовенозные мальформации (AVM), менингиому, гемангиому, ангиофиброму, гиперплазию щитовидной железы (включая болезнь Грейвса), трансплантацию роговицы и другой ткани, хроническое воспаление, воспаление легких, острое повреждение легких/ARDS, сепсис, первичную легочную гипертензию, злокачественные легочные выпоты, отек мозга (например, ассоциированный с острым инсультом/закрытой черепно-мозговой травмой/травмой), синовиальное воспаление, образование паннуса при RA, оссифицирующий миозит, гипертрофический остеогенез, остеоартрит, рефрактерный асцит, поликистоз яичников, эндометриоз, заболевания с образованием полостей, заполненных жидкостью (панкреатит, компартмент-синдром, ожоги, заболевание кишечника), фиброз матки, преждевременные роды, хроническое воспаление, такое как IBD (болезнь Крона и язвенный колит), отторжение аллотрансплантата почки, воспалительное заболевание кишечника, нефротический синдром, нежелательное или аномальное разрастание тканевых масс (не злокачественных), гемофилический артрит, гипертрофические рубцы, ингибирование роста волос, болезнь Рандю-Вебера-Ослера, пиогенную гранулему, ретролентальную фиброплазию, склеродермию, трахому, сращения сосудов, синовит, дерматит, презклампсию, асциты, перикардиальный выпот (такой как ассоциированный с перикардитом) и плевральный выпот. Дополнительные примеры таких нарушений включают эпителиальные или сердечные нарушения.

В определенных вариантах осуществления таких способов одно или несколько полипептидных терапевтических средств можно вводить совместно (одновременно) или в разные моменты времени (последовательно). Кроме того, полипептидные терапевтические средства можно вводить с другим типом соединений для лечения злокачественного новообразования или для ингибирования ангиогенеза.

В определенных вариантах осуществления рассматриваемые способы по настоящему изобретению можно применять в отдельности. Альтернативно, рассматриваемые способы можно применять в комбинации с другими общепринятыми подходами противоопухолевой

терапии, направленными на лечение или профилактику пролиферативных нарушений (например, опухоли). Например, такие способы можно применять в профилактике злокачественного новообразования, профилактике рецидива злокачественного новообразования и метастазирования после хирургического вмешательства, и в качестве адъюванта в другой общепринятой терапии злокачественного новообразования. В настоящем описании признают, что можно повышать эффективность общепринятых способов терапии злокачественных новообразований (например, химиотерапии, лучевой терапии, фототерапии, иммунотерапии и хирургии), применяя рассматриваемое полипептидное терапевтическое средство.

Показано, что широкий спектр общепринятых соединений имеет противоопухолевую активность. Эти соединения используют в качестве фармацевтических средств в химиотерапии для уменьшения размеров солидных опухолей, профилактике метастазирования и дальнейшего роста или снижения количества злокачественных клеток при лейкозах или злокачественных новообразованиях костного мозга. Хотя химиотерапия эффективна в лечении различных типов злокачественных новообразований, многие противоопухолевые соединения индуцируют нежелательные побочные эффекты. Показано, что при комбинировании двух или более разных способов лечения, они могут действовать синергично и делать возможным снижение дозы каждого из лекарственных средств, таким образом, снижая вредные побочные эффекты, вызываемые каждым соединением при более высоких дозах. В других случаях, злокачественные новообразования, рефрактерные к лечению, могут отвечать на комбинированное лечение двумя или более разными способами лечения.

При одновременном или последовательном введении терапевтического средства, представленного в настоящем описании, в комбинации с другим общепринятым противоопухолевым средством, такое терапевтическое средство может повышать терапевтический эффект противоопухолевого средства или преодолевать резистентность клеток к такому противоопухолевому средству. Это делает возможным снижение дозы противоопухолевого средства, таким образом, снижая нежелательные побочные эффекты, или восстанавливает эффективность

противоопухолевого средства в резистентных клетках.

По настоящему изобретению антиангиогенные средства, представленные в настоящем описании, можно применять в комбинации с другими композициями и способами лечения заболеваний. Например, опухоль можно общепринято лечить посредством хирургического вмешательства, лучевой или химиотерапии в комбинации с полипептидом ENG, а затем можно вводить полипептид ENG пациенту для увеличения периода покоя микрометастазов и для стабилизации любой остаточной первичной опухоли.

В этой области идентифицированы и известны многие антиангиогенные средства, включая приведенные в настоящем описании и, например, в Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004) и Sato *Int. J. Clin. Oncol*, 8:200-206 (2003). Также см. патентную заявку США № US20030055006. В одном из вариантов осуществления полипептид ENG применяют в комбинации с нейтрализующим антителом против VEGF (или фрагментом), и/или другим антагонистом VEGF, или антагонистом рецептора VEGF, включая, в качестве неограничивающих примеров, растворимый рецептор VEGF (например, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, фрагменты нейропилинов (например, NRP1, NRP2)), аптамеры, способные блокировать VEGF или VEGFR, нейтрализующие антитела против VEGFR, низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR (RTK), антисмысловые стратегии для VEGF, рибозимы против VEGF или рецепторов VEGF, варианты антагонистов VEGF и любые их комбинации. Альтернативно или дополнительно, в дополнение к антагонисту VEGF и другому средству пациенту можно совместно вводить, необязательно, два или более ингибиторов ангиогенеза. В определенном варианте осуществления в комбинации с полипептидом ENG, антагонистом VEGF и антиангиогенным средством можно вводить одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например, противоопухолевых средств.

Термины "VEGF" и "VEGF-A" взаимозаменяемо используют в отношении фактора роста эндотелия сосудов из 165 аминокислот и родственных факторов роста эндотелия сосудов из 121, 145, 183, 189 и 206 аминокислот, как описано в Leung et al. *Science*, 246:1306

(1989), Houck et al. *Mol Endocrinol*, 5:1806 (1991) и Robinson & Stringer, *J Cell Sci*, 144(5):853-865 (2001), вместе с его природными аллельными и процессированными формами.

Термин "антагонист VEGF" относится к молекуле, способной нейтрализовать, блокировать, ингибировать, отменять, снижать или противодействовать активностям VEGF, включая его связывание с одним или несколькими рецепторами VEGF. Антагонисты VEGF включают антитела против VEGF и их антигенсвязывающие фрагменты, молекулы рецепторов и производные, специфически связывающиеся с VEGF, таким образом, блокируя его связывание с одним или несколькими рецепторами, антителами против рецепторов VEGF и антагонистами рецепторов VEGF, такими как низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR, и слитые белки, например, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-гелонин (Peregrine). Антагонисты VEGF также включают варианты антагонистов VEGF, бессмысловые молекулы против VEGF, аптамеры РНК и рибозимы против VEGF или рецепторов VEGF.

"Антитело против VEGF" является антителом, связывающимся с VEGF с достаточной аффинностью и специфичностью. Антитело против VEGF можно использовать в качестве терапевтического средства для таргетной терапии и противодействия заболеваниям или состояниям, в которые вовлечена активность VEGF. См., например, патенты США № 6582959 6703020; WO98/45332; WO96/30046; WO94/10202, WO2005/044853; EP 0666868B1; патентные заявки США № 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 и 20050112126; Popkov et al, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004); и WO2005012359. Антитело против VEGF, как правило, не будет связываться ни с другими гомологами VEGF, такими как VEGF-B или VEGF-C, ни с другими факторами роста, такими как PlGF, PDGF или bFGF. Антитело против VEGF "бевацизумаб (BV)", также известное как "rhuMAb VEGF" или "Avastin®", является рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом против VEGF, полученным согласно Presta et al. *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997). Оно содержит мутантные каркасные области IgG1 человека и антигенсвязывающие определяющие комплементарность области из моноклонального антитела мыши против hVEGF A.4.6.1, блокирующего

связывание VEGF человека с его рецепторами. Приблизительно 93% аминокислотной последовательности бевацизумаба, включая большую часть каркасных областей, получают из IgG1 человека, и приблизительно 7% последовательности получают из антитела мыши A4.6.1. Бевацизумаб имеет молекулярную массу приблизительно 149000 Да и является гликозилированным. Бевацизумаб и другие гуманизированные антитела против VEGF, включая фрагмент антитела против VEGF "ранибизумаб", также известный как "Lucentis®", дополнительно описывают в патенте США № 6884879, выданном 26 февраля 2005 года.

Термин "противоопухолевая композиция" относится к композиции, применимой в лечении злокачественного новообразования, содержащей по меньшей мере одно активное терапевтическое средство, например, "противоопухолевое средство". Примеры терапевтических средств (противоопухолевых средств, также обозначаемых в настоящем описании как "противоопухолевое средство") включают, в качестве неограничивающих примеров, например, химиотерапевтические средства, ингибирующие рост средства, цитотоксические средства, средства, используемые в лучевой терапии, антиангиогенные средства, апоптотические средства, антитубулиновые средства, токсины, и другие средства для лечения злокачественных новообразований, например, нейтрализующее антитело против VEGF, антагонист VEGF, средства против HER-2, против CD20, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназ), ингибитор HER1/EGFR, эрлотиниб, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), связывающиеся с одним или несколькими из ErbB2, ErbB3, ErbB4 или рецепторов VEGF, ингибиторы тирозинкиназ рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и/или фактора стволовых клеток (SCF) (например, иматиниба мезилат (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2L и другие биоактивные и органические химические средства, и т.д.

"Ангиогенный фактор или средство" является фактором роста, стимулирующим развитие кровеносных сосудов, например, стимулирующим ангиогенез, рост эндотелиальных клеток, стабильность

кровеносных сосудов и/или васкулогенез и т.д. Например, ангиогенные факторы включают, в качестве неограничивающих примеров, VEGF и членов семейства VEGF, PlGF, семейство PDGF, семейство фактора роста фибробластов (FGF), лиганды TIE (ангиопоэтины), эфрины, ANGPTL3, ALK-1, и т.д. Они также будут включать факторы, усиливающие заживление ран, такие как гормон роста, инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I), VIGF, эпидермальный фактор роста (EGF), CTGF и членов его семейства и TGF- α и TGF- β . См., например, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (например, таблицу 1, в которой приведены ангиогенные факторы); и Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

Термин "антиангиогенное средство" или "ингибитор ангиогенеза" относится к низкомолекулярному веществу, полинуклеотиду (включая, например, ингибиторную РНК (РНКи или миРНК)), полипептид, выделенный белок, рекомбинантный белок, антитело или его конъюгаты или слитые белки, прямо или косвенно ингибирующие ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов. Например, антиангиогенное средство является антителом или другим антагонистом ангиогенного средства, как определено выше, например, антителами против VEGF, антителами против рецепторов VEGF, низкомолекулярными соединениями, блокирующим передачу сигнала рецепторами VEGF (например, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU 11248 (сунитиниб малат), AMG706 или описываемые, например, в международной патентной заявке № WO2004/113304). Антиангиогенные средства также включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т.д. См., например, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (например, таблицу 3, в которой представлена антиангиогенная терапия при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo, *Nat Med* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (например, таблицу 2,

в которой приведены ангиогенные факторы); и Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003) (например, в таблице 1 приведены антиангиогенные средства, используемые в клинических испытаниях).

В определенных аспектах изобретения другие терапевтические средства, применимые для комбинированной противоопухолевой терапии с помощью полипептида ENG, включают другие способы терапии злокачественных новообразований: например, хирургическое вмешательство, цитотоксические средства, способы лучевой терапии, включающие облучение или введение радиоактивных веществ, химиотерапевтические средства, противогормональные средства, ингибирующие рост средства, противоопухолевые композиции и лечение противоопухолевыми средствами, приведенными в настоящем описании и известными в этой области, или их комбинации.

Как применяют в настоящем описании, термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, ингибирующему или предотвращающему функционирование клеток и/или вызывающему деструкцию клеток. Термин предназначен для включения радиоактивных изотопов (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивных изотопов Lu), химиотерапевтических средств, например, метотрексата, адриамицина, алкалоидов барвинка (винкристина, винбластин, этопозид), доксорубицина, мелфалана, митомицина С, хлорамбуцила, даунорубицина или других интеркаляторов, ферментов и их фрагментов, таких как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно-активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые или противораковые средства, описываемые ниже. Другие цитотоксические средства описаны ниже. Туморицидное средство вызывает деструкцию опухолевых клеток.

"Химиотерапевтическое средство" является химическим соединением, применимым в лечении злокачественного новообразования. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан;

азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфаорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабиол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HUSAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополетин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацилиприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихемицин, в частности, калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемистин, включая динемистин А; эсперамицин; а также неокарциноистатин хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры эндиинового антибиотика), аклациномизины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-1-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиноистатин,

зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолонa, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадреналовые средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; производное фолиевой кислоты, такое как фолиновая кислота; ацетлатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоиды, например, TAXOL® паклитаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ без кремофора, состав сконструированных альбуминовых наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), и TAXOTERE® доксетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейковорин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклутерин; ибандронат; ингибитор топоизомераз RFS 2000;

дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); фармацевтически приемлем соли, кислоты или производные любого из указанных выше; а также комбинации двух или более из указанных выше, такие как CHOP, an аббревиатура для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, аббревиатура для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) в комбинации с 5-FU и лейковорином.

В определение также включены противогормональные средства, регулирующие, снижающие, блокирующие или ингибирующие эффекты гормонов, которые могут стимулировать рост злокачественного новообразования, и зачастую находятся в форме системного или общего лечения. Они могут сами являться гормонами. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX® тамоксифен), EVISTA® ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® торемифен; антипрогестероны; ингибиторы рецепторов эстрогена (ERD); средства, супрессирующие или прекращающие работу яичников, например, агонисты гонадолиберина (LHRH), такие как LUPRON® и ELIGARD® лейпролида ацетат, гозерелина ацетат, бусерелина ацетат и трипторелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, регулирующую продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® мегестрола ацетат, AROMASIN® экземестан, форместанин, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол, и ARIMIDEX® анастрозол. Кроме того, такое определение химиотерапевтических средств включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), DIDROCAL® этидронат, NE-58095, ZOMETA® золедроновую кислоту/золедронат, FOSAMAX® аледронат, AREDIA® памидронат, SKELID® тилудронат, или ACTONEL® ризедронат; а также троксацитабин (аналог нуклеозида цитозина 1,3-

диоксолан); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, ингибирующие экспрессию генов пути передачи сигнала, участвующего в аномальной клеточной пролиферации, такие как, например, РКС-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE®, и генотерапевтические вакцины, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы I LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRN; лапатиниб дитозилат (двойной низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназ ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше.

Как применяют в настоящем описании, термин "ингибирующее рост средство" относится к соединению или композиции, ингибирующей рост клетки *in vitro* или *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может являться средством, значительно снижающим процентную долю клеток в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (в ином месте, чем S-фаза), такие как средства индуцирующие арест клеточного цикла в G1-фазе и в M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Средства, вызывающие арест клеточного цикла в G1-фазе также приводят к аресту клеточного цикла в S-фазе, например, ДНК-алкилирующие средства, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, названной "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), в частности p. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противоопухолевыми лекарственными средствами, получаемыми из тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), получаемый из тиса европейского, является полусинтетическим аналогом паклитаксела

(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, предотвращая деполимеризацию, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

Кроме того, индивидуумам, о которых известно, что они имеют высокий риск развития новых и рецидивирующих злокачественных новообразований, профилактически можно вводить средства, ингибирующие ангиогенез. Таким образом, аспект настоящего изобретения включает способы профилактики злокачественного новообразования у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества полипептида ENG и/или его производного или другого средства по настоящему изобретению, ингибирующего ангиогенез.

Конкретные нормальные физиологические процессы также ассоциированы с ангиогенезом, например, овуляция, менструация и плацентация. Белки по настоящему изобретению, ингибирующие ангиогенез, применимы в лечении заболевания с избыточной или аномальной стимуляцией эндотелиальных клеток. Эти заболевания включают, в качестве неограничивающих примеров, спайки в желудочно-кишечном тракте, атеросклероз, склеродермию и гипертрофические рубцы, т.е. келоиды. Они также применимы в лечении заболеваний, включающих ангиогенез как патологическое следствие, таких как болезнь кошачьих царапин (*Rochela minalia quintosa*) и язвы (*Helicobacter pylori*).

Общие белки, ингибирующие ангиогенез, можно использовать в качестве противозачаточных средств, снижая или предотвращая васкуляризацию матки, необходимую для имплантации эмбриона. Таким образом, настоящее изобретение относится к эффективному способу контроля рождаемости, когда женщине вводят количество ингибиторного белка, достаточное для предотвращения имплантации эмбриона. В одном из аспектов способа контроля рождаемости количество ингибирующего белка, достаточное для блокирования имплантации эмбриона, вводят до или после полового акта и оплодотворения, таким образом, предоставляя эффективный способ контроля рождаемости, возможно способ, "используемый на следующее

утро". Хотя и не желая быть связанными этим утверждением, полагают, что ингибирование васкуляризации эндометрия матки препятствует имплантации бластоцисты. Аналогичное ингибирование васкуляризации слизистой оболочки маточной трубы препятствует имплантации бластоцисты, предотвращая возникновение внематочной беременности. Способы введения могут включать, в качестве неограничивающих примеров, пилюли, инъекции (внутривенные, подкожные, внутримышечные), суппозитории, вагинальные губки, вагинальные тампоны и внутриматочные контрацептивы. Также считают, что введение средств по настоящему изобретению, ингибирующих ангиогенез, будет препятствовать нормальной повышенной васкуляризации плаценты, а также развитию сосудов в успешно имплантировавшейся бластоцисте и развитию эмбриона и плода.

В глазу ангиогенез ассоциирован, например, с диабетической ретинопатией, синдромом Терри, дегенерацией желтого пятна, отторжением трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомой и ретролентальной фиброплазией. Терапевтические средства, представленные в настоящем описании, можно вводить интраокулярно или посредством другого местного введения в глаз. Другие заболевания, ассоциированные с ангиогенезом в глазу, включают в качестве неограничивающих примеров, эпидемический кератоконъюнктивит, дефицит витамина А, излишнее ношение контактных линз, атопический кератит, верхний лимбальный кератит, птеригиум, сухой кератоконъюнктивит, синдром Шегрена, розацеа, фликтенулез, сифилис, микобактериальную инфекцию, липидную дегенерацию, химические ожоги, бактериальные язвы, грибковые язвы, инфекции, вызванные вирусом простого герпеса, опоясывающий лишай, инфекции, вызванные простейшими, саркому Капоши, язву Мурена, краевую дегенерацию роговицы Терьена, краевой кератолиз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, полиартериит, травму, гранулематоз Вегенера, склерит, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, радиальную кератотомию, отторжение трансплантата роговицы, серповидноклеточную анемию, саркоид, эластическую псевдоксантому, болезнь Педжета, окклюзию вен, окклюзию артерий, обструктивное заболевание сонных артерий (carotid obstructive

disease), хронический увеит/витреит, микобактериальные инфекции, болезнь Лайма, системную красную волчанку, синдром Терри, болезнь Илза, болезнь Бехчета, инфекции, вызывающие ретинит или хориоидит, предполагаемый глазной гистоплазмоз, болезнь Беста, миопию, ямки диска зрительного нерва, болезнь Штаргардта, промежуточный увеит, хроническое отслоение сетчатки, синдром повышенной вязкости крови, токсоплазмоз, осложнения после травмы и лазерной обработки. Другие заболевания включают, в качестве неограничивающих примеров, заболевания, ассоциированные с рубеозом (неоваскуляризацией угла передней камеры), и заболевания, вызываемые аномальной пролиферацией сосудисто-волокнутой или волокнутой ткани, включая все формы пролиферативной витреоретинопатии.

Состояния глаза можно подвергать лечению или профилактике, например, посредством системной, местной, внутриглазной инъекции терапевтического средства или посредством введения устройства с замедленным высвобождением, высвобождающего терапевтическое средство. Терапевтическое средство можно доставлять в фармацевтически приемлемом офтальмологическом наполнителе, таким образом, что соединение поддерживают в контакте с поверхностью глаза в течение достаточного периода времени, чтобы позволять соединению проникать через роговицу и внутренние области глаза, например, переднюю камеру, заднюю камеру, стекловидное тело, водянистую влагу, жидкую часть стекловидного тела, роговицу, радужку/ресничное тело, хрусталик, сосудистую оболочку глаза/сетчатку и склеру. Фармацевтически приемлемый офтальмологический наполнитель, например, может являться мазью, растительным маслом или инкапсулирующим материалом. Альтернативно, терапевтические средства по настоящему изобретению можно инъектировать напрямую в стекловидное тело и водянистую влагу. Кроме того, альтернативно, соединения можно вводить системно, например, посредством внутривенной инфузии или инъекции, для лечения глаза.

Можно вводить одно или несколько терапевтических средств. Способы по настоящему изобретению также включают совместное введение с другими лекарственными средствами, используемыми для

лечения состояний глаза. При введении нескольких средств или комбинации средств и лекарственных средств, введение можно осуществлять одновременно или последовательно. Терапевтические средства и/или лекарственные средства можно вводить различными путями введения или одним и тем же путем введения. В одном из вариантов осуществления терапевтическое средство и лекарственное средство вводят вместе с офтальмологическим фармацевтическим составом.

В одном из вариантов осуществления терапевтическое средство применяют для лечения заболевания, ассоциированного с ангиогенезом в глазу, посредством конкурентного введения с другими лекарственными средствами, блокирующими ангиогенез с помощью фармакологических механизмов. Лекарственные средства, которые можно вводить одновременно с терапевтическим средством по настоящему изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, пегаптаниб (Macugen[™]), ранибизумаб (Lucentis[™]), скваламина лактат (Evizon[™]), гепараназу и глюкокортикоиды (например, триамцинолон). Один из вариантов осуществления относится к способу лечения заболевания, ассоциированного с ангиогенезом, посредством введения офтальмологического фармацевтического состава, содержащего по меньшей мере одно терапевтическое средство, представленное в настоящем описании, и по меньшей мере одно из следующих лекарственных средств: пагаптаниб (Macugen[™]), ранибизумаб (Lucentis[™]), скваламина лактат (Evizon[™]), гепараназу и глюкокортикоиды (например, триамцинолон).

Другие заболевания или нарушения

В некоторых вариантах осуществления полипептиды ENG можно применять для лечения пациента, страдающего сердечно-сосудистым нарушением или состоянием, ассоциированным с BMP-9 или BMP-10, но не обязательно с сопутствующим ангиогенезом. Неограничивающие примеры нарушений этого типа включают заболевание сердца (включая заболевание миокарда, инфаркт миокарда, стенокардию и заболевание клапанов сердца); заболевание почек (включая хроническое воспаление клубочков, диабетическую почечную недостаточность и

ассоциированное с волчанкой воспаление почек); нарушения кровяного давления (включая системный и легочный типы); нарушения, ассоциированные с атеросклерозом или другими типами артериосклероза (включая инсульт, геморрагический инсульт, субарахноидальное кровоотечение, стенокардию и почечный артериосклероз); тромботические нарушения (включая тромбоз сосудов головного мозга, легочный тромбоз, тромботический некроз кишечника); осложнения диабета (включая диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетическую полинейропатию, диабетическую гангрену и связанные с диабетом хронические инфекции); воспалительные нарушения сосудов (системную красную волчанку, ревматизм суставов, воспаление артерий суставов, крупноклеточное воспаление артерий, болезнь Кавасаки, болезнь Такаясу, синдром Чарга-Стросса и болезнь Шенлейн-Геноха); и нарушения сердца, такие как врожденное заболевание сердца, кардиомиопатия (например, дилатационная, гипертрофическая, рестриктивная кардиомиопатия) и застойная сердечная недостаточность. Полипептид ENG можно вводить индивидууму в отдельности или в комбинации с одним или несколькими средствами или способами терапии, например, терапевтическими средствами, применимыми для лечения BMP-9/10-ассоциированных сердечно-сосудистых нарушений и/или состояний. В одном из вариантов осуществления второе средство или способ терапии выбран из одного или нескольких из: ангиопластики, бета-блокаторов, гипотензивных средств, кардиотонических средств, антитромботических средств, вазодилататоров, антагонистов гормонов, антагонистов эндотелина, блокаторов кальциевых каналов, ингибиторов фосфодиэстеразы, антагонистов ангиотензина типа 2 и/или блокаторов/ингибиторов цитокинов.

В других вариантах осуществления полипептиды ENG могут быть применимы в лечении воспалительных нарушений или состояний, вероятно, связанных с BMP9, но еще не указанных выше. Примеры нарушений включают заболевание печени (включая острый гепатит, хронический гепатит и цирроз); торакальный или абдоминальный отек; хроническое заболевание поджелудочной железы; аллергии (включая

аллергический ринит, астму, бронхит и атопический дерматит); болезнь Альцгеймера; синдром Рейно и диффузный склероз.

3. Составы и эффективные дозы

Терапевтические средства, представленные в настоящем описании, можно составлять в фармацевтических композициях. Фармацевтические композиции для применения по настоящему изобретению можно составлять общепринятым образом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей или эксципиентов. Такие составы, как правило, будут, по существу, апиrogenными, в соответствии с большинством нормативных требований.

В определенных вариантах осуществления терапевтический способ по настоящему изобретению включает системное или местное введение композиции в виде имплантата или устройства. При введении терапевтическая композиция для применения по настоящему изобретению находится в апиrogenной, физиологически приемлемой форме. Терапевтически применимые средства, иные, чем антагонисты передачи сигнала ENG, которые, необязательно, также можно включать в композицию, как описано выше, можно вводить одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями (например, полипептидами ENG) в способах, представленных в настоящем описании.

Как правило, белковые терапевтические средства, представленные в настоящем описании, будут вводить парентерально и, в частности, внутривенно или подкожно. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов ENG в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые можно восстанавливать в стерильные инъеклируемые растворы или растворы непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворы, делающие состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие средства или

загустители. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Можно поддерживать подходящую текучесть, например, используя материалы для покрытия, такие как лецитин, поддерживая необходимый размер частиц в случае дисперсий и используя поверхностно-активные вещества.

В одном из вариантов осуществления полипептиды ENG, представленные в настоящем описании, вводят в офтальмологическом фармацевтическом составе. В некоторых вариантах осуществления офтальмологический фармацевтический состав является стерильным водным раствором, предпочтительно, с подходящей концентрацией для инъекции, или мазью. Такие мази, как правило, содержат один или несколько полипептидов ENG, представленных в настоящем описании, растворенных или суспендированных в стерильной фармацевтически приемлемой мазевой основе, такой как основа минеральное масло-белый вазелин. В композициях мазей в состав также можно включать безводный ланолин. В такие композиции мазей также предпочтительно добавляют тиомерсал или хлорбутанол в качестве противомикробных средств. В одном из вариантов осуществления стерильный водный раствор является таким, как описано в патенте США № 6071958.

Настоящее изобретение относится к составам, которые можно варьировать по включению кислот и оснований для корректировки pH и буферных средств для поддержания pH в узком диапазоне. В состав можно добавлять дополнительные лекарственные средства. Они включают, в качестве неограничивающих примеров, пагаптаниб, гепараназу, ранибизумаб или глюкокортикоиды. Офтальмологический фармацевтический состав по настоящему изобретению получают посредством асептических манипуляций, или осуществляют стерилизацию на подходящей стадии получения.

Композиции и составы, при желании, могут находиться в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну

или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Например, упаковка может содержать металлическую фольгу или полимерную пленку, такая как блистерная упаковка. Упаковку или дозирующее устройство можно дополнять инструкциями по введению.

4. Растворимые полипептиды ENG

За исключением конкретных условий, природные белки ENG являются трансмембранными белками, при этом часть белка расположена вне клетки (внеклеточная часть), и часть белка расположена внутри клетки (внутриклеточная часть). Аспекты настоящего изобретения включают полипептиды, содержащие часть внеклеточного домена (ECD) ENG.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам ENG. Полипептиды ENG могут включать полипептид, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную и, необязательно, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную укороченному домену ECD природного полипептида ENG, С-конец которого приходится на любую из аминокислот 333-378 SEQ ID NO: 1, и где полипептид не включает последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1. Необязательно, полипептид ENG не включает более 5 последовательных аминокислот или более 10, 20, 30, 40, 50, 52, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 или более последовательных аминокислот из последовательности, состоящей из аминокислот 379-586 SEQ ID NO: 1, или последовательности, состоящей из аминокислот 379-581 SEQ ID NO: 1. Непроцессированный полипептид ENG может включать или исключать любую сигнальную последовательность, а также любую последовательность, N-концевую по отношению к сигнальной последовательности. Как подробно представлено в настоящем описании, N-конец зрелого (процессированного) полипептида ENG может приходиться на любую из аминокислот 26-42 SEQ ID NO: 1. Примеры зрелых полипептидов ENG включают аминокислоты 25-377 SEQ ID NO: 23, аминокислоты 25-358 SEQ ID NO: 25 и аминокислоты 25-345 SEQ ID NO: 29. Аналогично, полипептид ENG может содержать полипептид, кодируемый нуклеотидами

73-1131 SEQ ID NO: 24, нуклеотидами 73-1074 SEQ ID NO: 26 или нуклеотидами 73-1035 SEQ ID NO: 30, или их молчащими вариантами или нуклеиновыми кислотами, гибридизующимися с последовательностью, комплементарной им, в строгих условиях гибридизации (как правило, такие условия известны в этой области, но могут включать, например, гибридизацию в 50% об./об. формамиде, 5-кратном SSC, 2% масс./об. блокирующем средстве, 0,1% N-лауроилсаркозине и 0,3% SDS при 65°C в течение ночи и промывку, например, 5-кратным SSC при приблизительно 65°C). Таким образом, термин "полипептид ENG" включает выделенные внеклеточные части полипептидов ENG, их варианты (включая варианты, содержащие, например, не более 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 замен аминокислот в последовательности, соответствующей аминокислотам 26-378 SEQ ID NO: 1), их фрагменты и слитые белки, содержащие что-либо из указанного выше, но в каждом случае, предпочтительно, любой из указанных выше полипептидов ENG будет сохранять значительную аффинность к BMP-9 и/или BMP-10. Как правило, полипептид ENG будут конструировать растворимыми в водных растворах при биологически значимых температурах, уровнях pH и осмолярности.

Данные, представленные в настоящем описании, свидетельствуют о том, что Fc-слитые белки, содержащие более короткие, укороченные с С-конца варианты полипептидов ENG, не проявляют значительного связывания с TGF- β 1 и TGF- β 3, но, вместо этого, проявляют более высокоаффинное связывание с BMP-9, со значимо меньшей скоростью диссоциации по сравнению с ENG(26-437)-Fc или Fc-слитым белком, содержащим полноразмерный ENG ECD. Конкретно, обнаруживали, что все укороченные с С-конца варианты, заканчивающиеся аминокислотами 378, 359 и 346 SEQ ID NO: 1, связываются с BMP-9 со значимо более высокой аффинностью (и связываются с BMP-10 с не меньшей аффинностью) по сравнению с ENG(26-437) или ENG(26-586). Однако, связывание с BMP-9 и BMP-10 полностью нарушалось более обширными укорочениями С-конца до аминокислот 332, 329 или 257. Таким образом, ожидают, что все полипептиды ENG, заканчивающиеся между

аминокислотой 333 и аминокислотой 378, будут активными, но конструкции, заканчивающиеся аминокислотами 346 и 359 или между ними, могут являться наиболее активными. Предсказывали, что формы, заканчивающиеся аминокислотами 360 и 378 или между ними, имеют тенденцию к промежуточной аффинности связывания лиганда, показанной ENG(26-378). Ожидает улучшений в других ключевых параметрах в случае конкретных конструкций, заканчивающихся аминокислотами 333 и 378 или между ними, с учетом улучшений экспрессии белка и времени полувыведения, наблюдаемых в случае ENG(26-346)-Fc по сравнению со слитыми белками, содержащими полноразмерный ECD ENG (см. примеры). Желательным может являться использование любого из этих укороченных вариантов в зависимости от клинических или экспериментальных условий.

Ожидает, что на N-конце полипептид ENG, начинающийся с аминокислоты 26 (начального глутамата) SEQ ID NO: 1 или перед ней, будет сохранять активность связывания лиганда. Как представлено в настоящем описании, N-концевое укорочение до аминокислоты 61 SEQ ID NO: 1 устраняет связывание лиганда, как и более обширные укорочения N-конца. Однако, как дополнительно представлено в настоящем описании, консенсусное моделирование первичных последовательностей ENG свидетельствует о том, что упорядоченная вторичная структура в области, определяемой аминокислотами 26-60 SEQ ID NO: 1, ограничена бета-тяжем из четырех остатков, с высокой достоверностью предсказанным в положениях 42-45 SEQ ID NO: 1, и бета-тяжем из двух остатков, с очень низкой достоверностью предсказанным в положениях 28-29 SEQ ID NO: 1. Таким образом, активный полипептид ENG, предпочтительно, будет начинаться с (или до) аминокислоты 26 или с любой из аминокислот 27-42 SEQ ID NO: 1.

В совокупности, активная часть полипептида ENG может содержать аминокислотные последовательности 26-333, 26-334, 26-335, 26-336, 26-337, 26-338, 26-339, 26-340, 26-341, 26-342, 26-343, 26-344, 26-345 или 26-346 SEQ ID NO: 1, а также варианты этих последовательностей, начинающиеся с любой из аминокислот 27-42 SEQ ID NO: 1. Примеры полипептидов ENG содержат аминокислотные последовательности 26-346, 26-359 и 26-378 SEQ ID NO: 1. Также

включены варианты в этих диапазонах, в частности, варианты, имеющие по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности по отношению к соответствующей части SEQ ID NO: 1. Полипептид ENG может не включать последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1.

Как описано выше, настоящее изобретение относится к полипептидам ENG, имеющим конкретную степень идентичности или схожести последовательности по отношению к природному полипептиду ENG. Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей, их выравнивают в целях оптимального сравнения (например, можно включать пропуски в одной или обеих первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания, и в целях сравнения можно не принимать во внимание негомологичные последовательности). Затем сравнивают аминокислотные остатки в соответствующих положениях аминокислот. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении (как применяют в настоящем описании, "идентичность" аминокислоты эквивалентна "гомологии" аминокислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, принимая во внимание количество пропусков и длину каждого пропуска, который необходимо включать для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности и схожести двух последовательностей можно осуществлять с использованием математического алгоритма. (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J.,

eds., M Stockton Press, New York, 1991).

В одном из вариантов осуществления процент идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), включенного в программу GAP в пакете программ GCG (доступном на <http://www.gcg.com>). В конкретном варианте осуществления в программе GAP используют следующие параметры: матрицу Blosum 62 или матрицу PAM250, штраф за открытие пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штраф за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В еще одном варианте осуществления процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей определяют с использованием программы GAP в пакете программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12(1):387 (1984)) (доступном на <http://www.gcg.com>). Примеры параметров включают использование матрицы NWSgapdna.CMP, штрафа за открытие пропуска 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафа за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Если не указано иначе, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей следует определять с помощью программы GAP с использованием матрицы Blosum 62, штрафа за открытие пропуска 10 и штрафа за удлинение пропуска 3, и если с помощью такого алгоритма нельзя вычислить желаемый процент идентичности, необходимо выбирать подходящую альтернативу, представленную в настоящем описании.

В другом варианте осуществления процент идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма E. Myers и W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), включенного в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы веса остатков PAM120, штрафа за удлинение пропуска 12 и штрафа за открытие пропуска 4.

Другой вариант осуществления для определения лучшего общего выравнивания между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al. (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). При выравнивании последовательностей запрашиваемая и рассматриваемая последовательности являются аминокислотными последовательностями. Результат указанного глобального

выравнивания последовательностей представлен в терминах процента идентичности. В одном из вариантов осуществления идентичность аминокислотных последовательностей определяют с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag *et al.* (*Comp. App. Biosci.*, 6:237-245 (1990)). В конкретном варианте осуществления параметры, используемые для вычисления процента идентичности и схожести выравниваемых аминокислот, включают: матрица=PAM 150, размер участка максимального совпадения=2, штраф за несовпадение=1, штраф за соединение=20, длина группы рандомизации=0, граничный балл=1, штраф за открытие пропуска=5 и штраф за удлинение пропуска=0,05.

В определенных вариантах осуществления полипептид ENG связывается с BMP-9 и BMP-10, и полипептид ENG не демонстрирует значительного связывания с TGF- β 1 или TGF- β 3. Связывание можно оценивать с использованием очищенных белков в растворе или в системе поверхностного плазмонного резонанса, такой как система Biacore[™]. Можно выбирать полипептиды ENG, проявляющие антиангиогенную активность. Биологические анализы на активность ингибирования ангиогенеза включают анализ хориоаллантоиновой мембраны куриного яйца (CAM), анализ ангиореактора мыши и анализы для измерения эффекта введения выделенных или синтезированных белков в отношении имплантированных опухолей. Анализ CAM, анализ ангиореактора мыши и другие анализы описаны в примерах.

Полипептиды ENG дополнительно могут включать какую-либо из различных лидерных последовательностей на N-конце. Такая последовательность будет позволять пептидам экспрессироваться и воздействовать на путь секреции в эукариотической системе. См., например, Ernst *et al.*, патент США № 5082783 (1992). Альтернативно, нативную сигнальную последовательность ENG можно использовать для воздействия на экструзию из клетки. Возможные лидерные последовательности включают меллитин пчелы медоносной, TPA и нативные лидерные последовательности (SEQ ID NO: 13-15, соответственно). Примеры слитых белков ENG-Fc, включающих лидерную последовательность TPA, включают SEQ ID NO: 23, 25, 27 и 29. Процессинг сигнальных пептидов может варьироваться, помимо других

переменных факторов, в зависимости от выбранной лидерной последовательности, используемого типа клеток и условий культивирования, и, таким образом, конкретные N-концевые участки инициации транскрипции в случае зрелых полипептидов ENG могут сдвигаться на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в направлении N-конца или С-конца. Примеры зрелых слитых белков ENG-Fc включают SEQ ID NO: 33-36, как представлено ниже с подчеркнутой частью полипептида ENG.

ENG(26-378)-hFc человека (укороченный Fc)

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSE
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRT
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW
LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTPPKDTCS PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVATGG
 GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG
 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 33)

ENG(26-359)-hFc человека

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSE
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRT
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW
LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTPPKDTCS PELLMSLITG GPKSCDKTH TCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 34)

ENG(26-359)-hFc человека (укороченный Fc)

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSE
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRT
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW

LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGTHTCPPCP APELLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

ENG(26-346)-hFc человека (укороченный Fc)

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLVLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPPE GVNTTELPSPF
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW
LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPTGGGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 36)

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены конкретные мутации полипептидной ENG таким образом, что изменяют гликозилирование полипептида. Можно выбирать такие мутации таким образом, чтобы встраивать или удалять один или несколько участков гликозилирования, таких как О-связанные или N-связанные участки гликозилирования. Как правило, аспарагин-связанные участки распознавания гликозилирования содержат трипептидную последовательность, аспарагин-Х-треонин (или аспарагин-Х-серин) (где "Х" является любой аминокислотой), специфически распознаваемую соответствующими клеточными ферментами гликозилирования. Изменение также можно осуществлять посредством добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательность полипептида ENG дикого типа (в случае О-связанных участков гликозилирования). Множество замен или делеций аминокислот в одном или обоих первом или третьем положениях аминокислот участка распознавания гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) приводит к отсутствию гликозилирования в модифицированной трипептидной

последовательности. Другими способами повышения количества молекул углеводов на полипептиде ENG является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду ENG. В зависимости от используемого способа присоединения, сахара можно присоединять к (a) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан; или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, опубликованном 11 сентября 1987 года, и Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, включенных в настоящее описание посредством ссылок. Удаление одной или нескольких молекул углеводов, присутствующих на полипептиде ENG, можно осуществлять химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование может включать, например, подвергание полипептида ENG воздействию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением соединяющего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), одновременно оставляя аминокислотную последовательность интактной. Химическое дегликозилирование дополнительно описано Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление молекул углеводов на полипептидах ENG можно осуществлять с использованием различных эндо- и экзо-гликозидаз, как описано Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность полипептида ENG при необходимости можно корректировать в зависимости от типа используемой системы экспрессии, т.к. все из клеток млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут встраивать различные профили гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. В основном, полипептиды ENG для применения у людей будут экспрессироваться в линии клеток млекопитающих, обеспечивающей правильное гликозилирование, такой как линии клеток HEK293 или

СНО, хотя ожидают, что другие экспрессирующие линии клеток млекопитающих, линии дрожжевых клеток со сконструированными ферментами гликозилирования и клетки насекомых также будут применимыми.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ получения мутантов, в частности, наборов комбинаторных мутантов полипептида ENG, а также укороченные мутанты; совокупности комбинаторных мутантов особенно применимы для идентификации функционального варианта последовательности. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может являться получение, например, вариантов полипептида ENG, которые могут действовать как агонисты или антагонисты, или альтернативно, которые вместе обладают новыми активностями. Ниже представлены различные анализы для скрининга, и такие анализы можно использовать для оценки вариантов. Например, вариант полипептида ENG можно подвергать скринингу на способность связываться с лигандом ENG для предотвращения связывания лиганда ENG с полипептидом ENG или для противодействия передачи сигнала, вызываемой лигандом ENG. Активность полипептида ENG или его вариантов также можно тестировать в клеточном анализе или анализе *in vivo*, в частности, любом из анализов, описываемых в примерах.

Можно получать варианты, полученные комбинаторно, имеющие селективную или, как правило, повышенную активность относительно полипептида ENG, содержащего внеклеточный домен природного полипептида ENG. Аналогично, с помощью мутагенеза можно получать варианты, имеющие время полужизни в сыворотке, значительно отличающееся от соответствующего полипептида ENG дикого типа. Например, измененный белок можно делать более стабильным или менее стабильным к протеолитической деградации или другим процессам, приводящим к деструкции или иной элиминации или инактивации нативного полипептида ENG. Такие варианты и кодирующие их гены можно использовать для изменения уровней полипептидов ENG посредством модуляции времени полужизни полипептидов ENG. Например, короткое время полужизни может приводить к более временным биологическим эффектам и делать возможным более жесткий контроль уровней рекомбинантного полипептида ENG у пациента. В

слитый белок Fc можно встраивать мутации в линкере (при его наличии) и/или Fc-части для изменения времени полужизни белка.

Можно получать комбинаторную библиотеку с помощью вырожденной библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых включает, по меньшей мере, часть потенциальных последовательностей полипептида ENG. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативно лигировать в последовательности генов таким образом, что вырожденный набор потенциальных нуклеотидных последовательностей полипептида ENG экспрессируется в виде отдельных полипептидов, или альтернативно, в виде набора более крупных слитых белков (например, в случае фагового дисплея).

Существует множество способов, с помощью которых можно получать библиотеку потенциальных вариантов полипептидов ENG из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной последовательности гена можно осуществлять с помощью автоматизированного ДНК-синтезатора, а затем синтетические гены можно лигировать в подходящий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в этой области (см. например, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Такие способы используют для прямой оценки других белков (см., например, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; а также патенты США №: 5223409, 5198346 и 5096815).

Альтернативно, можно использовать другие формы мутагена для получения комбинаторной библиотеки. Например, варианты полипептида ENG можно получать и выделять из библиотеки посредством скрининга с использованием, например, аланин-сканирующего мутагенеза и т.п. (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-

118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; и Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085), линкер-сканирующего мутагенеза (Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); насыщающего мутагенеза (Meyers et al., (1986) Science 232:613); ПЦР-мутагенеза (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) или случайного мутагенеза, включая химический мутагенез, и т.д. (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; и Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). Линкер-сканирующий мутагенез, в частности, в комбинаторных условиях, является привлекательным способом идентификации укороченных (биоактивных) форм полипептидов ENG.

В этой области известен широкий диапазон способов скрининга продуктов генов комбинаторных библиотек, полученных с помощью точечных мутаций и укорочений, и, в связи с этим, скрининга библиотек кДНК на продукты генов, имеющие конкретное свойство. Такие способы, как правило, можно будет адаптировать для быстрого скрининга библиотек генов, полученных посредством комбинаторного мутагенеза полипептидов ENG. Наиболее широко используемые способы скрининга больших библиотек генов, как правило, включают клонирование библиотеки генов в реплицируемые экспрессирующие векторы, трансформации соответствующих клеток с получением библиотеки векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых определение желаемой активности способствует относительно легкому выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого определяли. Предпочтительные анализы включают анализы связывания лиганда ENG и анализы лиганд-опосредованной передачи сигнала в клетке.

В определенных вариантах осуществления полипептиды ENG по настоящему изобретению дополнительно могут содержать посттрансляционные модификации в дополнение к любым, от природы присутствующим в полипептидах ENG. Такие модификации включают, в

качестве неограничивающих примеров, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию, пегилирование (полиэтиленгликолем) и ацилирование. В результате модифицированные полипептиды ENG могут содержать неаминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахарид и фосфаты. Эффекты таких неаминокислотных элементов в отношении функциональности полипептида ENG можно тестировать, как представлено в настоящем описании, для других вариантов полипептида ENG. Когда полипептид ENG продуцируется в клетках посредством расщепления образующейся формы полипептида ENG, посттрансляционный процессинг также может быть важен для правильного фолдинга и/или функционирования белка. Различные клетки (такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) имеют конкретный клеточный аппарат и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей, и их можно выбирать для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов ENG.

В определенных аспектах функциональные варианты или модифицированные формы полипептидов ENG включают слитые белки, имеющие, по меньшей мере, часть полипептидов ENG и один или несколько слитых доменов. Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают, в качестве неограничивающих примеров, полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, протеин А, протеин G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), мальтозо-связывающий белок (MBP) или сывороточный альбумин человека. Слитый домен можно выбирать таким образом, чтобы он придавал желательную активность. Например, некоторые слитые домены особенно пригодны для выделения слитых белков посредством аффинной хроматографии. В целях аффинной очистки используют соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как глутатион-, амилаза- и никель- или кобальт-конъюгированные смолы. Многие из таких матриц доступны в форме "набора", такие как система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen), применимые с партнерами по слиянию с (HIS₆). В качестве другого примера, слитый домен можно выбирать таким образом, чтобы он облегчал определение полипептидов ENG. Примеры

таких доменов для определения включают различные флуоресцентные белки (например, GFP), а также "эпитопные метки", как правило, являющиеся короткими пептидными последовательностями, для которых доступно специфическое антитело. Хорошо известные эпитопные метки, для которых легкодоступны специфические моноклональные антитела, включают метки FLAG, гемагглютинаина вируса гриппа (HA) и с-тус. В некоторых случаях слитые домены имеют участок расщепления протеазой, такой как в случае фактора Ха или тромбина, позволяющей соответствующей протеазе частично расщеплять слитые белки и, таким образом, высвобождать из них рекомбинантные белки. Затем высвобожденные белки можно отделять от слитого домена с помощью последующего хроматографического расщепления. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления полипептид ENG подвергают слиянию с доменом, стабилизирующим полипептид ENG *in vivo* (домен-"стабилизатор"). Термин "стабилизирующий" означает что-либо, повышающее время полужизни в сыворотке, независимо от того, является ли это результатом снижения деструкции, снижения выведения почками или другого фармакокинетического эффекта. Известно, что слияние с Fc-частью иммуноглобулина придает желаемые фармакокинетические свойства широкому диапазону белков. Аналогично, слияние с сывороточным альбумином человека может придавать желаемые свойства. Другие типы слитых доменов, которые можно выбирать, включают домены мультимеризации (например, димеризации, тетрамеризации) и функциональные домены.

В качестве конкретных примеров, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим варианты полипептидов ENG, слитые с одной из двух последовательностей домена Fc (например, SEQ ID NO: 11, 12). Необязательно, домен Fc имеет одну или несколько мутаций в таких остатках, как Asp-265, Lys-322 и Asn-434 (пронумерованных согласно соответствующему полноразмерному IgG). В конкретных случаях мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asp-265), имеет сниженную способность к связыванию с рецептором Fcγ относительно домена Fc дикого типа. В других случаях мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asn-434), имеет

повышенную способность к связыванию с Fc-рецептором, связанным с MHC класса I, (FcRN) относительно домена Fc дикого типа.

Следует понимать, что различные элементы слитых белков можно располагать любым образом, соответствующим желаемой функциональности. Например, полипептид ENG можно помещать на C-конец гетерологичного домена, или, альтернативно, гетерологичный домен можно помещать на C-конец полипептида ENG. Домен полипептида ENG и гетерологичный домен могут не являться смежными в слитом белке, и на C- или N-конец домена или между доменами можно включать дополнительные домены или аминокислотные последовательности.

Как применяют в настоящем описании, термин "домен Fc иммуноглобулина" или просто "Fc" следует понимать как означающий карбокси-концевую часть константной области цепи иммуноглобулина, предпочтительно - константной области тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части. Например, Fc-область иммуноглобулинов может содержать 1) домен CH1, домен CH2 и домен CH3, 2) домен CH1 и домен CH2, 3) домен CH1 и домен CH3, 4) домен CH2 и домен CH3 или 5) комбинацию двух или более доменов и шарнирной области иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления Fc-область иммуноглобулина содержит, по меньшей мере, шарнирную область иммуноглобулина, домен CH2 и домен CH3, и, предпочтительно, в ней отсутствует домен CH1.

В одном из вариантов осуществления классом иммуноглобулина, из которого получают константную область тяжелой цепи, является IgG (Ig γ) (подклассы γ 1, 2, 3 или 4). Можно использовать другие классы иммуноглобулина, IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) и IgM (Ig μ). Выбор подходящей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина подробно описан в патентах США № 5541087 и 5726044. Считают, что выбор конкретных последовательностей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из конкретных классов и подклассов иммуноглобулинов для достижения конкретного результата находится в пределах знаний в этой области. Часть конструкции ДНК, кодирующей область Fc иммуноглобулина, предпочтительно, содержит, по меньшей мере, часть шарнирного

домена, и предпочтительно – по меньшей мере, часть домена CH₃ Fc гамма или гомологичных доменов в любом из IgA, IgD, IgE или IgM.

Кроме того, предполагают, что замена или делеция аминокислот в константных областях тяжелой цепи иммуноглобулина может быть применима в практическом осуществлении способов и композиций, представленных в настоящем описании. Одним из примеров будет встраивание замен аминокислот в верхнюю область CH₂ для получения варианта Fc со сниженной аффинностью к Fc-рецепторам (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным и/или очищенным формам полипептидов ENG, выделенным или иным образом, по существу, не содержащим (например, по меньшей мере на 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% не содержащим) другие белки и/или другие виды полипептидов ENG. Как правило, полипептиды ENG будут получать посредством экспрессии из рекомбинантных нуклеиновых кислот.

В определенных вариантах осуществления изобретение включает нуклеиновые кислоты, кодирующие растворимые полипептиды ENG, содержащие кодирующую последовательность для внеклеточной части белка ENG. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей такие нуклеиновые кислоты. Клетка-хозяин может являться любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, полипептид по настоящему изобретению можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусной системы экспрессии), дрожжах или клетках млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в этой области. Таким образом, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно относятся к способам получения полипептидов ENG. Установлено, что слитые белки ENG-Fc, приведенные в SEQ ID NO: 25 и 29 и экспрессируемые в клетках CHO, имеют мощную антиангиогенную активность.

5. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ENG

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим

любые из полипептидов ENG, включая фрагменты, функциональные варианты и слитые белки, представленные в настоящем описании. Например, SEQ ID NO: 2 и 4 кодируют длинную и короткую изоформы, соответственно, нативного полипептида-предшественника ENG человека, в то время как SEQ ID NO: 30 кодирует один вариант внеклеточного домена ENG, слитого с доменом Fc IgG1. Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут являться молекулами ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно использовать, например, в способах получения полипептидов ENG или непосредственно в качестве терапевтических средств (например, в подходах антисмысловой, РНКи- или генотерапии).

Следует понимать, что в определенных аспектах рассматриваемые нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ENG, дополнительно включают нуклеиновые кислоты, являющиеся вариантами SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30. Варианты нуклеотидных последовательностей включают последовательности, отличающиеся одной или несколькими заменами, вставками или делециями нуклеотидов, такие как аллельные варианты.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30. Специалисту в этой области будет понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарные SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, и варианты SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30 также входят в объем настоящего изобретения. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут являться выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью или находиться в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также включают нуклеотидные последовательности, в очень строгих условиях гибридизующиеся с нуклеотидными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, последовательностями, комплементарными SEQ ID NO:

24, 26, 28 или 30, или их фрагментами. Как указано выше, специалисту в этой области будет понятно, что можно варьировать соответствующую строгость условий, способствующих гибридизации ДНК. Например, можно осуществлять гибридизацию в 6,0-кратном хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующей промывкой 2,0-кратным SSC при 50°C. Например, концентрацию соли на этапе промывки можно выбирать из условий от низкой строгости при приблизительно 2,0-кратном SSC при 50°C до высокой строгости при приблизительно 0,2-кратном SSC при 50°C. Кроме того, температуру на этапе промывки можно повышать с условий с низкой строгостью при комнатной температуре приблизительно 22°C до условий с высокой строгостью при приблизительно 65°C. Можно варьировать температуру и концентрацию соли или можно поддерживать постоянную температуру или концентрацию соли, одновременно меняя другую переменную. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, гибридизующимся в условиях с низкой строгостью при 6-кратном SSC при комнатной температуре с последующей промывкой в 2-кратном SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, отличающиеся от нуклеиновых кислот, приведенных SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, по причине вырожденности генетического кода, также входят в объем настоящего изобретения. Например, ряд аминокислот обозначен несколькими триплетами. Кодоны, обозначающие одну и ту же аминокислоту, или синонимичные кодоны (например, CAU и CAC являются синонимичными кодонами для гистидина) могут приводить к "молчащим" мутациям, не влияющим на аминокислотную последовательность белка. Однако, ожидают, что в клетках млекопитающих будут существовать полиморфизмы последовательности ДНК, приводящие к изменениям в аминокислотных последовательностях рассматриваемых белков. Специалисту в этой области будет понятно, что эти изменения одного или нескольких нуклеотидов (до приблизительно 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать у индивидуумов указанных видов как результат

природных аллельных вариантов. Любое и все такие изменения нуклеотидов и образующиеся полиморфизмы аминокислот входят в объем настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессирующей конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, будут соответствовать клетке-хозяину, используемой для экспрессии. В этой области известно множество типов соответствующих экспрессирующих векторов и подходящих регуляторных последовательностей для различных клеток-хозяев. Как правило, указанные одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, в качестве неограничивающих примеров, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, участки связывания рибосомы, последовательности инициации и терминации транскрипции, последовательности инициации и терминации трансляции и последовательности энхансеров или активаторов. Конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в этой области, включены в настоящее изобретение. Промоторы могут являться природными промоторами или гибридными промоторами, в которых комбинируют элементы нескольких промоторов. Экспрессирующая конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такая как плаزمид, или экспрессирующую конструкцию можно встраивать в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор содержит ген селективного маркера, делающий возможной селекцию трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в этой области и будут варьироваться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В определенных аспектах настоящего изобретения рассматриваемую нуклеиновую кислоту предоставляют в экспрессирующем векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ENG, и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной

последовательностью. Регуляторные последовательности известны в этой области, и их выбирают для воздействия на экспрессию полипептида ENG. Таким образом, термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. Примеры регуляторных последовательностей описаны в Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептид ENG, можно использовать любую из широкого спектра последовательностей контроля экспрессии, контролирующей экспрессию последовательности ДНК при функциональной связи с ней. Такие применимые последовательности контроля экспрессии, включают, например, ранние и поздние промоторы SV40, промотор tet, предранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессия которого регулируется РНК-полимеразой T7, основные области оператора и промотора фага лямбда, контрольные области белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5, промоторы факторов α -скреивания дрожжей, полигедроновый промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, о которых известно, что они контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и различные их комбинации. Следует понимать, что дизайн экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и/или типа белка, экспрессия которого является желательной. Кроме того, также необходимо принимать во внимание копийность вектора, способность контролировать эту копийность и экспрессию любого другого белка, кодируемого вектором.

Рекомбинантную нуклеиновую кислоту, включенную в настоящее изобретение, можно получать посредством лигирования клонированного гена или его части, в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих) или и тех, и других. Средства

экспрессии для получения рекомбинантного полипептида ENG включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: плазмиды, полученные из pBR322, плазмиды, полученные из pEMBL, плазмиды, полученные из pEX, плазмиды, полученные из pBTac, и плазмиды, полученные из pUC, для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые векторы для экспрессии в клетках млекопитающих содержат прокариотические последовательности для облегчения размножения вектора в бактериях и одну или несколько эукариотических единиц транскрипции, экспрессирующихся в эукариотических клетках. Векторы, полученные из pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2 gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHyg, являются примерами векторов для экспрессии в клетках млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицируют с использованием последовательностей из бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и селекции по резистентности к лекарственному средству в прокариотических и эукариотических клетках. Альтернативно, для транзиторной экспрессии белков в эукариотических клетках можно использовать производные вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барр (pHEBo, производное pREP и p205). Примеры других вирусных (включая ретровирусных) систем экспрессии можно найти ниже в описании систем доставки для генотерапии. В этой области хорошо известны различные способы, используемые в получении плазмид и трансформации организмов-хозяев. Другие подходящие системы экспрессии для прокариотических и эукариотических клеток, а также общие рекомбинантные способы см. в *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях, желательной может являться экспрессия рекомбинантных полипептидов с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Примеры таких бакуловирусных систем экспрессии включают векторы, полученные из pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы, полученные из pAcUW (такие как pAcUW1), и

векторы, полученные из pBlueBac (такие как β -gal-содержащие pBlueBac III).

В предпочтительном варианте осуществления для получения рассматриваемых полипептидов ENG в клетках CHO будут конструировать вектор, такой как вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Как будет очевидно, рассматриваемые генные конструкции можно использовать, чтобы вызывать экспрессию рассматриваемых полипептидов ENG в клетках, выращиваемых в культуре, например, для получения белков, включающих слитые белки или варианты белков, для очистки.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, трансфицированной с использованием рекомбинантного гена, включающего кодирующую последовательность (например, SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30) для одного или нескольких рассматриваемых полипептидов ENG. Клетка-хозяин может являться любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, полипептид ENG, представленный в настоящем описании, можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусной системы экспрессии), дрожжах или клетках млекопитающих. Специалистам в этой области известны другие подходящие клетки-хозяева.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения рассматриваемых полипептидов ENG. Например, клетку-хозяина, трансфицированную с использованием экспрессирующего вектора, кодирующего полипептид ENG, можно культивировать в подходящих условиях, чтобы сделать возможной экспрессию полипептида ENG. Полипептид ENG может секретироваться, и его можно выделять из смеси клеток и среды, содержащей полипептид ENG. Альтернативно, полипептид ENG может оставаться в цитоплазме или мембранной фракции, и клетки собирают, лизируют и выделяют белок. Культура клеток включает клетки-хозяева, среды и другие побочные продукты. Подходящие среды для культивирования клеток хорошо известны в этой области. Рассматриваемые полипептиды ENG можно выделять из среды для культивирования клеток, клеток-

хозяев или и того, и другого известными в этой области способами очистки белков, включая ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с использованием антител, специфичных для конкретных эпитопов полипептидов ENG, и аффинную очистку с использованием средства, связывающегося с доменом, слитым с полипептидом ENG (например, для очистки слитого белка ENG-Fc можно использовать колонку с протеином А). В предпочтительном варианте осуществления полипептид ENG является слитым белком, содержащим домен, облегчающий его очистку. Например, очистку можно осуществлять посредством серии этапов хроматографии на колонках, включая, например, три или более из следующего, в любом порядке: хроматографию с протеином А, хроматографию с Q-сефарозой, хроматографию с фенилсефарозой, эксклюзионную хроматографию и катионообменную хроматографию. Очистку можно завершать вирусной фильтрацией и заменой буфера.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, такую как поли-(His)/последовательность участка расщепления энтерокиназой на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида ENG, может делать возможной очистку экспрессируемого слитого белка посредством аффинной хроматографии с использованием Ni^{2+} -смолы. Затем лидерную последовательность для очистки можно удалять посредством обработки энтерокиназой для получения очищенного полипептида ENG (например, см. Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Способы получения слитых генов хорошо известны. По существу, соединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные последовательности полипептида, осуществляют общепринятыми способами с использованием тупых концов или ступенчатых разрывов для лигирования, расщепления рестрикционными ферментами для получения соответствующих концов, заполнения липких концов при необходимости, обработки щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативного лигирования. В другом варианте осуществления слитый ген можно синтезировать

общепринятыми способами, включая использование автоматизированных ДНК-синтезаторов. Альтернативно, можно осуществлять ПЦР-амплификацию фрагментов гена с использованием якорных праймеров, при этом между двумя последовательными фрагментами генов образуются комплементарные липкие концы, которые затем можно отжигать для получения последовательности химерного гена (см., например, *Current Protocols in Molecular biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

Примеры категорий соединений нуклеиновых кислот, являющихся антагонистами ENG, BMP-9 или BMP-10, включают антисмысловые нуклеиновые кислоты, конструкции РНКи и каталитические конструкции нуклеиновых кислот. Соединение нуклеиновой кислоты может являться одно- или двухцепочечным. Двухцепочечное соединение также может включать области липких концов или некомплементарности, где одна или другая цепь является одноцепочечной. Одноцепочечное соединение может включать области самокомплементарности, что означает, что соединение образует, так называемую, "шпильку" или структуру "стебель-петля", с областью с двухцепочечной структурой. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную области, состоящей из не более 1000, не более 500, не более 250, не более 100 или не более 50, 35, 30, 25, 22, 20 или 18 нуклеотидов полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты ENG или последовательность нуклеиновой кислоты лиганда. Предпочтительно, область комплементарности будет составлять по меньшей мере 8 нуклеотидов, и необязательно, по меньшей мере 10 или по меньшей мере, 15 нуклеотидов, и необязательно от 15 до 25 нуклеотидов. Область комплементарности может приходиться на интрон, кодирующую последовательность или не кодирующую последовательность целевого транскрипта, такого как часть кодирующей последовательности. Как правило, соединение нуклеиновой кислоты будет иметь длину от приблизительно 8 до приблизительно 500 нуклеотидов или пар оснований в длину, и, необязательно, длина будет составлять от приблизительно 14 до приблизительно 50 нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может являться ДНК (в частности для применения в качестве

антисмысловой), РНК или гибридом РНК:ДНК. Любая цепь может включать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые нелегко классифицировать как ДНК или РНК. Аналогично, двухцепочечное соединение может являться ДНК:ДНК, ДНК:РНК или РНК:РНК, и любая цепь также может включать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые нелегко классифицировать как ДНК или РНК. Соединение нуклеиновой кислоты может включать любую из множества модификаций, включая одну или несколько модификаций остова (сахар-фосфатной части природной нуклеиновой кислоты, включающей межнуклеотидные связи) или части оснований (пуриновой или пиримидиновой части природной нуклеиновой кислоты). Соединение антисмысловой нуклеиновой кислоты, предпочтительно, будет иметь длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов и, зачастую, будет содержать одну или несколько модификаций для улучшения характеристик, таких как стабильность в сыворотке, в клетке или в месте, в которое соединение, вероятно, будут доставлять, таком как желудок в случае перорально доставляемых соединений и легкое для ингаляционных соединений. В случае конструкции РНКи, цепь, комплементарная целевому транскрипту, как правило, будет являться РНК или ее модификацией. Другая цепь может являться РНК, ДНК или любым другим вариантом. Дуплексная часть двухцепочечной или одноцепочечной "шпильки" конструкции РНКи, предпочтительно, будет иметь длину от 18 до 40 нуклеотидов и, необязательно, от приблизительно 21 до 23 нуклеотидов, при условии, что она служит субстратом для Dicer. Каталитические или ферментативные нуклеиновые кислоты могут являться рибозимами или ДНК-ферментами, а также могут содержать модифицированные формы. Соединения нуклеиновых кислот могут ингибировать экспрессию мишени приблизительно на 50%, 75%, 90% или более при контакте с клетками в физиологических условиях и в концентрации, когда нонсенс- или смысловой контроль имеет небольшой эффект или не имеет эффекта. Предпочтительными концентрациями для тестирования эффекта соединений нуклеиновых кислот являются 1, 5 и 10 микромоль. Соединения нуклеиновых кислот также можно тестировать на эффекты, например, в отношении ангиогенеза.

6. Изменения Fc-слитых белков

Изобретение дополнительно относится к слитым белкам ENG-Fc со сконструированными Fc-областями или вариантами Fc-областей. Такие антитела и Fc-слитые белки могут быть применимы, например, в модуляции эффекторных функций, таких как антиген-зависимая цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Кроме того, модификации могут улучшать стабильность антител и слитых белков Fc. Варианты аминокислотной последовательности антител и слитых белков Fc получают посредством включения соответствующих изменений нуклеотидов в ДНК или посредством пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител и Fc-слитых белков, представленных в настоящем описании. Любую комбинацию делеции, инсерции и замены осуществляют на конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционный процессинг антител и Fc-слитых белков, такие как изменения количества или положения участков гликозилирования.

Можно получать антитела и Fc-слитые белки со сниженной эффекторной функцией, включая изменения в аминокислотную последовательность, включая, в качестве неограничивающих примеров, мутацию Ala-Ala, описываемую Bluestone et al. (см. WO 94/28027 и WO 98/47531; также см. Xu et al. 2000 Cell Immunol 200; 16-26). Таким образом, в определенных вариантах осуществления для снижения или устранения эффекторной функции можно использовать антитела и Fc-слитые белки по настоящему изобретению с мутациями в константной области, включая мутацию Ala-Ala. По этим вариантам осуществления антитела и Fc-слитые белки могут содержать мутацию в аланин в положении 234, или мутацию в аланин в положении 235, или их комбинацию. В одном из вариантов осуществления антитело или Fc-слитый белок содержит каркас IgG4, где мутация Ala-Ala будет означать мутации из фенилаланина в аланин в положении 234 и/или мутацию из лейцина в аланин в положении 235. В другом варианте осуществления антитело или Fc-слитый белок содержит каркас IgG1,

где мутация Ala-Ala будет означать мутации из лейцина в аланин в положении 234 и/или мутацию из лейцина в аланин в положении 235. Антитело или Fc-слитый белок альтернативно или дополнительно могут нести другие мутации, включая точечную мутацию K322A в домене CH2 (Hezareh et al. 2001 J Virol. 75: 12161-8).

В конкретных вариантах осуществления антитело или Fc-слитый белок можно модифицировать для повышения или ингибирования обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC). Модулированной активности CDC можно достигать посредством включения одной или нескольких замен, инсерций или делеций аминокислот в Fc-область (см., например, патент США № 6194551). Альтернативно или дополнительно, в Fc-область можно встраивать остатки цистеина, таким образом, делая возможным образование междоцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную или сниженную способность к интернализации и/или повышенное или сниженное обусловленное комплементом уничтожение клеток. См. Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) и Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992), WO99/51642, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO94/29351.

ПРИМЕРЫ

В целом, описанное изобретение будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, включенные исключительно в целях иллюстрирования конкретных вариантов осуществления и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначенные для ограничения изобретения.

Пример 1: Экспрессия слитого белка, содержащего полноразмерный внеклеточный домен ENG человека

Авторы настоящего изобретения конструировали растворимый слитый белок эндоглина (ENG) (hENG(26-586)-hFc), в котором полноразмерный внеклеточный домен (ECD) ENG человека (фигура 9, SEQ ID NO: 9) присоединяли к домену Fc IgG1 человека (фигура 11, SEQ ID NO: 11) с минимальным линкером между этими доменами. hENG(26-586)-hFc экспрессировали посредством транзитной

трансфекции в клетках НЕК 293. В кратком изложении, клетки НЕК 293 подготавливали в спиннере емкостью 500-мл при 6×10^5 клеток/мл в средах FreeStyle (Invitrogen) объемом 250 мл и выращивали в течение ночи. На следующий день эти клетки обрабатывали комплексом ДНК:PEI (1:1) при 0,5 мкг/мл конечной концентрации ДНК. Через 4 часа добавляли 250 мл среды и выращивали клетки в течение 7 дней. Кондиционированные среды собирали посредством центрифугирования клеток и концентрировали. Для экспрессии в клетках CHO конструкции полипептида ENG трансфицировали в линию клеток CHO DUKX B11. Клоны подвергали селекции метотрексатом (MTX), как правило, при начальной концентрации 5 нМ или 10 нМ, и, необязательно, с последующей амплификацией в 50 нМ MTX для повышения экспрессии. Высокоэкспрессирующийся клон можно идентифицировать посредством клонирования способом разведений и адаптировать для выращивания в бессывороточной суспензии для получения кондиционированных сред для очистки. Необязательно, в вектор можно включать универсальный хроматинраскрывающий элемент (UCOE) для облегчения экспрессии. См., например, Cytotechnology. 2002 Jan;38(1-3):43-6.

Можно использовать три разные лидерные последовательности:

(i) Меллитина пчелы медоносной (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 13)

(ii) Тканевого активатора плазминогена (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 14)

(iii) Нативного ENG человека: MDRGTLPLAVALLLASCSLSPTSLA (SEQ ID NO: 15)

В выбранной форме hENG(26-586)-hFc используют лидерную последовательность TPA, она имеет непротессированную аминокислотную последовательность, представленную на **фигуре 13** (SEQ ID NO: 16), и кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на **фигуре 14** (SEQ ID NO: 17). Авторы настоящего изобретения также предусмотрели альтернативную последовательность hENG(26-586)-hFc с лидерной последовательностью TPA (**фигура 15**, SEQ ID NO: 18), содержащей укороченный с N-конца домен hFc (**фигура 12**, SEQ ID NO: 12), присоединенный к hENG(26-586) через линкер TGGG. Очистку осуществляли различными способами, включая,

например, фильтрацию кондиционированных сред с последующей хроматографией с протеином А, элюированием с глициновым буфером с низким рН (3,0), нейтрализацией образца и диализом против PBS. Чистоту образцов оценивали посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, окрашивания серебром и вестерн-блоттинга. С помощью анализа зрелого белка подтверждали ожидаемую N-концевую последовательность.

Пример 2: Экспрессия слитого белка, содержащего полноразмерный внеклеточный домен ENG мыши

Авторы настоящего изобретения конструировали растворимый слитый белок ENG мыши (mENG(27-581)-mFc), в котором полноразмерный внеклеточный домен ENG мыши (**фигура 10**, SEQ ID NO: 10) подвергали слиянию с доменом Fc IgG_{2a} мыши с минимальными линкерами между этими доменами. mENG(27-581)-mFc экспрессировали посредством транзиторной трансфекции в клетки HEK 293.

В выбранной форме mENG(27-581)-mFc использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непротессированную аминокислотную последовательность, представленную на **фигуре 16** (SEQ ID NO: 19) и кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на **фигуре 17** (SEQ ID NO: 20). Очистку осуществляли посредством фильтрации кондиционированных сред из трансфицированных клеток HEK 293 с последующей хроматографией с протеином А. Чистоту образцов оценивали посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, окрашивания серебром и анализа вестерн-блоттинга.

Пример 3: Селективное связывание BMP-9/BMP-10 с белками, содержащими полноразмерный внеклеточный домен ENG

Считают, что рассматриваемый в качестве корцептора ENG функционирует, облегчая связывание TGF- β 1 и -3 с мультибелковыми комплексами рецепторов типа I и типа II. Для исследования возможности прямого связывания лиганда выделенным ENG авторы настоящего изобретения использовали методологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (инструмент Biacore™) для скрининга на связывание иммобилизованных белков, содержащих полноразмерный внеклеточный домен ENG, с различными растворимыми лигандами

семейства TGF- β человека.

Лиганд	Связывание конструкции		
	hENG (26-586)-hFc*	hENG (26-586)**	mENG (27-581)-hFc***
hBMP-2	-	-	-
hBMP-2/7	-	-	-
hBMP-7	-	-	-
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF- β 1	-	-	-
hTGF- β 2	-	-	-
hTGF- β 3	-	-	-
hАктивин А	-	-	-

* [hBMP-9], [hBMP-10]=2,5 нМ; все другие лиганды тестировали при 100 нМ

** [hBMP-9], [hBMP-10]=2,5 нМ; все другие лиганды тестировали при 25 нМ

*** [hBMP-9], [hBMP-10]=0,5 нМ; [hTGF- β 1], [hTGF- β 2], [hTGF- β 3]=10 нМ; все другие лиганды тестировали при 25 нМ

Как показано в этой таблице, аффинность связывания с hENG(26-586)-hFc являлась высокой (++++, $K_D < 1$ нМ) для hBMP-9 и hBMP-10, как оценивали при низких концентрациях лиганда. Даже при концентрации в 40 раз выше связывание TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активина А, BMP-2 и BMP-7 с hENG(26-586)-hFc являлось неопределимым (-). В случае этой последней группы лигандов примечательно отсутствие прямого связывания с выделенным слитым белком ENG, т.к. показано, что мультибелковые комплексы рецепторов типа I и типа II лучше связываются с большинством из них в присутствии ENG, чем в его отсутствие. Как дополнительно показано в таблице выше, аналогичные результаты получали при скрининге лигандов на их способность связываться с иммобилизованным hENG(26-586) (R&D Systems, кат. №1097-EN), вариантом человека без домена Fc, или их способность связываться с иммобилизованным mENG(27-581)-hFc (R&D Systems, кат.

№1320-EN), состоящим из внеклеточного домена ENG мыши (остатки 27-581), присоединенного к домену Fc IgG₁ человека через последовательность линкера из шести остатков (IEGRMD). Определение характеристик с помощью SPR (**фигуры 18, 19**) показало, что иммобилизованный hENG(26-586)-hFc связывается с растворимым BMP-9 с K_D 29 пМ, а растворимый BMP-10 - с K_D 400 пМ. Таким образом, селективное высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 является ранее неизвестным свойством внеклеточного домена ENG, являющимся общим для различных видов.

Пример 4: Растворимый внеклеточный домен hENG ингибирует связывание BMP-9/BMP-10 с ALK1 и другими родственными рецепторами

BMP-9 и BMP-10 являются высокоаффинными лигандами для рецептора ALK1 типа I (киназы, подобной рецептору активина 1). Для определения эффекта растворимого hENG(26-586) (R&D Systems, кат. №1097-EN) в отношении связывания BMP-9 и BMP-10 с ALK1 использовали анализ на основе SPR. ALK1-hFc иммобилизовали, а затем подвергали воздействию растворов, содержащих растворимый hENG(26-586), предварительно смешанный с BMP-9 в различных соотношениях. Как показано на **фигуре 20**, растворимый hENG(26-586) ингибировал связывание BMP-9 с ALK1-Fc в зависимости от концентрации с IC_{50} менее 10 нМ. Аналогичные результаты получали с использованием BMP-10 (**фигура 21**). Различные эксперименты показали, что растворимый hENG(26-586) не связывает ALK1 и, таким образом, не ингибирует связывание лиганда с ALK1 с помощью этого механизма. Фактически, дополнительные эксперименты на основе SPR показали, что растворимый hENG(26-586) не связывается ни с рецепторами ALK2-ALK7 типа I, ни с рецепторами типа II, такими как рецептор активина IIA, рецептор активина IIB, рецептор морфогенетического белка кости II и рецептор TGF- β II. Эти результаты представляют собой дополнительное доказательство того, что ENG ингибирует связывание BMP-9 и BMP-10 с ALK1, главным образом, посредством прямого взаимодействия с этими лигандами.

В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что растворимые химерные белки ENG-Fc, а также нехимерный растворимый ENG можно использовать в качестве антагонистов передачи сигнала

BMP-9 и BMP-10 через множество путей передачи сигнала, включая ALK1.

Пример 5: Эффект mENG(27-581)-hFc в отношении эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) в культуре

Авторы настоящего изобретения исследовали ангиогенный эффект mENG(27-581)-hFc в системе культивирования на основе HUVES. HUVES культивировали на полимеризованном субстрате Matrigel, и эффект тестируемых образцов в отношении образования трубок из эндотелиальных клеток (тяжей) оценивали посредством фазово-контрастной микроскопии через 12 часов воздействия. Тяжи, имеющие ширину в одну клетку и по меньшей мере три ветви, идентифицировали визуально и использовали компьютеризированный анализ изображений для определения общей длины таких тяжей. Средние значения основаны на двух параллельных лунках планшета для культивирования на условие эксперимента, при этом каждую лунку охарактеризовывали как среднее для трех полей наблюдения. По сравнению с базовыми условиями (без обработки) сильный индуктор, стимулятор роста эндотелиальных клеток (ECGS, 0,2 мкг/мл), приводил к удвоению средней длины тяжа (**фигура 22**). mENG(27-581)-hFc (R&D Systems, кат. №1320-EN; 10 мкг/мл) снижал это повышение приблизительно на 60%, эффект, специфичный для условий стимуляции, т.к. одна и та же концентрация mENG(27-581)-hFc имела небольшой эффект в отсутствие ECGS (**фигура 22**). Эти результаты свидетельствуют о том, что слитый белок ENG-Fc может ингибировать агрегацию эндотелиальных клеток в условиях иной стимуляции в модели ангиогенеза в культуре клеток.

Пример 6: ENG-Fc ингибирует индуцируемый VEGF ангиогенез в анализе хориоаллантаиновой мембраны куриного яйца (CAM)

Систему анализа хориоаллантаиновой мембраны куриного яйца (CAM) использовали для исследования эффектов слитого белка ENG-Fc в отношении ангиогенеза. В кратком изложении, оплодотворенные эмбрионы курицы возрастом девять дней держали в инкубаторе для яиц при контролируемой температуре (37°C) и влажности (60%). Скорлупу яйца размягчали спиртом, делали небольшое отверстие для создания "пузыря" между мембраной скорлупы и CAM и удаляли для создания окна, располагающегося над видимыми кровеносными сосудами.

Небольшие фильтровальные диски обрабатывали VEGF (50 нг ежедневно) в присутствии или отсутствии белка mENG(27-581)-hFc (R&D Systems, кат. №1320-EN; 14 мкг ежедневно), растворенного в буфере (pH 7,4) содержащем 0,01 М HEPES, 0,5 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. поверхностно-активного вещества P20 и 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Затем фильтровальные диски, содержащие тестируемый образец, вставляли в отверстие и соединяли с CAM. Яйца (n=8 на группу) обрабатывали свежим тестируемым образцом ежедневно в течение трех дней и на четвертый день визуально определяли количество кровеносных сосудов, связанных с фильтровальным диском, с использованием лампы для яиц.

Как и ожидали, обработка VEGF в анализе CAM значительно повышала количество кровеносных сосудов по сравнению с наполнителем. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых с помощью обработки VEGF, снижалось на 65% при конкурентной обработке mENG(27-581)-hFc (**фигура 23**). Исследования с использованием SPR показали, что VEGF не связывается с mENG(27-581)-mFc, и, таким образом, эффекты mENG(27-581)-hFc в отношении ангиогенеза в настоящем эксперименте с CAM не являлись результатом прямого взаимодействия между слитым белком и VEGF. Изложенные выше результаты свидетельствуют о том, что ENG-Fc может значительно ингибировать хорошо известный ангиогенный эффект VEGF в модели *in vivo* без контакта с самим VEGF.

Пример 7: Эффект mENG(27-581)-mFc в отношении ангиогенеза в анализе ангиореактора мыши

Эффекты слитого белка ENG-Fc в отношении ангиогенеза дополнительно исследовали в анализе ангиореактора мыши, также известного как прямой анализ ангиогенеза *in vivo* (DIVAA™; Guedez et al., 2003, Am J Pathol 162:1431-1439), который осуществляли по инструкциям производителя (Trevigen®). В кратком изложении, полые цилиндры, полученные из силикона, подходящего для имплантации, и закрытые с одного конца, наполняли 20 мкл экстракта базальной мембраны (BME), предварительного смешанного с комбинацией основного фактора роста фибробластов (FGF-2, 1,8 г) и VEGF (600 нг) или без нее. После желирования BME ангиореакторы подкожно

имплантировали бестимусным мышам (четыре на мышь). Мышам ежедневно вводили mENG(27-581)-mFc (10 мг/кг, s.c.) или наполнитель (Tris-забуференный физиологический раствор) в течение 11 дней, после чего мышам инъецировали декстран, меченый флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), (20 мг/кг, i.v.) и умерщвляли их через 20 мин. Удаляли ангиореакторы и количественно анализировали количество FITC-декстрана, содержащегося в каждом из них, с помощью флуоресцентного спектрофотометра для чтения планшетов (Infinite® M200, Tecan) при возбуждении 485 нм/эмиссии 520 нм в качестве индекса образования кровеносных сосудов. Как показано на **фигуре 24**, добавление FGF-2 и VEGF к ВМЕ приводило к значительному повышению васкуляризации в ангиореакторах по завершении исследования, в то время как конкурентное введение mENG(27-581)-mFc полностью предотвращало это повышение. Эти результаты, полученные в системе млекопитающего, дополняют результаты, полученные с использованием описываемого выше анализа CAM, и демонстрируют антиангиогенную активность слитых белков ENG-Fc, включающих полноразмерный внеклеточный домен ENG, *in vivo*.

Пример 8: Экспрессия вариантов с укороченным внеклеточным доменом hENG

Авторы настоящего изобретения получали растворимые слитые белки ENG, в которых укороченные варианты ECD ENG человека подвергали слиянию с доменом Fc IgG1 человека с минимальным линкером. Эти варианты приведены ниже, и структуры выбранных вариантов схематически представлены на **фигуре 25**.

	Конструкция человека	Транзиторная экспрессия	Очищенный	Стабильная Экспрессия (клетки CHO)
Полноразмерный	hENG (26-586) -hFc	HEK 293	Да	Да
Карбокси- концевые укорочения	hENG (26-581) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (26-437) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (26-378) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (26-359) -hFc	HEK 293	Да	Да
	hENG (26-346) -hFc	HEK 293	Да	Да
	hENG (26-332) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (26-329) -hFc	HEK 293	Да	Нет
Амино-концевые укорочения	hENG (26-257) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (360-586) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (438-586) -hFc	HEK 293	Да	Нет
Двойные укорочения	hENG (458-586) -hFc	COS	Нет	Нет
	hENG (61-346) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (129-346) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (133-346) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (166-346) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (258-346) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (360-581) -hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG (360-457) -hFc	COS	Нет	Нет
	hENG (360-437) -hFc	COS	Нет	Нет
	hENG (458-581) -hFc	COS	Нет	Нет

Эти варианты экспрессировали посредством транзиторной трансфекции в клетках HEK 293 или клетках COS, как указано.

В выбранной форме hENG(26-437)-hFc использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непротессированную аминокислотную последовательность, представленную на **фигуре 26** (SEQ ID NO: 21), и кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на **фигуре 27** (SEQ ID NO: 22). В выбранной форме hENG(26-378)-hFc также использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непротессированную аминокислотную последовательность, представленную на **фигуре 28** (SEQ ID NO: 23), кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на **фигуре 29** (SEQ ID NO: 24). В выбранной форме hENG(26-359)-hFc также использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непротессированную аминокислотную последовательность, представленную на **фигуре 30** (SEQ ID NO: 25), кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на **фигуре 31** (SEQ ID NO: 26). Авторы настоящего изобретения также предусмотрели альтернативную последовательность hENG(26-359)-hFc с лидерной последовательностью TPA (**фигура 32**, SEQ ID NO: 27), содержащую укороченный с N-конца домен hFc (**фигура 12**, SEQ ID NO: 12), присоединенный к hENG(26-359) с помощью линкера TGGG. Нуклеотидная последовательность, кодирующая этот альтернативный белок hENG(26-359)-hFc, представлена на **фигуре 33** (SEQ ID NO: 28). В выбранной форме hENG(26-346)-hFc использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непротессированную аминокислотную последовательность, представленную на **фигуре 34** (SEQ ID NO: 29) содержащую укороченный с N-конца домен hFc, кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на **фигуре 35** (SEQ ID NO: 30).

Выбранные варианты hENG-hFc, каждый с укороченным с N-конца доменом Fc (SEQ ID NO: 12), стабильно экспрессировали в клетках CHO (описанными выше способами) и очищали от кондиционированных сред посредством фильтрации и хроматографии с протеином А. С помощью анализа зрелого белка, экспрессируемого в клетках CHO, подтверждали ожидаемую N-концевую последовательность hENG(26-359)-

hFc и hENG(26-346)-hFc. Учитывая выход белка (нескорректированный по различиям в теоретической молекулярной массе), hENG(26-346)-hFc (90 мг/л) превосходил hENG(26-359)-hFc (9 мг/л) и полноразмерный hENG(26-586)-hFc (31 мг/л). Как показано на **фигуре 36**, при анализе этих очищенных образцов посредством эксклюзионной хроматографии определяли качество белка hENG(26-346)-hFc (на 96% мономерного) как превосходящее качество белка hENG(26-359)-hFc (на 84% мономерного) и эквивалентное качеству белка hENG(26-586)-hFc (на 96% мономерного). Таким образом, в случае более высоких уровней высокомолекулярных агрегатов необходимо использование дополнительных этапов очистки для hENG(26-359)-hFc по сравнению с hENG(26-346)-hFc.

Пример 9: Высокоаффинное связывание BMP-9/BMP-10 с укороченными вариантами hENG-hFc

Авторы настоящего изобретения использовали способ SPR для скрининга следующих вариантов белка hENG-hFc на высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 человека. В этих экспериментах, иммобилизованные белки hENG-hFc подвергали воздействию растворимого BMP-9 или BMP-10 по 100 нМ каждого.

	Конструкция человека	Связывание с hBMP-9 и hBMP-10
Полноразмерный	hENG(26-586)-hFc	++++
Карбокси-концевые укорочения	hENG(26-581)-hFc	++++
	hENG(26-437)-hFc	++++
	hENG(26-378)-hFc	++++
	hENG(26-359)-hFc	++++
	hENG(26-346)-hFc	++++
	hENG(26-332)-hFc	-
	hENG(26-329)-hFc	-
	hENG(26-257)-hFc	-
Амино-концевые укорочения	hENG(360-586)-hFc	-
	hENG(438-586)-hFc	-
	hENG(458-586)-hFc	-

Двойные укорочения	hENG (61-346) -hFc	-
	hENG (129-346) -hFc	-
	hENG (133-346) -hFc	-
	hENG (166-346) -hFc	-
	hENG (258-346) -hFc	-
	hENG (360-581) -hFc	-
	hENG (360-457) -hFc	-
	hENG (360-437) -hFc	-
	hENG (458-581) -hFc	-

++++ KD<1 нМ

- Связывание неопределимо

Как указано выше в таблице, высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 наблюдали только для полноразмерной конструкции и для таких укороченных с С-конца вариантов, как hENG (26-346)-hFc. Высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 было утрачено для всех протестированных N-концевых укорочений более чем на 61 аминокислот.

Панель лигандов подвергали скринингу на потенциальное связывание с укороченными с С-конца вариантами hENG (26-346)-hFc, hENG (26-359)-hFc и hENG (26-437)-hFc. Высокоаффинное связывание этих трех белков являлось селективным для BMP-9 и BMP-10. Ни hENG (26-346)-hFc, ни hENG (26-359)-hFc, ни hENG (26-437)-hFc не проявляли детектируемое связывание с BMP-2, BMP-7, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 или активинном А даже при высоких концентрациях лиганда.

Лиганд	Связывание конструкции		
	hENG (26-346) - hFc*	hENG (26-359) - hFc**	hENG (26-437) - hFc**
hBMP-2	-	-	-
hBMP-2/7	-	-	-
hBMP-7	-	-	-
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF- β 1	-	-	-

hTGF- β 2	-	-	-
hTGF- β 3	-	-	-
hАктивин А	-	-	-

* [hBMP-9], [hBMP-10]=5 нМ; [hTGF- β 3]=50 нМ; все другие лиганды тестировали при 100 нМ

** [hBMP-9], [hBMP-10]=5 нМ; [hTGF- β 3]=50 нМ; все другие лиганды тестировали при 100 нМ

++++ KD<1 нМ

- Связывание неопределимо

Авторы настоящего изобретения использовали способ SPR для сравнения кинетики связывания BMP-9 с пятью конструкциями: hENG(26-586)-hFc, hENG(26-437)-hFc, hENG(26-378)-hFc, hENG(26-359)-hFc и hENG(26-346)-hFc. На **фигуре 37** показаны кривые связывания для нескольких конструкций, и в таблице ниже приведены вычисленные значения равновесной константы диссоциации и констант скорости диссоциации (k_d). Аффинность BMP-9 человека к hENG(26-359)-hFc или hENG(26-346)-hFc (с K_D в нижнем пиколярном диапазоне) была на порядок выше, чем в случае полноразмерной конструкции. Для ловушек лигандов, таких как ENG-Fc, крайне желательно проявлять относительно низкую скорость диссоциации лиганда, поэтому десятикратное улучшение (снижение) скорости диссоциации BMP-9 в случае hENG(26-346)-hFc по сравнению с полноразмерной конструкцией является особенно примечательным.

Лиганд	Конструкция	K_D ($\times 10^{-12}$ М)	k_d ($\times 10^{-4}$ с $^{-1}$)
hBMP-9	hENG(26-586)-hFc*	33	25
	hENG(26-437)-hFc**	19	14
	hENG(26-378)-hFc**	6,7	3,4
	hENG(26-359)-hFc*	4,2	3,5
	hENG(26-346)-hFc*	4,3	2,4

* белок, полученный из клеток CHO

** белок, полученный из клеток HEK293

Как показано ниже, каждый из укороченных вариантов также связывался с BMP-10 с более высокой аффинностью и с лучшей

кинетикой по сравнению с полноразмерной конструкцией. Тем не менее, укороченные варианты отличались по их степени предпочтительности для BMP-9 по сравнению с BMP-10 (с учетом соотношения K_D), при этом hENG(26-346)-hFc демонстрировал наибольший дифференциал, а hENG(26-437)-hFc – наименьший. Это различие в степени предпочтительности лиганда среди укороченных вариантов потенциально может отражаться в значимых различиях их активности *in vivo*.

Лиганд	Конструкция	K_D ($\times 10^{-12}$ М)	k_d ($\times 10^{-4}$ с $^{-1}$)
hBMP-10	hENG(26-586)-hFc*	490	110
	hENG(26-437)-hFc**	130	28
	hENG(26-378)-hFc**	95	19
	hENG(26-359)-hFc*	86	23
	hENG(26-346)-hFc*	140	28

* белок, полученный из клеток CHO

** белок, полученный из клеток HEK293

Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что слитые белки, содержащие конкретные укороченные с С-конца варианты ECD hENG, демонстрируют высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10, но не с различными другими лигандами семейства TGF- β , включая TGF- β 1 и TGF- β 3. В частности, укороченные варианты hENG(26-359)-hFc, hENG(26-346)-hFc и hENG(26-378)-hFc демонстрируют более высокую аффинность связывания при равновесии и улучшенные кинетические свойства в случае BMP-9 по сравнению с полноразмерной конструкцией hENG(26-586)-hFc и укороченным вариантом hENG(26-437)-hFc.

Пример 10: Прогнозирование вторичной структуры N-концевой области ENG

Как описано выше, обнаруживали, что N-концевые укорочения, такие короткие, как 36 аминокислоты (hENG(61-346)-hFc), устраняют связывание лиганда с полипептидами ENG. Для прогнозирования эффекта даже более коротких N-концевых укорочений в отношении связывания лиганда вторичную структуру орфанного домена эндоглина человека предсказывали путем вычислений с использованием

модифицированного Psipred версии 3 (Jones, 1999, J Mol Biol 292:195-202). Анализ показал, что упорядоченная вторичная структура в области полипептида ENG, определяемая аминокислотами 26-60 SEQ ID NO: 1, ограничена бета-тяжем из четырех остатков, предсказанным с высокой достоверностью в положениях 42-45 SEQ ID NO: 1, и бета-тяжем из двух остатков, предсказанным с очень низкой достоверностью в положениях 28-29 SEQ ID NO: 1. Таким образом, варианты полипептида ENG, начинающиеся с аминокислот 27 или 28 и, необязательно, начинающиеся с любой из аминокислот 29-42 SEQ ID NO: 1, вероятно, сохраняют важные элементы и связывание лиганда.

Пример 11: Активность вариантов ENG-Fc в клеточном анализе

Для определения активности, с которой слитые белки hENG-hFc ингибируют передачу сигнала BMP-9 и BMP-10, использовали анализ репортерного гена в клетках A204. Этот анализ основан на линии клеток рабдомиосаркомы человека, трансфицированных с использованием pGL3 BRE-люцифераза-репортерной плазмиды (Korchynskiy et al, 2002, J Biol Chem 277: 4883-4891), а также репортерной плазмиды Renilla (pRLCMV-люцифераза) для контроля эффективности трансфекции. В BMP-чувствительных генах (содержащих промотор Id1) присутствуют мотивы BRE, поэтому этот вектор общепринято используют в случае факторов передачи сигнала через Smad1 и/или Smad5. В отсутствие слитых белков ENG-Fc BMP-9 и BMP-10 дозозависимым образом стимулируют передачу сигнала в клетках A204.

В первый день анализа клетки A204 (инвентарный номер ATCC®: HTB-82™; депонент: DJ Giard) распределяли в 48-луночные планшеты при 10^5 клеток на лунку. На следующий день раствор, содержащий 12 мкг pGL3 BRE-люциферазы, 0,1 мкг pRLCMV-люциферазы, 30 мкл Eugene 6 (Roche Diagnostics) и 970 мкл OptiMEM (Invitrogen), преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре перед добавлением к 24 мл буфера для анализа (среды МакКоя, дополненной 0,1% BSA). Эту смесь наносили на высеянные клетки (500 мкл/лунку) для инкубации в течение ночи при 37°C. На третий день удаляли среду и заменяли ее тестируемыми веществами (250 мкл/лунку), разведенными в буфере для анализа. После инкубации в течение ночи

при 37°C клетки промывали, лизировали пассивным буфером для лизиса (Promega E1941) и замораживали при -70°C. Перед анализом планшеты нагревали до комнатной температуры с осторожным встряхиванием. Лизаты клеток переносили в двух параллелях на планшеты для считывания хемилюминесценции (96-луночный) и анализировали в люминометре с реагентами из системы Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega E1980) для определения нормированной активности люциферазы.

Результаты свидетельствуют о том, что белки hENG-hFc являются мощными ингибиторами клеточной передачи сигнала, опосредуемой BMP-9 и BMP-10. Как показано в таблице ниже, полноразмерная конструкция hENG(26-586)-hFc ингибирует передачу сигнала BMP-9 и BMP-10 со значениями IC₅₀ в субнанолярном и нижнем нанолярном диапазонах, соответственно. Кроме того, укороченные варианты hENG(26-359)-hFc и hENG(26-346)-hFc являлись более мощными, чем hENG(26-586)-hFc.

Конструкция	IC ₅₀ (нМ)	
	hBMP-9	hBMP-10
hENG(26-586)-hFc	0,26	7,9
hENG(26-359)-hFc	0,16	3,5
hENG(26-346)-hFc	0,19	4,6

Пример 12: Укороченный вариант hENG(26-359)-hFc ингибирует индуцируемый VEGF ангиогенез в анализе CAM

Авторы настоящего изобретения исследовали эффекты укороченного варианта hENG(26-359)-hFc в отношении ангиогенеза в той же системе анализа CAM, которая описана в примере 6, в которой VEGF используют для индукции ангиогенеза. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых обработкой VEGF (50 нг ежедневно), снижали на 75% посредством конкурентной обработки hENG(26-359)-hFc (SEQ ID NO: 25; 20 мкг ежедневно) (**фигура 38**). С помощью исследований на основе SPR подтверждали, что VEGF не связывается с hENG(26-359)-hFc, и, таким образом, эффекты этого варианта в отношении ангиогенеза в настоящем эксперименте CAM не являлись результатом прямого взаимодействия

между слитым белком и VEGF. Необходимо отметить, что в случае hENG(26-359)-hFc доза 10 мкг соответствует дозе 14 мкг, используемой в случае более длинных конструкций ENG-Fc, тестируемых в примере 6, с учетом теоретической молекулярной массы каждой конструкции. Таким образом, укороченный вариант hENG(26-359)-hFc демонстрировал эквивалентную, если не более высокую, эффективность ингибирования индуцируемого VEGF ангиогенеза по сравнению с конструкциями ENG с полноразмерным ECD (**фигура 23**) в той же системе анализа.

Пример 13: Укороченный вариант hENG(26-346)-hFc ингибирует ангиогенез в анализе ангиореактора мыши

Укороченный вариант hENG(26-346)-hFc тестировали в том же анализе ангиореактора мыши, который описан в примере 7. Ангиореакторы подкожно имплантировали бестимусным мышам (четыре на мышь) и мышам ежедневно вводили hENG(26-346)-hFc (10 мг/кг, s.c.) или наполнитель (Tris-забуференный физиологический раствор) в течение 11 дней, после чего мышам инъецировали декстран, меченый флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), (20 мг/кг, i.v.) и умерщвляли их через 20 мин. Затем измеряли количество FITC-декстрана, содержащегося в каждом ангиореакторе, в качестве индекса образования кровеносных сосудов. Как показано на **фигуре 39**, добавление факторов роста (GF) FGF-2 и VEGF в ангиореакторы приводило к значительному повышению васкуляризации, в то время как конкурентное введение hENG(26-346)-hFc полностью предотвращало это повышение. В исследованиях на основе SPR подтверждали, что hENG(26-346)-hFc не связывается ни с FGF-2, ни с VEGF, таким образом, исключая возможность того, что эффекты hENG(26-346)-hFc в отношении индуцируемого ангиогенеза в настоящем эксперименте являлись результатом прямого взаимодействия между слитым белком и FGF-2 или VEGF. Эти результаты, полученные с помощью системы анализа млекопитающего, дополняют результаты, полученные для укороченного варианта hENG(26-359)-hFc в анализе CAM (пример 12). В совокупности, они демонстрируют антиангиогенную активность слитых белков ENG-Fc, включающих предпочтительные укорочения внеклеточного домена ENG, *in vivo*.

Пример 14: Больше время полужизни укороченного варианта hENG(26-346)-hFc *in vivo*

Авторы настоящего изобретения осуществляли модифицированное исследование фармакокинетики для определения общего времени полувыведения hENG(26-346)-hFc и сравнивали его с таковым для полноразмерного белка mENG(27-581)-mFc. Белок hENG(26-346)-hFc флуоресцентно метили красителем Alexa Fluor® 750 с использованием набора для быстрого мечения антитела SAIVI™ (визуализации небольших животных *in vivo*) по инструкциям производителя (Invitrogen™). Меченый белок отделяли от свободной метки посредством эксклюзионной хроматографии. Бестимусным мышам (n=3, 17-20 г) инъецировали меченый hENG(26-346)-hFc (2 мг/кг, s.c.) и осуществляли визуализацию всего тела посредством системы визуализации IVIS (Xenogen®/Caliper Life Sciences) для определения уровней слитого белка через 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48 и 72 часа после инъекции. Среднее время полувыведения hENG(26-346)-hFc составляло 26,5 часа, что составляет на 20% больше, чем время полужизни mENG(27-581)-mFc 22 часа, определенное в аналогичном исследовании.

Пример 15: Эффект белков ENG-Fc в отношении роста опухоли в моделях ксенотрансплантата мыши

Белки ENG-Fc тестировали на двух разных моделях ксенотрансплантатов мыши для определения того, могут ли эти белки ингибировать рост опухоли. В первом эксперименте бестимусным мышам в возрасте 6 недель подкожно инъецировали 10^6 клеток карциномы молочной железы 4T1 (инвентарный номер ATCC®: CRL-2539™; депонент: BA Pulaski). Мышам (n=10 на группу) ежедневно вводили (s.c.) дозу mENG(27-581)-mFc (10 мг/кг) или наполнителя (Tris-забуференного физиологического раствора). Опухоли измеряли вручную с помощью штангенциркуля с цифровой индикацией и вычисляли объем опухоли по формуле: $\text{объем} = 0,5 (\text{длина}) (\text{ширина})^2$. Как показано на **фигуре 40**, введение mENG(27-581)-mFc снижало объем опухоли на 45% по сравнению с наполнителем ко дню 24 после имплантации.

Слитые белки ENG-Fc также тестировали на модели ксенотрансплантата карциномы Colon-26. Мышам BALB/c в возрасте 7

недель подкожно инъецировали $1,5 \times 10^6$ клеток карциномы Colon-26 (инвентарный номер ATCC®: CRL-2638™; депонент: N Restifo). Мышам (n=10 на группу) ежедневно вводили (s.c.) дозу mENG(27-581)-mFc (1, 10 или 30 мг/кг) или наполнителя (Tris-забуференного физиологического раствора). Объем опухоли определяли, как описано выше. Как показано на **фигуре 41**, введение mENG(27-581)-mFc вызывало дозозависимое снижение объема опухоли со снижениями на 55% и приблизительно 70% по сравнению с наполнителем в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, соответственно, ко дню 58 после имплантации. Таким образом, mENG(27-581)-mFc значительно замедлял рост двух разных типов опухолей в моделях ксенотрансплантатов мыши, что соответствует указанной выше антиангиогенной активности слитых белков, включающих полноразмерный внеклеточный домен ENG мыши (примеры 5-7). В предварительном эксперименте укороченный вариант hENG(26-346) также замедлял рост опухоли по сравнению с наполнителем в модели ксенотрансплантата Colon-26, что соответствует антиангиогенной активности этого варианта в анализе ангиореактора мыши (пример 13).

В совокупности, указанные выше результаты свидетельствуют о том, что слитые белки, содержащие полноразмерный ECD ENG, и их конкретные укороченные варианты демонстрируют высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10, но не с множеством других лигандов семейства TGFβ, включая TGFβ-1 и TGFβ-3. Эти полипептиды ENG могут ингибировать ангиогенез и рост опухоли в модельных системах и, таким образом, иметь потенциал для лечения пациентов с нежелательным ангиогенезом, включая пациентов со злокачественными новообразованиями. По сравнению с конструкциями, содержащими полноразмерный ECD ENG, укороченные полипептиды ENG hENG(26-346)-hFc и/или hENG(26-359)-hFc демонстрировали более высокую активность и улучшенные свойства в отношении нескольких других ключевых параметров (см. общую таблицу ниже).

Параметр		Полипептид ECD в слитом белке (полученный из клеток CHO)		
		Полноразмерный ECD – 26-586 человека или 27-581 мыши	26-359 человека	26-346 человека
Экспрессия	Количество	31 мг/л	9 мг/л	90 мг/л
	Качество	на 96% мономерный	на 84% мономерный	на 96% мономерный
Аффинность связывания (K_D)	BMP-9	33 пМ	4,2 пМ	4,3 пМ
	BMP-10	490 пМ	86 пМ	140 пМ
Скорость диссоциации (k_d)	BMP-9	$25 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$3,5 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$2,4 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$
	BMP-10	$110 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$23 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$28 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$
Активность (IC_{50} в клеточном анализе)	BMP-9	0,26 нМ	0,16 нМ	0,19 нМ
	BMP-10	7,9 нМ	3,5 нМ	4,6 нМ
Время полувыведения		22 часа	---	26,5 часа
Антиангиогенная активность	HUVEC	Да	---	---
	SAM	ингибирование 65%	ингибирование 75%	---
	Ангиореактор	ингибирование 100%	---	ингибирование 100%
Противоопухолевая активность	Опухоль 4T1	Да	---	---
	Опухоль Colon-26	Да Дозозависимая	---	Да

--- Не исследовали

Вариант hENG(26-346)-hFc, в частности, обладал лучшей комбинацией свойств с более высокой активностью, более высокой аффинностью связывания, более медленной скоростью диссоциации, большим временем полувыведения и лучшей продукцией белка, чем конструкции с ECD полноразмерным ENG. В качестве ловушек для лигандов, укороченные полипептиды ENG, предпочтительно, должны проявлять низкую скорость диссоциации лиганда, т.к. крайне желательным является десятикратное снижение скорости диссоциации BMP-9 в случае hENG(26-346)-hFc по сравнению с полноразмерной конструкцией. Вариант hENG(26-378)-hFc демонстрировал свойства связывания BMP-9 (аффинность и скорость диссоциации) в промежутке между hENG(26-346)-hFc и hENG(26-359)-hFc, с одной стороны, и hENG(26-437)-hFc, с другой стороны, при этом hENG(26-378) больше похож на более короткие конструкции.

Пример 16: Лечение с использованием белков ENG-Fc в модели фиброза печени мыши

Эффективность белков ENG-Fc в лечении фиброза оценивали в модели фиброза печени мыши, вызванного CCL4 (тетрахлоридом углерода). В этом исследовании использовали пятьдесят мышей. Самцов и самок мышей A/J возрастом приблизительно 14 недель на начало эксперимента (день 0) подвергали акклиматизации в лаборатории в течение по меньшей мере 48 часов. Животных проверяли ежедневно в течение эксперимента и умерщвляли при наблюдении любых признаков заболеваемости, летальности и токсичности тестируемого образца.

Животным вводили дозу 1 мл/кг 50% CCl4 в оливковом масле через желудочный зонд дважды в неделю для индукции фиброза печени. Животным вводили дозы mENG(27-581)-mFc в течение 13 недель, как описано в таблице ниже.

Группа	N	Фиброз печени	Лечение	Доза	Частота	Введение
1	20	CCl4+Оливковое масло	PBS	Равный объем	B.I.W.	I.P.
2	20	CCl4+Оливковое масло	мю- эндоглин	10 мг/кг	T.I.W.	I.P.

3	5	Оливковое масло	PBS	Равный объем	B.I.W.	I.P.
4	5	Оливковое масло	мю- эндоглин	10 мг/кг	T.I.W.	I.P.

Животных анализировали на предмет изменений массы тела (BW), массы печени, внешнего вида печени и гистологию. В день 0, день 28, день 56 и день 90 животных подвергали ЯМР-сканированию. Животных умерщвляли в день 45 или 90 с использованием CO₂. Для анализа сыворотки животных не кормили за 12 часов до умерщвления и забора сыворотки. Цельную кровь собирали для анализа функции печени, и печень каждого животного собирали и взвешивали. Половину печени помещали в картридж с 10% формалином и быстро замораживали долю печени в жидком азоте.

Лечение mENG(27-581)-mFc не влияло на массу печени (измеряемую как процентную долю массы тела) в течение 13 недель (фигура 42). Через 13-недельный период введения животных умерщвляли и срезы печени окрашивали гематоксилином-эозином и трихромом по Массону (фигуры 43-45). Подвергнутые лечению животные демонстрировали значительно меньший фиброз относительно неподвергнутых лечению животных (фигура 45). Кроме того, при окрашивании масляным красным O выявляли, что лечение mENG(27-581)-mFc приводило к снижению накопления жировых отложений в ткани печени, что, зачастую, является предшественником повреждения печени и фиброзного депонирования (фигура 46). Кроме того, по-видимому, лечение mENG(27-581)-mFc снижало баллонную дегенерацию гепатоцитов, ассоциированную с апоптозом и наблюдаемую в связи с воспалением печени. Уровни щелочной фосфатазы в сыворотке были меньше в когортах, подвергнутых лечению эндоглином, по сравнению с неподвергнутыми лечению (фигура 47). В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что лечение mENG(27-581)-mFc может снижать повреждение печени в этой модели фиброза печени мыши, и, таким образом, по-видимому, белки ENG-Fc применимы в лечении фиброзных нарушений печени, включая цирроз и возможные печеночноклеточные

карциномы.

Пример 17: Эффект белка ENG-Fc в пищевой модели фиброза печени мыши

Эффективность белков ENG-Fc также оценивали на модели неалкогольного стеатогепатита (NASH) мыши, вызываемого метионином и пищевой недостаточностью холина (MCDD). Мышей C57BL/6 дикого типа держали на стандартной диете или диете, включающей большое количество сахарозы (40%) и жира (10%), но с недостатком метионина и холина, важных для β -окисления в печени и продукции липопротеина очень низкой плотности (Takahashi et al., 2012, World J Gastroenterol 18:2300-2308). В результате мыши с MCDD демонстрировали жировые отложения, считающиеся предшественниками повреждения печени и фиброзного депонирования (Corbin et al., 2012, Curr Opin Gastroenterol 28:159-165). В возрасте 12 недель мышей сажали на соответствующие диеты и начинали интраперитонеальное введение mENG(27-581)-mFc (10 мг/кг) или наполнителя (n=10 на группу) дважды в неделю в течение 3 недель. По завершении введения доз мышей умерщвляли и срезы печени окрашивали масляным красным O, растворимым в липидах диазокрасителем, для оценки степени депонирования липидов.

Как и ожидали, у мышей, которых кормили стандартным кормом, наблюдали лишь небольшие липидные отложения в ткани печени (данные не представлены), в то время как мыши с MCDD демонстрировали множество больших липидных отложений, в совокупности занимающих значительную часть общей площади ткани (фигура 48A, C). У мышей с MCDD лечение mENG(27-581)-mFc значительно снижало липидные отложения в печени по сравнению с наполнителем (фигура 48). Хотя эндогенный TGF β в значительной степени участвует в прогрессировании заболевания печени (Dooley et al., 2012, Cell Tissue Res 347:245-256), Fc-слитый белок, содержащий рецептор TGF β типа II и связывающийся с TGF β с высокой аффинностью, имеет небольшой эффект в отношении накопления липидных отложений в печени (данные не представлены). Как описано в примере 3, mENG(27-581)-mFc и

другие белки ENG-Fc не связываются ни с TGF β 1, TGF β 2, ни с TGF β 3, поэтому биологическая активность mENG(27-581)-mFc у мышей с MCDD не является результатом ингибирования передачи сигнала этими лигандами. В совокупности, эти результаты свидетельствуют о том, что mENG(27-581)-mFc может значительно снижать депонирование липидов в модели на мышах, в которой недостаточность питательных веществ, в конечном итоге, приводит к фиброзу и неалкогольному стеатогепатозу, таким образом, представляя дополнительное доказательство того, что белки ENG-Fc, по-видимому, применимы в лечении фиброза печени.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, таким образом, включены посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылок. В случае конфликта, настоящая заявка, включая любые определения в настоящем описании, будет обладать приоритетом.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Хотя конкретные варианты осуществления настоящего изобретения подробно представлены в настоящем описании, изложенное выше описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Многие варианты изобретения будут очевидны специалистам в этой области при рассмотрении настоящего описания и представленной ниже формулы изобретения. Полный объем изобретения необходимо определять со ссылкой на формулу изобретения вместе с полным объемом эквивалентов и описание вместе с такими вариантами.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Acceleron Pharma, Inc.

<120> ЭНДОГЛИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

<130> A0904.70009WO00

<140> PCT/US2014/062147

<141> 2014-10-24

<150> US 61/896,002

<151> 2013-10-25

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 658

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu
20 25 30

Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln
35 40 45

Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val
50 55 60

His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu
65 70 75 80

Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu
85 90 95

Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu
100 105 110

Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln
115 120 125

Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr
130 135 140

Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala
145 150 155 160

Glu	Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gln	
				165					170					175		
Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Cys	Met	Leu	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	Met	Gly	Arg	
			180					185					190			
Thr	Leu	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Cys	His	
		195					200					205				
Leu	Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	
	210					215					220					
Pro	Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	
225					230					235					240	
Ser	Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	
				245					250					255		
Pro	Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	
			260					265					270			
Thr	Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	
		275					280					285				
Gly	Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	
	290					295					300					
Met	Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	
305					310					315					320	
Ser	Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	
				325					330					335		
Ser	Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	
			340					345					350			
Glu	Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr	Lys	Cys	Ala	Asp	Asp	Ala	Met	
		355					360					365				
Thr	Leu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Val	Ala	His	Leu	Lys	Cys	Thr	Ile	
	370					375					380					
Thr	Gly	Leu	Thr	Phe	Trp	Asp	Pro	Ser	Cys	Glu	Ala	Glu	Asp	Arg	Gly	
385					390					395					400	
Asp	Lys	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Cys	Gly	Met	Gln	Val	
				405					410					415		

Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser
420 425 430

Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu
435 440 445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
450 455 460

Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser
465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
485 490 495

Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala
500 505 510

Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
515 520 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr
530 535 540

Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln
545 550 555 560

Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser
565 570 575

Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Pro Ala Val
580 585 590

Leu Gly Ile Thr Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala
595 600 605

Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Arg Ser Pro Ser Lys Arg Glu
610 615 620

Pro Val Val Ala Val Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr
625 630 635 640

Asn His Ser Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser
645 650 655

Met Ala

<210> 2
<211> 2030
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 2
cctgccactg gacacaggat aaggcccagc gcacaggccc ccacgtggac agcatggacc 60
gcggcacgct ccctctggct gttgccctgc tgctggccag ctgcagcctc agccccacaa 120
gtcttgcaga aacagtccat tgtgaccttc agcctgtggg ccccgagagg ggcgaggtga 180
catataccac tagccaggct tcgaagggct gcgtgggtca ggcccccaat gccatccttg 240
aagtccatgt cctcttcctg gagttcccaa cggggccgct acagctggag ctgactctcc 300
aggcatccaa gcaaaatggc acctggcccc gagaggtgct tctggctctc agtgtaaaca 360
gcagtgtctt cctgcatctc caggccctgg gaatcccact gcacttggcc tacaattcca 420
gcctggtcac cttccaagag cccccggggg tcaacaccac agagctgcca tccttcccca 480
agaccagat ccttgagtgg gcagctgaga ggggccccat cacctctgct gctgagctga 540
atgaccccca gagcatcctc ctccgactgg gccaaagcca ggggtcactg tccttctgca 600
tgctggaagc cagccaggac atggggccga cgctcgagtg gcggccgct actccagcct 660
tggtccgggg ctgccacttg gaaggcgtgg cgggccacaa ggaggcgcac atcctgaggg 720
tcctgccggg cactcggcc gggccccgga cggtgacggt gaaggtggaa ctgagctgcg 780
caccgggga tctcgatgcc gtcctcatcc tgcagggtcc cccctacgtg tcctgggtca 840
tcgacgcaa ccacaacatg cagatctgga cactggaga atactccttc aagatctttc 900
cagagaaaaa cattcgtggc ttcaagctcc cagacacacc tcaaggcctc ctgggggagg 960
cccggatgct caatgccagc attgtggcat ccttcgtgga gctaccgctg gccagcattg 1020
tctcacttca tgcctccagc tgcggtggta ggctgcagac ctacccgca ccgatccaga 1080
ccactcctcc caaggacact tgtagcccgg agctgctcat gtccttgatc cagacaaagt 1140
gtgccgacga cgccatgacc ctggtactaa agaaagagct tgttgcgcat ttgaagtgca 1200
ccatcacggg cctgaccttc tgggaccca gctgtgaggc agaggacagg ggtgacaagt 1260
ttgtcttgcg cagtgcctac tccagctgtg gcatgcaggt gtcagcaagt atgatcagca 1320
atgaggcggt ggtcaatatc ctgtcgagct catcaccaca gcggaaaaag gtgcactgcc 1380
tcaacatgga cagcctctct ttccagctgg gcctctacct cagcccacac ttctccagg 1440
cctccaacac catcgagccg gggcagcaga gctttgtgca ggtcagagtg tccccatccg 1500
tctccgagtt cctgctccag ttagacagct gccacctgga cttggggcct gagggaggca 1560
ccgtggaact catccagggc cgggcggcca agggcaactg tgtgagcctg ctgtccccaa 1620
gccccgaggg tgaccgcgc ttcagcttcc tcctccactt ctacacagta cccataccca 1680
aaaccggcac cctcagctgc acggtagccc tgcgtcccaa gaccgggtct caagaccagg 1740

aagtccatag gactgtcttc atgcgcttga acatcatcag ccttgacctg tctggttgca	1800
caagcaaagg cctcgtcctg cccgccgtgc tgggcatcac ctttggtgcc ttcctcatcg	1860
gggccttgc cactgctgca ctctggtaca tctactcgca cacgcgttcc cccagcaagc	1920
gggagcccgt ggtggcggtg gctgccccgg cctcctcgga gagcagcagc accaaccaca	1980
gcatcgggag caccagagc acccctgct ccaccagcag catggcatag	2030

<210> 3
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser	
1 5 10 15	

Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu	
20 25 30	

Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln	
35 40 45	

Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val	
50 55 60	

His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu	
65 70 75 80	

Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu	
85 90 95	

Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu	
100 105 110	

Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln	
115 120 125	

Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr	
130 135 140	

Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala	
145 150 155 160	

Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln	
165 170 175	

Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg	
---	--

180	185	190
Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg	Thr Pro Ala Leu Val	Arg Gly Cys His
195	200	205
Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu		
210	215	220
Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu		
225	230	235
Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro		
245	250	255
Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala Asn His Asn Met Gln Ile Trp		
260	265	270
Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg		
275	280	285
Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg		
290	295	300
Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala		
305	310	315
Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr		
325	330	335
Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro		
340	345	350
Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met		
355	360	365
Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val Ala His Leu Lys Cys Thr Ile		
370	375	380
Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly		
385	390	395
Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Gln Val		
405	410	415
Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala Val Val Asn Ile Leu Ser Ser		
420	425	430
Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu		

435

440

445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
 450 455 460

Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser Phe Val Gln Val Arg Val Ser
 465 470 475 480

Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
 485 490 495

Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala
 500 505 510

Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
 515 520 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr
 530 535 540

Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln
 545 550 555 560

Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser
 565 570 575

Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Leu Val Leu Pro Ala Val
 580 585 590

Leu Gly Ile Thr Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala
 595 600 605

Ala Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Arg Glu Tyr Pro Arg Pro Pro
 610 615 620

Gln
 625

<210> 4
 <211> 1931
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 cctgccactg gacacaggat aaggcccagc gcacaggccc ccacgtggac agcatggacc 60
 gcggcacgct ccctctggct gttgccctgc tgctggccag ctgcagcctc agccccacaa 120
 gtcttgcaga aacagtccat tgtgaccttc agcctgtggg ccccgagagg ggcgaggtga 180
 catataccac tagccaggct tcgaagggct gcgtggctca ggcccccaat gccatccttg 240

aagtccatgt cctcttctctg gagttcccaa cgggcccgtc acagctggag ctgactctcc	300
aggcatccaa gcaaaatggc acctggcccc gagaggtgct tctggtcctc agtgtaaaca	360
gcagtgtctt cctgcatctc caggccctgg gaatcccact gcacttggcc tacaattcca	420
gcctggtcac cttccaagag cccccggggg tcaacaccac agagctgcca tccttcccca	480
agaccagat ccttgagtgg gcagctgaga ggggccccat cacctctgct gctgagctga	540
atgaccccca gagcatcctc ctccgactgg gccaaagcca ggggtcactg tccttctgca	600
tgctggaagc cagccaggac atggggccgca cgctcgagtg gcggccgcgt actccagcct	660
tggtccgggg ctgccacttg gaaggcgtgg ccggccacaa ggaggcgcac atcctgaggg	720
tcctgccggg ccactcggcc gggccccgga cggtgacggt gaagggtggaa ctgagctgcg	780
caccgggga tctcgatgcc gtctcatcc tgcagggtcc cccctacgtg tcctggctca	840
tcgacgcaa ccacaacatg cagatctgga cactggaga atactccttc aagatctttc	900
cagagaaaaa cattcgtggc ttcaagctcc cagacacacc tcaaggcctc ctgggggagg	960
cccggatgct caatgccagc attgtggcat ccttcgtgga gctaccgctg gccagcattg	1020
tctcacttca tgctccagc tgcggtggta ggctgcagac ctcaccgca ccgatccaga	1080
ccactcctcc caaggacact tgtagcccg agctgctcat gtccttgatc cagacaaagt	1140
gtgccgacga cgccatgacc ctggtactaa agaaagagct tgttgcgcat ttgaagtgca	1200
ccatcacggg cctgaccttc tgggaccca gctgtgaggc agaggacagg ggtgacaagt	1260
ttgtcttgcg cagtgcctac tccagctgtg gcatgcaggt gtcagcaagt atgatcagca	1320
atgaggcggg ggtcaatatc ctgtcgagct catcaccaca gcggaaaaag gtgcactgcc	1380
tcaacatgga cagcctctct ttccagctgg gcctctacct cagcccacac ttctccagg	1440
cctccaacac catcgagccg gggcagcaga gctttgtgca ggtcagagtg tccccatccg	1500
tctccgagtt cctgctccag ttagacagct gccacctgga cttggggcct gagggaggca	1560
ccgtggaact catccagggc cgggcggcca agggcaactg tgtgagcctg ctgtccccaa	1620
gccccgaggg tgaccgcgc ttcagcttcc tcctccactt ctacacagta ccataccca	1680
aaaccggcac cctcagctgc acggtagccc tgcgtccaa gaccgggtct caagaccagg	1740
aagtccatag gactgtcttc atgcgcttga acatcatcag ccctgacctg tctggttgca	1800
caagcaaagg cctcgtcctg cccgccgtgc tgggcatcac ctttggtgcc ttctcatcg	1860
gggccctgct cactgctgca ctctgttaca tctactcgca cgcgctgag taccacaggc	1920
ccccacagtg a	1931

<210> 5
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Met Asp Arg Gly Val Leu Pro Leu Pro Ile Thr Leu Leu Phe Val Ile
1 5 10 15

Tyr Ser Phe Val Pro Thr Thr Gly Leu Ala Glu Arg Val Gly Cys Asp
20 25 30

Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser
35 40 45

Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu
50 55 60

Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu
65 70 75 80

Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val
85 90 95

Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala
100 105 110

Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe
115 120 125

Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser
130 135 140

Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser
145 150 155 160

Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln
165 170 175

Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met
180 185 190

Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser
195 200 205

Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg
210 215 220

Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met
225 230 235 240

Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro

				245				250				255			
Pro	Tyr	Val	Ser 260	Trp	Phe	Ile	Asp	Ile 265	Asn	His	Ser	Met	Gln 270	Ile	Leu
Thr	Thr	Gly 275	Glu	Tyr	Ser	Val	Lys 280	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser 285	Lys	Val	Lys
Gly	Val 290	Glu	Leu	Pro	Asp	Thr 295	Pro	Gln	Gly	Leu	Ile 300	Ala	Glu	Ala	Arg
Lys 305	Leu	Asn	Ala	Ser	Ile 310	Val	Thr	Ser	Phe	Val 315	Glu	Leu	Pro	Leu	Val 320
Ser	Asn	Val	Ser	Leu 325	Arg	Ala	Ser	Ser	Cys 330	Gly	Gly	Val	Phe	Gln 335	Thr
Thr	Pro	Ala	Pro 340	Val	Val	Thr	Thr	Pro 345	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys 350	Ser	Pro
Val	Leu	Leu 355	Met	Ser	Leu	Ile	Gln 360	Pro	Lys	Cys	Gly	Asn 365	Gln	Val	Met
Thr	Leu 370	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys 375	His	Val	Gln	Thr	Leu 380	Gln	Cys	Thr	Ile
Thr 385	Gly	Leu	Thr	Phe	Trp 390	Asp	Ser	Ser	Cys	Gln 395	Ala	Glu	Asp	Thr	Asp 400
Asp	His	Leu	Val	Leu 405	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser 410	Ser	Cys	Gly	Met	Lys 415	Val
Thr	Ala	His	Val 420	Val	Ser	Asn	Glu	Val 425	Ile	Ile	Ser	Phe	Pro 430	Ser	Gly
Ser	Pro	Pro 435	Leu	Arg	Lys	Lys	Val 440	Gln	Cys	Ile	Asp	Met 445	Asp	Ser	Leu
Ser	Phe 450	Gln	Leu	Gly	Leu	Tyr 455	Leu	Ser	Pro	His	Phe 460	Leu	Gln	Ala	Ser
Asn 465	Thr	Ile	Glu	Leu	Gly 470	Gln	Gln	Ala	Phe	Val 475	Gln	Val	Ser	Val	Ser 480
Pro	Leu	Thr	Ser	Glu 485	Val	Thr	Val	Gln	Leu 490	Asp	Ser	Cys	His	Leu 495	Asp
Leu	Gly	Pro	Glu	Gly	Asp	Met	Val	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser	Arg	Thr	Ala

500

505

510

Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
515 520 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala
530 535 540

Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln
545 550 555 560

Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp
565 570 575

Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr Phe
580 585 590

Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr Ile
595 600 605

Tyr Ser His Thr Arg Gly Pro Ser Lys Arg Glu Pro Val Val Ala Val
610 615 620

Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr Asn His Ser Ile Gly
625 630 635 640

Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser Met Ala
645 650

<210> 6

<211> 1965

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 6

agcatggacc gtggcgtgct ccctctgccc attaccctgc tgtttgtcat ctatagcttt 60

gtacccacaa caggtctcgc agaaagagtc ggctgtgata tacagcctgt ggacccacaa 120

aggggtgagg tgacgtttac caccagccag gtctccgagg gctgtgtagc tcaggctgcc 180

aatgctgtgc gtgaagtcca cgttctcttc ctggattttc ccggaatgct gtcacatctg 240

gagctgactc ttcaggcatc caagcaaaat ggcacggaga cccaggaggt gttcctggtc 300

ctcgtttcga acaaaaatgt cttcgtgaag ttccaggccc cggaaatccc attgcacttg 360

gcctacgact ccagcctggg catcttccaa ggacagccaa gagtcaacat cacagtgtca 420

ccatccctta cctccaggaa acagatcctc gactgggcag ccaccaaggg cgccatcacc 480

tcgatagcag cactggatga ccccaaagc atcgtcctcc agttgggcca agacccaaag 540

gcaccattct tgtgcttgcc agaagctcac aaggacatgg ggcacacact tgaatggcaa 600

ccacgagccc agaccccagt ccaaagctgt cgcttggaag gtgtgtcttg ccacaaggag	660
gcctacatcc tgaggatcct gccaggttct gaggccgggc cccggacggt gaccgtaatg	720
atggaactga gttgcacatc tggggacgcc attctcatcc tgcattggtcc tccatatgtc	780
tcctgggttca tcgacatcaa ccacagcatg cagatcttga ccacagggtga atactccgtc	840
aagatctttc caggaagcaa ggtcaaaggc gtggagctcc cagacacacc ccaaggcctg	900
atagcggagg cccgcaagct caatgccagc attgtcacct cctttgtaga gctccctctg	960
gtcagcaatg tctccctgag ggcctccagc tgcggtggtg tgttccagac cacccttgca	1020
cccgttgtga ccacacctcc caaggacaca tgcagccccg tgctactcat gtccctgac	1080
cagccaaagt gtggcaatca ggtcatgact ctggcactca ataaaaaaca cgtgcagact	1140
ctccagtga ccatcacagg cctgactttc tgggactcca gctgccaggc tgaagacact	1200
gacgaccatc ttgtcctgag tagcgctac tccagctgcg gcatgaaagt gacagcccat	1260
gtggtcagca atgaggtgat catcagtttc ccgtcaggct caccaccact tcggaaaaag	1320
gtacagtga tcgacatgga cagcctctcc ttccagctgg gcctctacct cagcccgcac	1380
ttcctccagg catccaacac catcgaacta ggccagcagg ccttcgtaca ggtgagcgtg	1440
tctccattga cctctgaggt cacagtccag ctagatagct gccatctgga cttggggccc	1500
gaaggggaca tggtggaact catccagagc cgaacagcca agggcagctg tgtgacctg	1560
ctgtctccaa gccctgaagg tgaccacgc ttcagcttcc tcctccgggt ctacatggtg	1620
cccacacca ccgctggcac cctcagttgc aacttagctc tgcgccctag caccttgctc	1680
caggaagtct acaagacagt ctccatgcgc ctgaacatcg tcagccctga cctgtctggt	1740
aaaggccttg tcctgcctc tgtactgggt atcaccttg gtgccttct gattggggcc	1800
ctgctcacag ctgcactctg gtacatctat tctcacacac gtggccccag caagcgggag	1860
cccgtggtgg cagtggctgc cccggcctcc tctgagagca gcagtaccaa ccacagcatc	1920
gggagcacc agagcacc ccgtctccacc agcagcatgg cgtag	1965

<210> 7
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

Met	Asp	Arg	Gly	Val	Leu	Pro	Leu	Pro	Ile	Thr	Leu	Leu	Phe	Val	Ile
1				5					10					15	

Tyr	Ser	Phe	Val	Pro	Thr	Thr	Gly	Leu	Ala	Glu	Arg	Val	Gly	Cys	Asp
			20					25					30		

Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser

35

40

45

Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu
50 55 60

Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu
65 70 75 80

Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val
85 90 95

Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala
100 105 110

Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe
115 120 125

Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser
130 135 140

Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser
145 150 155 160

Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln
165 170 175

Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met
180 185 190

Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser
195 200 205

Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg
210 215 220

Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met
225 230 235 240

Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro
245 250 255

Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile Leu
260 265 270

Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val Lys
275 280 285

Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala Arg

290

295

300

Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Val
 305 310 315 320

Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln Thr
 325 330 335

Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro
 340 345 350

Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val Met
 355 360 365

Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr Ile
 370 375 380

Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr Asp
 385 390 395 400

Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val
 405 410 415

Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser Gly
 420 425 430

Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser Leu
 435 440 445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
 450 455 460

Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser
 465 470 475 480

Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
 485 490 495

Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala
 500 505 510

Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
 515 520 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala
 530 535 540

Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln

545		550		555		560
Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp						
		565		570		575
Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr Phe						
		580		585		590
Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr Ile						
		595		600		605
Tyr Ser His Thr Arg Glu Tyr Pro Lys Pro Pro Pro His Ser His Ser						
		610		615		620
Lys Arg Ser Gly Pro Val His Thr Thr Pro Gly His Thr Gln Trp Ser						
		625		630		635
						640

Leu

<210> 8
 <211> 1929
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 8
 agcatggacc gtggcgtgct ccctctgccc attaccctgc tgtttgtcat ctatagcttt 60
 gtaccacaa caggtctcgc agaaagagtc ggctgtgata tacagcctgt ggaccccaca 120
 aggggtgagg tgacgtttac caccagccag gtctccgagg gctgtgtagc tcaggctgcc 180
 aatgctgtgc gtgaagtcca cgttctcttc ctggattttc ccggaatgct gtcacatctg 240
 gagctgactc ttcaggcatc caagcaaat ggcacggaga ccaggagggt gttcctggtc 300
 ctcgtttcga acaaaaatgt cttcgtgaag ttccaggccc cggaaatccc attgcacttg 360
 gcctacgact ccagcctggt catcttccaa ggacagccaa gagtcaacat cacagtgcta 420
 ccatccctta cctccaggaa acagatcctc gactgggcag ccaccaaggg cgccatcacc 480
 tcgatagcag cactggatga ccccaaagc atcgctcctc agttgggcca agacccaaag 540
 gcaccattct tgtgcttgcc agaagctcac aaggacatgg gcgccacact tgaatggcaa 600
 ccacgagccc agaccccagt ccaaagctgt cgcttggaag gtgtgtctgg ccacaaggag 660
 gcctacatcc tgaggatcct gccaggttct gaggccgggc cccggacggt gaccgtaatg 720
 atggaactga gttgcacatc tggggacgcc attctcatcc tgcattggtc tccatatgtc 780
 tcctggttca tcgacatcaa ccacagcatg cagatcttga ccacagggtga atactccgtc 840
 aagatctttc caggaagcaa ggtcaaaggc gtggagctcc cagacacacc ccaaggcctg 900
 atagcggagg cccgcaagct caatgccagc attgtcacct cttttgtaga gtcacctctg 960

gtcagcaatg tctccctgag ggcctccagc tgcggtggtg tgttccagac caccctgca 1020
 cccgttgtga ccacacctcc caaggacaca tgcagccccg tgctactcat gtccctgac 1080
 cagccaaagt gtggcaatca ggtcatgact ctggcactca ataaaaaaca cgtgcagact 1140
 ctccagtga ccatcacagg cctgactttc tgggactcca gctgccaggc tgaagacact 1200
 gacgaccatc ttgtcctgag tagcgcctac tccagctgcg gcatgaaagt gacagcccat 1260
 gtggtcagca atgaggtgat catcagtttc ccgtcaggct caccaccact tcggaaaaag 1320
 gtacagtga tcgacatgga cagcctctcc ttccagctgg gcctctacct cagcccgac 1380
 ttcctccagg catccaacac catcgaacta ggccagcagg ccttcgtaca ggtgagcgtg 1440
 tctccattga cctctgaggt cacagtccag ctagatagct gccatctgga cttggggccc 1500
 gaaggggaca tggtggaact catccagagc cgaacagcca agggcagctg tgtgacctg 1560
 ctgtctccaa gccctgaagg tgaccacgc ttcagcttcc tctccgggt ctacatggtg 1620
 cccacacca ccgctggcac cctcagttgc aacttagctc tgcgccctag caccttgcc 1680
 caggaagtct acaagacagt ctccatgcgc ctgaacatcg tcagccctga cctgtctggt 1740
 aaaggccttg tctgcctc tgtactgggt atcaccttg gtgccttct gattggggcc 1800
 ctgctcacag ctgcactctg gtacatctat tctcacacac gtgagtatcc caagcctcca 1860
 cccattccc acagcaagcg ctcaaggccc gtccacacca ccccggggca caccagtgg 1920
 agcctctga 1929

<210> 9
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Gly Glu
 1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala
 20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr
 35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
 50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val
 65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn

85

90

95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro
165 170 175

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu
180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr
195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala
210 215 220

Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala
225 230 235 240

Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile
245 250 255

Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln
260 265 270

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser
275 280 285

Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser
290 295 300

Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro
305 310 315 320

Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr
325 330 335

Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val

340

345

350

Ala His Leu Lys Cys Thr Ile Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Pro Ser
 355 360 365

Cys Glu Ala Glu Asp Arg Gly Asp Lys Phe Val Leu Arg Ser Ala Tyr
 370 375 380

Ser Ser Cys Gly Met Gln Val Ser Ala Ser Met Ile Ser Asn Glu Ala
 385 390 395 400

Val Val Asn Ile Leu Ser Ser Ser Ser Pro Gln Arg Lys Lys Val His
 405 410 415

Cys Leu Asn Met Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser
 420 425 430

Pro His Phe Leu Gln Ala Ser Asn Thr Ile Glu Pro Gly Gln Gln Ser
 435 440 445

Phe Val Gln Val Arg Val Ser Pro Ser Val Ser Glu Phe Leu Leu Gln
 450 455 460

Leu Asp Ser Cys His Leu Asp Leu Gly Pro Glu Gly Gly Thr Val Glu
 465 470 475 480

Leu Ile Gln Gly Arg Ala Ala Lys Gly Asn Cys Val Ser Leu Leu Ser
 485 490 495

Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr
 500 505 510

Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr Gly Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu
 515 520 525

Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln Asp Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe
 530 535 540

Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser Pro Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys
 545 550 555 560

Gly

<210> 10

<211> 555

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Glu Arg Val Gly Cys Asp Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu
1 5 10 15

Val Thr Phe Thr Thr Ser Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala
20 25 30

Ala Asn Ala Val Arg Glu Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly
35 40 45

Met Leu Ser His Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
50 55 60

Thr Glu Thr Arg Glu Val Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val
65 70 75 80

Phe Val Lys Phe Gln Ala Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp
85 90 95

Ser Ser Leu Val Ile Phe Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val
100 105 110

Leu Pro Ser Leu Thr Ser Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr
115 120 125

Lys Gly Ala Ile Thr Ser Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile
130 135 140

Val Leu Gln Leu Gly Gln Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro
145 150 155 160

Glu Ala His Lys Asp Met Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala
165 170 175

Gln Thr Pro Val Gln Ser Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys
180 185 190

Glu Ala Tyr Ile Leu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg
195 200 205

Thr Val Thr Val Met Met Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile
210 215 220

Leu Ile Leu His Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn
225 230 235 240

His Ser Met Gln Ile Leu Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe
245 250 255

Pro Gly Ser Lys Val Lys Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly
 260 265 270

Leu Ile Ala Glu Ala Arg Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe
 275 280 285

Val Glu Leu Pro Leu Val Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys
 290 295 300

Gly Gly Val Phe Gln Thr Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro
 305 310 315 320

Lys Asp Thr Cys Ser Pro Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys
 325 330 335

Cys Gly Asn Gln Val Met Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln
 340 345 350

Thr Leu Gln Cys Thr Ile Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys
 355 360 365

Gln Ala Glu Asp Thr Asp Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser
 370 375 380

Ser Cys Gly Met Lys Val Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile
 385 390 395 400

Ile Ser Phe Pro Ser Gly Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys
 405 410 415

Ile Asp Met Asp Ser Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro
 420 425 430

His Phe Leu Gln Ala Ser Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe
 435 440 445

Val Gln Val Ser Val Ser Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu
 450 455 460

Asp Ser Cys His Leu Asp Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu
 465 470 475 480

Ile Gln Ser Arg Thr Ala Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro
 485 490 495

Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met
 500 505 510

Val Pro Thr Pro Thr Ala Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg
515 520 525

Pro Ser Thr Leu Ser Gln Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu
530 535 540

Asn Val Val Ser Pro Asp Leu Ser Gly Lys Gly
545 550 555

<210> 11
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 12
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
50 55 60

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
85 90 95

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
100 105 110

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
115 120 125

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
145 150 155 160

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
165 170 175

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
180 185 190

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
195 200 205

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

Lys
225

<210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Apis mellifera

<400> 13

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 14

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
20

<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Asp Arg Gly Thr Leu Pro Leu Ala Val Ala Leu Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Cys Ser Leu Ser Pro Thr Ser Leu Ala
20 25

<210> 16
<211> 820
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln
20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val
35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His
50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu
85 90 95

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly
100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu
115 120 125

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln
130 135 140

Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu
145 150 155 160

Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly
165 170 175

Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr
180 185 190

Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu
195 200 205

Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Pro	210	215	220	
Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Ser	225	230	235	240
Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	245	250	255	
Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	260	265	270	
Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly	275	280	285	
Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met	290	295	300	
Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	305	310	315	320
Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	325	330	335	
Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu	340	345	350	
Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr	Lys	Cys	Ala	Asp	Asp	Ala	Met	Thr	355	360	365	
Leu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Val	Ala	His	Leu	Lys	Cys	Thr	Ile	Thr	370	375	380	
Gly	Leu	Thr	Phe	Trp	Asp	Pro	Ser	Cys	Glu	Ala	Glu	Asp	Arg	Gly	Asp	385	390	395	400
Lys	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Cys	Gly	Met	Gln	Val	Ser	405	410	415	
Ala	Ser	Met	Ile	Ser	Asn	Glu	Ala	Val	Val	Asn	Ile	Leu	Ser	Ser	Ser	420	425	430	
Ser	Pro	Gln	Arg	Lys	Lys	Val	His	Cys	Leu	Asn	Met	Asp	Ser	Leu	Ser	435	440	445	
Phe	Gln	Leu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ser	Pro	His	Phe	Leu	Gln	Ala	Ser	Asn	450	455	460	

Thr	Ile	Glu	Pro	Gly	Gln	Gln	Ser	Phe	Val	Gln	Val	Arg	Val	Ser	Pro	465	470	475	480
Ser	Val	Ser	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu	Asp	Ser	Cys	His	Leu	Asp	Leu	485	490	495	
Gly	Pro	Glu	Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ile	Gln	Gly	Arg	Ala	Ala	Lys	500	505	510	
Gly	Asn	Cys	Val	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Asp	Pro	Arg	515	520	525	
Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	His	Phe	Tyr	Thr	Val	Pro	Ile	Pro	Lys	Thr	Gly	530	535	540	
Thr	Leu	Ser	Cys	Thr	Val	Ala	Leu	Arg	Pro	Lys	Thr	Gly	Ser	Gln	Asp	545	550	555	560
Gln	Glu	Val	His	Arg	Thr	Val	Phe	Met	Arg	Leu	Asn	Ile	Ile	Ser	Pro	565	570	575	
Asp	Leu	Ser	Gly	Cys	Thr	Ser	Lys	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	580	585	590	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	595	600	605	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	610	615	620	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	625	630	635	640
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	645	650	655	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	660	665	670	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	675	680	685	
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	690	695	700	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	705	710	715	720

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
725 730 735

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
740 745 750

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
755 760 765

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
770 775 780

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
785 790 795 800

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
805 810 815

Ser Pro Gly Lys
820

<210> 17
<211> 2463
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 17
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg ccgaaacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120
gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180
cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacggggc cgtcacagct ggagctgact 240
ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg 300
aacagcagtg tcttctctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggccataaat 360
tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc 420
cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagagggggc ccatcacctc tgctgctgag 480
ctgaatgacc cccagagcat cctcctccga ctgggccaag cccaggggtc actgtccttc 540
tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcgggc gcgtactcca 600
gccttgggtc ggggctgcca cttggaaggc gtggccgggc acaaggaggc gcacatcctg 660
agggtcctgc cgggccactc ggccggggcc cggacggtga cgggtgaaggt ggaactgagc 720
tgcgcacccg gggatctcga tgccgtctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg 780
ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc 840
tttccagaga aaaacattcg tggcttcaag ctcccagaca cacctcaagg cctcctgggg 900

gaggcccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcaccccttcg tggagctacc gctggccagc	960
attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggg ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc	1020
cagaccactc ctcccaagga cacttgtagc ccggagctgc tcatgtcctt gatccagaca	1080
aagtgtgccg acgacgccat gaccctggta ctaaagaaag agcttggtgc gcatttgaag	1140
tgcaccatca cgggcctgac cttctgggac ccagctgtg aggcagagga caggggtgac	1200
aagtttgtct tgcgcagtgc ttactccagc tgtggcatgc aggtgtcagc aagtatgac	1260
agcaatgagg cgggtggtaa tatcctgtcg agctcatcac cacagcggaa aaaggtgcac	1320
tgctcaaca tggacagcct ctctttccag ctgggcctct acctcagccc acatttctc	1380
caggcctcca acaccatcga gccggggcag cagagctttg tgcaggtcag agtgtcccca	1440
tccgtctccg agttcctgct ccagttagac agctgccacc tggacttggg gcctgagggg	1500
ggcaccgtgg aactcatcca gggccgggag gccaaaggga actgtgtgag cctgctgtcc	1560
ccaagccccg agggtgacc gcgcttcagc ttctctctcc acttctacac agtaccata	1620
cccaaaaccg gcaccctcag ctgcacggta gccctgcgtc ccaagaccgg gtctcaagac	1680
caggaagtcc ataggactgt cttcatgcgc ttgaacatca tcagccctga cctgtctggt	1740
tgcacaagca aaggcaccgg tgggtggacc aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc	1800
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc	1860
aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc	1920
cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1980
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	2040
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc	2100
ctccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	2160
gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	2220
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	2280
gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt ctctctctat	2340
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	2400
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa	2460
tga	2463

<210> 18
 <211> 814
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5						10				15	

Ala	Val	Phe	Val	Ser	Pro	Gly	Ala	Glu	Thr	Val	His	Cys	Asp	Leu	Gln	20	25	30	
Pro	Val	Gly	Pro	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	Gln	Val	35	40	45	
Ser	Lys	Gly	Cys	Val	Ala	Gln	Ala	Pro	Asn	Ala	Ile	Leu	Glu	Val	His	50	55	60	
Val	Leu	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	Thr	Gly	Pro	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	65	70	75	80
Leu	Gln	Ala	Ser	Lys	Gln	Asn	Gly	Thr	Trp	Pro	Arg	Glu	Val	Leu	Leu	85	90	95	
Val	Leu	Ser	Val	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	100	105	110	
Ile	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ser	Leu	Val	Thr	Phe	Gln	Glu	115	120	125	
Pro	Pro	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Gln	130	135	140	
Ile	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Ile	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	145	150	155	160
Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gln	Gly	165	170	175	
Ser	Leu	Ser	Phe	Cys	Met	Leu	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	Met	Gly	Arg	Thr	180	185	190	
Leu	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Cys	His	Leu	195	200	205	
Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Pro	210	215	220	
Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Ser	225	230	235	240
Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	245	250	255	
Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	260	265	270	

Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly	
		275					280					285				
Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met	
	290					295					300					
Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	
305					310					315					320	
Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	
				325					330					335		
Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu	
			340					345					350			
Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr	Lys	Cys	Ala	Asp	Asp	Ala	Met	Thr	
		355					360					365				
Leu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Val	Ala	His	Leu	Lys	Cys	Thr	Ile	Thr	
	370					375					380					
Gly	Leu	Thr	Phe	Trp	Asp	Pro	Ser	Cys	Glu	Ala	Glu	Asp	Arg	Gly	Asp	
385					390					395					400	
Lys	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Cys	Gly	Met	Gln	Val	Ser	
				405					410					415		
Ala	Ser	Met	Ile	Ser	Asn	Glu	Ala	Val	Val	Asn	Ile	Leu	Ser	Ser	Ser	
			420					425					430			
Ser	Pro	Gln	Arg	Lys	Lys	Val	His	Cys	Leu	Asn	Met	Asp	Ser	Leu	Ser	
		435					440					445				
Phe	Gln	Leu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ser	Pro	His	Phe	Leu	Gln	Ala	Ser	Asn	
	450					455					460					
Thr	Ile	Glu	Pro	Gly	Gln	Gln	Ser	Phe	Val	Gln	Val	Arg	Val	Ser	Pro	
465					470					475					480	
Ser	Val	Ser	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu	Asp	Ser	Cys	His	Leu	Asp	Leu	
				485					490					495		
Gly	Pro	Glu	Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ile	Gln	Gly	Arg	Ala	Ala	Lys	
			500					505					510			
Gly	Asn	Cys	Val	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Asp	Pro	Arg	
		515					520					525				

Phe Ser Phe Leu Leu His Phe Tyr Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr Gly
530 535 540

Thr Leu Ser Cys Thr Val Ala Leu Arg Pro Lys Thr Gly Ser Gln Asp
545 550 555 560

Gln Glu Val His Arg Thr Val Phe Met Arg Leu Asn Ile Ile Ser Pro
565 570 575

Asp Leu Ser Gly Cys Thr Ser Lys Gly Thr Gly Gly Gly Thr His Thr
580 585 590

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
595 600 605

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
610 615 620

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
625 630 635 640

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
645 650 655

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
660 665 670

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
675 680 685

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
690 695 700

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
705 710 715 720

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
725 730 735

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
740 745 750

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
755 760 765

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
770 775 780

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
785 790 795 800

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
805 810

<210> 19
<211> 821
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Gly Glu Arg Val Gly Cys Asp Leu Gln
20 25 30

Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser Gln Val
35 40 45

Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu Val His
50 55 60

Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Gln Glu Val Phe Leu
85 90 95

Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala Pro Glu
100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe Gln Gly
115 120 125

Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser Arg Lys
130 135 140

Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser Ile Ala
145 150 155 160

Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln Asp Pro
165 170 175

Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met Gly Ala
180 185 190

Thr	Leu	Glu	Trp	Gln	Pro	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Val	Gln	Ser	Cys	Arg	195	200	205
Leu	Glu	Gly	Val	Ser	Gly	His	Lys	Glu	Ala	Tyr	Ile	Leu	Arg	Ile	Leu	210	215	220
Pro	Gly	Ser	Glu	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Met	Met	Glu	Leu	225	230	235
Ser	Cys	Thr	Ser	Gly	Asp	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Pro	Pro	Tyr	245	250	255
Val	Ser	Trp	Phe	Ile	Asp	Ile	Asn	His	Ser	Met	Gln	Ile	Leu	Thr	Thr	260	265	270
Gly	Glu	Tyr	Ser	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser	Lys	Val	Lys	Gly	Val	275	280	285
Glu	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Ile	Ala	Glu	Ala	Arg	Lys	Leu	290	295	300
Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Thr	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Val	Ser	Asn	305	310	315
Val	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Thr	Thr	Pro	325	330	335
Ala	Pro	Val	Val	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Val	Leu	340	345	350
Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Gln	Pro	Lys	Cys	Gly	Asn	Gln	Val	Met	Thr	Leu	355	360	365
Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	His	Val	Gln	Thr	Leu	Gln	Cys	Thr	Ile	Thr	Gly	370	375	380
Leu	Thr	Phe	Trp	Asp	Ser	Ser	Cys	Gln	Ala	Glu	Asp	Thr	Asp	Asp	His	385	390	395
Leu	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Cys	Gly	Met	Lys	Val	Thr	Ala	405	410	415
His	Val	Val	Ser	Asn	Glu	Val	Ile	Ile	Ser	Phe	Pro	Ser	Gly	Ser	Pro	420	425	430
Pro	Leu	Arg	Lys	Lys	Val	Gln	Cys	Ile	Asp	Met	Asp	Ser	Leu	Ser	Phe	435	440	445

Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser Asn Thr
450 455 460

Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser Pro Leu
465 470 475 480

Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp Leu Gly
485 490 495

Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala Lys Gly
500 505 510

Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro Arg Phe
515 520 525

Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala Gly Thr
530 535 540

Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln Glu Val
545 550 555 560

Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Ile Val Ser Pro Asp Leu Ser
565 570 575

Gly Lys Gly Thr Gly Gly Gly Glu Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn
580 585 590

Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu
595 600 605

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
610 615 620

Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
625 630 635 640

Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
645 650 655

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
660 665 670

Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
675 680 685

Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser
690 695 700

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro
705 710 715 720

Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu
725 730 735

Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala
740 745 750

Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr
755 760 765

Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
770 775 780

Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser
785 790 795 800

Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser
805 810 815

Arg Ser Leu Gly Lys
820

<210> 20
<211> 2466
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 20
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg gggaaagagt cggctgtgat ctacagcctg tggacccac aaggggtgag 120
gtgacgttta ccaccagcca ggtctccgag ggctgtgtag ctcaggctgc caatgctgtg 180
cgtgaagtcc acgttctctt cctggatttt cccggaatgc tgtcacatct ggagctgact 240
cttcaggcat ccaagcaaaa tggcacggag acccaggagg tgttcttggt cctcgtttcg 300
aacaaaaatg tcttcgtgaa gttccaggcc ccggaatcc cattgcactt ggcctacgac 360
tccagcctgg tcatcttcca aggacagcca agagtcaaca tcacagtgt accatccctt 420
acctccagga aacagatcct cgactgggca gccaccaagg ggcgccatcac ctcgatagca 480
gcactggatg acccccaaag catcgtcctc cagttggggc aagacccaaa ggcaccattc 540
ttgtgcttgc cagaagctca caaggacatg ggcgccacac ttgaatggca accacgagcc 600
cagaccccag tccaaagctg tcgcttgga ggtgtgtctg gccacaagga ggcctacatc 660
ctgaggatcc tgccaggttc tgaggccggg ccccggaagg tgaccgtaat gatggaactg 720
agttgcacat ctgggggacgc cattctcatc ctgcatggtc ctccatatgt ctctggttc 780

atcgacatca accacagcat gcagatcttg accacaggtg aatactccgt caagatcttt	840
ccaggaagca aggtcaaagg cgtggagctc ccagacacac cccaaggcct gatagcggag	900
gcccgaagc tcaatgccag cattgtcacc tcctttgtag agctccctct ggtcagcaat	960
gtctccctga gggcctccag ctgcggtggt gtgttccaga ccaccctgc acccgttgtg	1020
accacacctc ccaaggacac atgcagcccc gtgctactca tgtccctgat ccagccaaag	1080
tgtggcaatc aggtcatgac tctggcactc aataaaaaac acgtgcagac tctccagtgc	1140
accatcacag gcctgacttt ctgggactcc agctgccagg ctgaagacac tgacgaccat	1200
cttgtcctga gtagcgccta ctccagctgc ggcataaaag tgacagccca tgtggtcagc	1260
aatgaggtga tcatcagttt cccgtcaggc tcaccaccac ttcggaaaaa ggtacagtgc	1320
atcgacatgg acagcctctc cttccagctg ggctctacc tcagcccgca ctctctccag	1380
gcatccaaca ccatcgaact aggccagcag gccttcgtac aggtgagcgt gtctccattg	1440
acctctgagg tcacagtcca gctagatagc tgccatctgg acttgggggc cgaaggggac	1500
atggtggaac tcatccagag ccgaacagcc aagggcagct gtgtgacctt gctgtctcca	1560
agccctgaag gtgaccacg cttcagcttc ctctccggg tctacatggg gccacacccc	1620
accgctggca ccctcagttg caacttagct ctgcgcctta gcacctgtc ccaggaagtc	1680
tacaagacag tctccatgcg cctgaacatc gtcagccctg acctgtctgg taaaggcacc	1740
ggtgggggtg agcccagagt gcccataaca cagaaccctt gtcctccact caaagagtgt	1800
cccccatgcg cagctccaga cctcttggtt ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag	1860
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatggtca catgtgtggt ggtggatgtg	1920
agcgaggatg acccagacgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca	1980
gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgccttc	2040
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagttca aatgcaaggc caacaacaga	2100
gccctcccat ccccatcgaa gaaaaccatc tcaaaaccca gagggccagt aagagctcca	2160
caggtatatg tcttgctcc accagcagaa gagatgacta agaaagagtt cagtctgacc	2220
tgcatgatca caggcttctt acctgccgaa attgctgtgg actggaccag caatgggcgt	2280
acagagcaaa actacaagaa caccgcaaca gtccctggact ctgatgggtc ttacttcatg	2340
tacagcaagc tcagagtaca aaagagcact tgggaaagag gaagtctttt cgctgtctca	2400
gtggtccacg agggctctgca caatcacctt acgactaaga ccatctcccg gtctctgggt	2460
aaatga	2466

<210> 21
 <211> 671
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln
20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val
35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His
50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu
85 90 95

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly
100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu
115 120 125

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln
130 135 140

Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu
145 150 155 160

Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly
165 170 175

Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr
180 185 190

Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu
195 200 205

Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro
210 215 220

Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser
225 230 235 240

Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro

				245				250				255			
Tyr	Val	Ser	Trp 260	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn 265	His	Asn	Met	Gln	Ile 270	Trp	Thr
Thr	Gly	Glu 275	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile 280	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn 285	Ile	Arg	Gly
Phe	Lys 290	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro 295	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly 300	Glu	Ala	Arg	Met
Leu 305	Asn	Ala	Ser	Ile 310	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu 315	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser 320
Ile	Val	Ser	Leu	His 325	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly 330	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr 335	Ser
Pro	Ala	Pro	Ile 340	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro 345	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser 350	Pro	Glu
Leu	Leu	Met 355	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr 360	Lys	Cys	Ala	Asp	Asp 365	Ala	Met	Thr
Leu 370	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu 375	Val	Ala	His	Leu	Lys 380	Cys	Thr	Ile	Thr
Gly 385	Leu	Thr	Phe	Trp	Asp 390	Pro	Ser	Cys	Glu	Ala 395	Glu	Asp	Arg	Gly	Asp 400
Lys	Phe	Val	Leu	Arg 405	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser 410	Cys	Gly	Met	Gln	Val 415	Ser
Ala	Ser	Met	Ile 420	Ser	Asn	Glu	Ala 425	Val	Val	Asn	Ile	Leu	Ser 430	Ser	Ser
Ser	Pro	Gln 435	Arg	Thr	Gly	Gly	Gly 440	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp 445	Lys	Thr	His
Thr	Cys 450	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 455	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly 460	Gly	Pro	Ser	Val
Phe 465	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys 470	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu 475	Met	Ile	Ser	Arg	Thr 480
Pro	Glu	Val	Thr	Cys 485	Val	Val	Val	Asp	Val 490	Ser	His	Glu	Asp	Pro 495	Glu
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys

500	505	510
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
515	520	525
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
530	535	540
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
545	550	555
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
565	570	575
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
580	585	590
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
595	600	605
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
610	615	620
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
625	630	635
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
645	650	655
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
660	665	670

<210> 22
 <211> 2016
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 22	
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt	60
tcgcccggcg ccgaaacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag	120
gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc	180
cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacggggc cgtcacagct ggagctgact	240
ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg	300
aacagcagtg tcttcctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat	360
tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc	420
cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagagggggc ccatcacctc tgctgctgag	480

ctgaatgacc	cccagagcat	cctcctccga	ctgggccaaag	cccaggggtc	actgtccttc	540
tgcatgctgg	aagccagcca	ggacatgggc	cgcacgctcg	agtggcgggc	gcgtactcca	600
gccttggtcc	ggggctgcca	cttggaaggc	gtggccgggc	acaaggaggc	gcacatcctg	660
agggtcctgc	cgggccactc	ggccggggccc	cggacgggtga	cgggtgaaggt	ggaactgagc	720
tgcgcacccg	gggatctcga	tgccgtcctc	atcctgcagg	gtcccccta	cgtgtcctgg	780
ctcatcgacg	ccaaccacaa	catgcagatc	tggaccactg	gagaatactc	cttcaagatc	840
tttcagaga	aaaacattcg	tggcttcaag	ctcccagaca	cacctcaagg	cctcctgggg	900
gaggcccgga	tgctcaatgc	cagcattgtg	gcataccttcg	tggagctacc	gctggccagc	960
attgtctcac	ttcatgcctc	cagctgcggt	ggtaggctgc	agacctcacc	cgcaccgatac	1020
cagaccactc	ctcccaagga	cacttgtagc	cggagctgc	tcatgtcctt	gatccagaca	1080
aagtgtgccg	acgacgccat	gaccctggta	ctaaagaaag	agcttggtgc	gcatttgaag	1140
tgcaccatca	cgggcctgac	cttctgggac	cccagctgtg	aggcagagga	caggggtgac	1200
aagtttgtct	tgcgcagtgc	ttactccagc	tgtggcatgc	aggtgtcagc	aagtatgatac	1260
agcaatgagg	cgggtggtaa	tatcctgtcg	agctcatcac	cacagcggac	cgggtggtgga	1320
cccaaattctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	1380
ggaccgtcag	tcttctctct	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccggacc	1440
cctgagggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	1500
tgggtacgtg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagaaa	agccgcggga	ggagcagtac	1560
aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	1620
aaggagtaca	agtgcaaggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	1680
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccgggag	1740
gagatgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcttgggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	1800
atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	1860
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttctc	tatagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1920
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	1980
acgcagaaga	gcctctccct	gtccccgggt	aaatga			2016

<210> 23
 <211> 606
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5				10						15	

Ala	Val	Phe	Val	Ser	Pro	Gly	Ala	Glu	Thr	Val	His	Cys	Asp	Leu	Gln	20	25	30	
Pro	Val	Gly	Pro	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	Gln	Val	35	40	45	
Ser	Lys	Gly	Cys	Val	Ala	Gln	Ala	Pro	Asn	Ala	Ile	Leu	Glu	Val	His	50	55	60	
Val	Leu	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	Thr	Gly	Pro	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	65	70	75	80
Leu	Gln	Ala	Ser	Lys	Gln	Asn	Gly	Thr	Trp	Pro	Arg	Glu	Val	Leu	Leu	85	90	95	
Val	Leu	Ser	Val	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	100	105	110	
Ile	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ser	Leu	Val	Thr	Phe	Gln	Glu	115	120	125	
Pro	Pro	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Gln	130	135	140	
Ile	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Ile	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	145	150	155	160
Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gln	Gly	165	170	175	
Ser	Leu	Ser	Phe	Cys	Met	Leu	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	Met	Gly	Arg	Thr	180	185	190	
Leu	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Cys	His	Leu	195	200	205	
Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Pro	210	215	220	
Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Ser	225	230	235	240
Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	245	250	255	
Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	260	265	270	

Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly		
		275					280					285					
Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met		
	290					295					300						
Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser		
305					310					315					320		
Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser		
				325					330					335			
Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu		
			340					345					350				
Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Gln	Thr	Lys	Cys	Ala	Asp	Asp	Ala	Met	Thr		
		355					360					365					
Leu	Val	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr		
	370					375					380						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
385					390					395					400		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
				405					410					415			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
			420					425					430				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
		435					440					445					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	450					455					460						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
465					470					475					480		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
			485					490						495			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
			500					505					510				
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val		
		515					520					525					

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
530 535 540

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
545 550 555 560

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
565 570 575

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
580 585 590

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
595 600 605

<210> 24
<211> 1821
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 24
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgccccggc ccgaaacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120
gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180
cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacggggc cgtcacagct ggagctgact 240
ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg 300
aacagcagtg tcttcttgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat 360
tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc 420
cccaagacc agatccttga gtgggcagct gagagggggc ccatcacctc tgctgctgag 480
ctgaatgacc ccagagcat cctcctccga ctgggccaaag ccagggggtc actgtccttc 540
tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcgggc gcgtactcca 600
gccttggtcc ggggctgcca cttggaaggc gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg 660
agggtcctgc cgggccactc ggccggggcc cggacggtga cgggtgaagg ggaactgagc 720
tgcgcacccg gggatctcga tgccgtcctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg 780
ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc 840
tttccagaga aaaacattcg tggcttcaag ctcccagaca cacctcaagg cctcctgggg 900
gaggccccga tgctcaatgc cagcattgtg gcacacctc tggagctacc gctggccagc 960
attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc 1020
cagaccactc ctccaagga cacttgtagc ccggagctgc tcatgtcctt gatccagaca 1080
aagtgtgccg acgacgcat gaccctggta ctaaagaaag agcttggtgc gaccgggtgt 1140

ggaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc	1200
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	1260
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	1320
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	1380
gtggtcagcg tcctcacgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1440
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1500
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	1560
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1620
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgctgt ggactccgac	1680
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1740
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1800
tccctgtccc cgggtaaata a	1821

<210> 25
 <211> 593
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	

Ala	Val	Phe	Val	Ser	Pro	Gly	Ala	Glu	Thr	Val	His	Cys	Asp	Leu	Gln
			20					25					30		

Pro	Val	Gly	Pro	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	Gln	Val
		35					40					45			

Ser	Lys	Gly	Cys	Val	Ala	Gln	Ala	Pro	Asn	Ala	Ile	Leu	Glu	Val	His
	50					55					60				

Val	Leu	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	Thr	Gly	Pro	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr
65					70					75					80

Leu	Gln	Ala	Ser	Lys	Gln	Asn	Gly	Thr	Trp	Pro	Arg	Glu	Val	Leu	Leu
				85					90					95	

Val	Leu	Ser	Val	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly
			100					105					110		

Ile	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Tyr	Asn	Ser	Ser	Leu	Val	Thr	Phe	Gln	Glu
		115					120					125			

Pro	Pro	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Gln
	130						135				140				
Ile	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Ile	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu
145					150					155					160
Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gln	Gly
				165					170					175	
Ser	Leu	Ser	Phe	Cys	Met	Leu	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	Met	Gly	Arg	Thr
			180					185					190		
Leu	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Cys	His	Leu
		195					200					205			
Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Pro
	210					215					220				
Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Ser
225					230					235					240
Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro
				245					250					255	
Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr
			260					265					270		
Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly
		275					280					285			
Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met
	290					295					300				
Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser
305					310					315					320
Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser
				325					330					335	
Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu
			340					345					350		
Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		355					360					365			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	370					375					380				

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
385 390 395 400

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
405 410 415

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
420 425 430

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
435 440 445

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
450 455 460

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
465 470 475 480

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
485 490 495

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
500 505 510

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
515 520 525

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
530 535 540

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
545 550 555 560

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
565 570 575

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
580 585 590

Lys

<210> 26
<211> 1782
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 26
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt

tcgcccggcg ccgaaacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag	120
gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc	180
cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacggggc cgtcacagct ggagctgact	240
ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg	300
aacagcagtg tcttcctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat	360
tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc	420
cccaagacc agatccttga gtgggcagct gagagggggc ccatcacctc tgctgctgag	480
ctgaatgacc cccagagcat cctcctccga ctggggccaag cccaggggtc actgtccttc	540
tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcggcc gcgtactcca	600
gccttgggtc ggggctgcca cttggaaggc gtggccggcc acaaggaggc gcacatcctg	660
agggtcctgc cgggccactc ggccggggccc cggacggtga cgggtgaagg ggaactgagc	720
tgcgcacccg gggatctcga tgccgtctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg	780
ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc	840
tttcagaga aaaacattcg tggcttcaag ctcccagaca cacctcaagg cctcctgggg	900
gaggcccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcacacctc tggagctacc gctggccagc	960
attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc	1020
cagaccactc ctccaagga cacttgtagc ccggagctgc tcatgtcctt gatcacccgt	1080
ggtggacca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc	1140
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc caaaaacca aggacaccct catgatctcc	1200
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc tgagggtcaag	1260
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	1320
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg	1380
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1440
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	1500
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	1560
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	1620
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctata gcaagctcac cgtggacaag	1680
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	1740
cactacacgc agaagagcct ctccctgtcc ccgggtaaat ga	1782

<210> 27
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln
20 25 30

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val
35 40 45

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His
50 55 60

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu
85 90 95

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly
100 105 110

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu
115 120 125

Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln
130 135 140

Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu
145 150 155 160

Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly
165 170 175

Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr
180 185 190

Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu
195 200 205

Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro
210 215 220

Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser
225 230 235 240

Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro

				245				250				255				
Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	
			260							265				270		
Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly	
		275					280					285				
Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met	
		290				295						300				
Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	
305				310							315	320				
Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	
			325							330	335					
Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Lys	Asp	Thr	Cys	Ser	Pro	Glu	
			340							345	350					
Leu	Leu	Met	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
		355				360						365				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
		370				375					380					
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
385				390							395	400				
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
			405							410	415					
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
			420							425	430					
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
		435					440					445				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
		450				455					460					
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
465				470							475	480				
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	
			485							490	495					
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Ph	

500

505

510

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 515 520 525

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 530 535 540

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 545 550 555 560

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 565 570 575

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580 585

<210> 28
 <211> 1764
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
 tcgcccggcg ccgaaacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120
 gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180
 cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacggggc cgtcacagct ggagctgact 240
 ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg 300
 aacagcagtg tcttcttgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat 360
 tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc 420
 cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagagggggc ccatcacctc tgctgctgag 480
 ctgaatgacc ccagagcat cctcctccga ctgggccaag ccagggggtc actgtccttc 540
 tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcgggc gcgtactcca 600
 gccttggtcc ggggctgcca cttggaaggc gtggccgggc acaaggaggc gcacatcctg 660
 agggtcctgc cgggccactc ggccggggcc cggacgggtga cgggtgaagg ggaactgagc 720
 tgcgcacccg gggatctcga tgccgtcctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg 780
 ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc 840
 tttccagaga aaaacattcg tggcttcaag ctcccagaca cacctcaagg cctcctgggg 900
 gagggccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcacacctcg tggagctacc gctggccagc 960
 attgtctcac ttcattgctc cagctgcggg ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc 1020
 cagaccactc ctccaagga cacttgtagc cgggagctgc tcatgtcctt gatcacgggt 1080

```

ggtggaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctggggggg accgtcagtc      1140
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      1200
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      1260
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      1320
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      1380
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      1440
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag      1500
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      1560
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc      1620
gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      1680
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      1740
ctctccctgt ccccggttaa atga                                             1764

```

```

<210> 29
<211> 574
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 29

```

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1           5           10           15

```

```

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln
          20           25           30

```

```

Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val
          35           40           45

```

```

Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His
          50           55           60

```

```

Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr
65           70           75           80

```

```

Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu
          85           90           95

```

```

Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly
          100          105          110

```

```

Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu
          115          120          125

```

Pro	Pro	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Glu	Leu	Pro	Ser	Phe	Pro	Lys	Thr	Gln	130	135	140	
Ile	Leu	Glu	Trp	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Ile	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	145	150	155	160
Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Ser	Ile	Leu	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gln	Gly	165	170	175	
Ser	Leu	Ser	Phe	Cys	Met	Leu	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	Met	Gly	Arg	Thr	180	185	190	
Leu	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Cys	His	Leu	195	200	205	
Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Pro	210	215	220	
Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Ser	225	230	235	240
Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	245	250	255	
Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	260	265	270	
Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly	275	280	285	
Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met	290	295	300	
Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	305	310	315	320
Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	325	330	335	
Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	340	345	350	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	355	360	365	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	370	375	380	

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
385 390 395 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
405 410 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
420 425 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
435 440 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
450 455 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
465 470 475 480

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
500 505 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570

<210> 30
<211> 1725
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 30
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg ccgaaacagt ccattgtgac cttcagcctg tgggccccga gagggacgag 120
gtgacatata ccactagcca ggtctcgaag ggctgcgtgg ctcaggcccc caatgccatc 180
cttgaagtcc atgtcctctt cctggagttc ccaacggggc cgtcacagct ggagctgact 240
ctccaggcat ccaagcaaaa tggcacctgg ccccgagagg tgcttctggt cctcagtgtg 300

aacagcagtg tcttctctgca tctccaggcc ctgggaatcc cactgcactt ggcctacaat	360
tccagcctgg tcaccttcca agagcccccg ggggtcaaca ccacagagct gccatccttc	420
cccaagaccc agatccttga gtgggcagct gagagggggcc ccatcacctc tgctgctgag	480
ctgaatgacc cccagagcat cctcctccga ctggggccaag cccagggggtc actgtccttc	540
tgcatgctgg aagccagcca ggacatgggc cgcacgctcg agtggcgggc gcgtactcca	600
gccttgggtcc ggggctgcca cttggaaggc gtggccgggc acaaggaggc gcacatcctg	660
agggtcctgc cgggccactc ggccggggccc cggacggtga cgggtgaaggc ggaactgagc	720
tgcgcacccg gggatctcga tgccgtcctc atcctgcagg gtcccccta cgtgtcctgg	780
ctcatcgacg ccaaccacaa catgcagatc tggaccactg gagaatactc cttcaagatc	840
tttccagaga aaaacattcg tggcttcaag ctcccagaca cacctcaagg cctcctgggg	900
gaggcccgga tgctcaatgc cagcattgtg gcacacctc tggagctacc gctggccagc	960
attgtctcac ttcatgcctc cagctgcggt ggtaggctgc agacctcacc cgcaccgatc	1020
cagaccactc ctcccaccgg tgggtggaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa	1080
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac	1140
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc	1200
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag	1260
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	1320
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag	1380
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca	1440
tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat	1500
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc	1560
acgcctcccg tgctggactc cgacgggtcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac	1620
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac	1680
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tcccgggta aatga	1725

<210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полипептид

<400> 31

Thr Gly Gly Gly
 1

<210> 32
<211> 3
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 32

Gly Gly Gly
1

<210> 33
<211> 582
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu
1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala
20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr
35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro

165

170

175

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu
 180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr
 195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala
 210 215 220

Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala
 225 230 235 240

Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile
 245 250 255

Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln
 260 265 270

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser
 275 280 285

Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser
 290 295 300

Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro
 305 310 315 320

Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Thr
 325 330 335

Lys Cys Ala Asp Asp Ala Met Thr Leu Val Leu Lys Lys Glu Leu Val
 340 345 350

Ala Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 355 360 365

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 370 375 380

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 385 390 395 400

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 405 410 415

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

420

425

430

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 435 440 445

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 450 455 460

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 465 470 475 480

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 485 490 495

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 500 505 510

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 515 520 525

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 530 535 540

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 545 550 555 560

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 565 570 575

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580

<210> 34
 <211> 569
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu
 1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala
 20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr
 35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
 50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro
165 170 175

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu
180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr
195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala
210 215 220

Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala
225 230 235 240

Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile
245 250 255

Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln
260 265 270

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser
275 280 285

Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser
290 295 300

Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro
305 310 315 320

Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Thr Gly
325 330 335

Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
340 345 350

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
355 360 365

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
370 375 380

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
385 390 395 400

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
405 410 415

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
420 425 430

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
435 440 445

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
450 455 460

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
465 470 475 480

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
485 490 495

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
500 505 510

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
515 520 525

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
530 535 540

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
545 550 555 560

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565

<210> 35
<211> 563
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu
1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala
20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr
35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg
115 120 125

Gly Pro Ile Thr Ser Ala Ala Glu Leu Asn Asp Pro Gln Ser Ile Leu
130 135 140

Leu Arg Leu Gly Gln Ala Gln Gly Ser Leu Ser Phe Cys Met Leu Glu
145 150 155 160

Ala Ser Gln Asp Met Gly Arg Thr Leu Glu Trp Arg Pro Arg Thr Pro
165 170 175

Ala Leu Val Arg Gly Cys His Leu Glu Gly Val Ala Gly His Lys Glu
180 185 190

Ala His Ile Leu Arg Val Leu Pro Gly His Ser Ala Gly Pro Arg Thr
195 200 205

Val Thr Val Lys Val Glu Leu Ser Cys Ala Pro Gly Asp Leu Asp Ala
210 215 220

Val Leu Ile Leu Gln Gly Pro Pro Tyr Val Ser Trp Leu Ile Asp Ala
225 230 235 240

Asn His Asn Met Gln Ile Trp Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Phe Lys Ile
245 250 255

Phe Pro Glu Lys Asn Ile Arg Gly Phe Lys Leu Pro Asp Thr Pro Gln
260 265 270

Gly Leu Leu Gly Glu Ala Arg Met Leu Asn Ala Ser Ile Val Ala Ser
275 280 285

Phe Val Glu Leu Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Leu His Ala Ser Ser
290 295 300

Cys Gly Gly Arg Leu Gln Thr Ser Pro Ala Pro Ile Gln Thr Thr Pro
305 310 315 320

Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Met Ser Leu Ile Thr Gly
325 330 335

Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
340 345 350

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
355 360 365

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
370 375 380

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
385 390 395 400

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
405 410 415

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
420 425 430

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
435 440 445

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
450 455 460

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
465 470 475 480

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
485 490 495

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
500 505 510

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
515 520 525

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
530 535 540

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
545 550 555 560

Pro Gly Lys

<210> 36
<211> 550
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Glu Thr Val His Cys Asp Leu Gln Pro Val Gly Pro Glu Arg Asp Glu
1 5 10 15

Val Thr Tyr Thr Thr Ser Gln Val Ser Lys Gly Cys Val Ala Gln Ala
20 25 30

Pro Asn Ala Ile Leu Glu Val His Val Leu Phe Leu Glu Phe Pro Thr
35 40 45

Gly Pro Ser Gln Leu Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly
50 55 60

Thr Trp Pro Arg Glu Val Leu Leu Val Leu Ser Val Asn Ser Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu His Leu Gln Ala Leu Gly Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asn
85 90 95

Ser Ser Leu Val Thr Phe Gln Glu Pro Pro Gly Val Asn Thr Thr Glu
100 105 110

Leu Pro Ser Phe Pro Lys Thr Gln Ile Leu Glu Trp Ala Ala Glu Arg
115 120 125

Gly	Pro	Ile	Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	Leu	Asn	Asp	Pro	Gln	Ser	Ile	Leu	130	135	140	
Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gln	Gly	Ser	Leu	Ser	Phe	Cys	Met	Leu	Glu	145	150	155	160
Ala	Ser	Gln	Asp	Met	Gly	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Arg	Pro	Arg	Thr	Pro	165	170	175	
Ala	Leu	Val	Arg	Gly	Cys	His	Leu	Glu	Gly	Val	Ala	Gly	His	Lys	Glu	180	185	190	
Ala	His	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Pro	Gly	His	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	195	200	205	
Val	Thr	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Ser	Cys	Ala	Pro	Gly	Asp	Leu	Asp	Ala	210	215	220	
Val	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Tyr	Val	Ser	Trp	Leu	Ile	Asp	Ala	225	230	235	240
Asn	His	Asn	Met	Gln	Ile	Trp	Thr	Thr	Gly	Glu	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ile	245	250	255	
Phe	Pro	Glu	Lys	Asn	Ile	Arg	Gly	Phe	Lys	Leu	Pro	Asp	Thr	Pro	Gln	260	265	270	
Gly	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Arg	Met	Leu	Asn	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	275	280	285	
Phe	Val	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	Ile	Val	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Ser	290	295	300	
Cys	Gly	Gly	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Thr	Thr	Pro	305	310	315	320
Pro	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	325	330	335	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	340	345	350	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	355	360	365	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	370	375	380	

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
385 390 395 400

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
405 410 415

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
420 425 430

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
435 440 445

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
450 455 460

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
465 470 475 480

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
485 490 495

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
500 505 510

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
515 520 525

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
530 535 540

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545 550

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики фиброзного нарушения у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту эффективного количества эндоглинового полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 42-333 SEQ ID NO: 1.

2. Способ по п. 1, где фиброзное нарушение является фиброзом печени.

3. Способ по п. 2, где фиброз печени является циррозом печени, алкогольным фиброзом печени, повреждением желчных протоков, первичным биллиарным циррозом, инфекционным фиброзом печени, врожденным фиброзом печени или аутоиммунным гепатитом.

4. Способ по п. 4, где инфекционный фиброз печени является бактериально-индуцированным или вирусно-индуцированным.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где эндоглиновый полипептид не включает последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, начинающейся с аминокислоты, соответствующей любому из положений 26-42 SEQ ID NO: 1, и заканчивающейся аминокислотой, соответствующей любому из положений 333-378 SEQ ID NO: 1.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

- a. аминокислот 26-346 SEQ ID NO: 1,
- b. аминокислот 26-359 SEQ ID NO: 1, и
- c. аминокислот 26-378 SEQ ID NO: 1.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где эндоглиновый полипептид состоит из первой части, состоящей из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

- a. аминокислот 26-346 SEQ ID NO: 1,
- b. аминокислот 26-359 SEQ ID NO: 1, и

с. аминокислот 26-378 SEQ ID NO: 1

и второй части, являющейся гетерологичной SEQ ID NO: 1.

9. Способ по п. 8, где вторая часть эндоглинового полипептида содержит Fc-часть IgG.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где эндоглиновый полипептид является димером.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где эндоглиновый полипептид является гомодимером.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где эндоглиновый полипептид не включает более 50 последовательных аминокислот из последовательности, состоящей из аминокислот 379-586 SEQ ID NO: 1.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее 1×10^{-3} с⁻¹.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее 5×10^{-4} с⁻¹.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее 5×10^{-3} с⁻¹.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее $2,5 \times 10^{-3}$ с⁻¹.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где эндоглиновый полипептид не связывается с TGF-β1 человека, TGF-β3 человека, VEGF человека или основным фактором роста фибробластов человека (FGF-2).

18. Способ по любому из пп. 1-17, где эндоглиновый полипептид является слитым белком, включающим, помимо части,

содержащей аминокислотную последовательность эндоглина, одну или несколько полипептидных частей, повышающих одно или несколько: стабильность *in vivo*, время полужизни *in vivo*, захват/введение, локализацию или распределение в тканях, образование белковых комплексов и/или очистку.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где эндоглиновый полипептид включает часть, выбранную из группы, состоящей из: константного домена иммуноглобулина и сывороточного альбумина.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где эндоглиновый полипептид содержит домен Fc иммуноглобулина.

21. Способ по п. 20, где домен Fc иммуноглобулина соединяют с частью полипептида ENG посредством линкера.

22. Способ по п. 21, где линкер состоит из аминокислотной последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 31 (TGGG) или GGG.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где эндоглиновый полипептид включает один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из: гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с остатком липида, и аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватизирующим средством.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где эндоглиновый полипептид вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, подкожно или перорально.

По доверенности

**Аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 1 (L-ENG)
(GenBank NM_001114753)**

1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLOASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPF FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
241 SCAPGDLDV LILQGPPYVS WLIDANHHMQ IWTGGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEABDRG DKFVLRSAVS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDLSLF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFFVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLI SPSPEGDFRF SFLHFFYTVF
541 IPKTGTLST VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLF GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSHTRSP SKREPVVAVA APASSESSST NHSIGSTQST PCSTSSMA
(SEQ ID NO: 1)

ФИГ.1

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 1 (L-ENG)
(GenBank NM_001114753)

```

361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCCAGC GCACAGGCCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTTGCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
481 GTCTTGCAGA AACAGTCCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGGG CCCCGAGAGG GCGGAGGTGA
541 CATATACCAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCCAAT GCCATCCTTG
601 AAGTCCATGT CCTCTTCTTG GAGTTCCCAA CCGGCCCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCTC AGTGTAACAA
721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCCACT GCACTTGGCC TACAATTCCA
781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGGG TCAACACCAC AGAGCTGCCA TCCTTCCCCA
841 AGACCCAGAT CCTTGAGTGG GCAGCTGAGA GGGGCCCCAT CACCTCTGCT GCTGAGCTGA
901 ATGACCCCCA GAGCATCCTC CTCGACTGG GCCAAGCCCA GGGGTCACTG TCCTTCTGCA
961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGCA CGCTCGAGTG GCGGCCGCT ACTCCAGCCT
1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CCGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCCTGAGGG
1081 TCCTGCCGGG CCACTCGGCC GGGCCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCG
1141 CACCCGGGGA TCTCGATGCC GTCTTCATCC TCGAGGGTCC CCCCTACGTE TCCTGGCTCA
1201 TCGACGCCAA CCACAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCTTC AAGATCTTTC
1261 CAGAGAAAAA CATTCGTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTTCGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
1381 TCTCACTTCA TGCTCCAGC TGGCGTGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
1441 CCACTCCTCC CAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCAT GTCCTTGATC CAGACAAAGT
1501 GTGCCGACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTTGCGCAT TTGAAGTGCA
1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
1621 TTGTCTTGCG CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCAGGT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
1681 ATGAGGCGGT GGTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAAG GTGCACTGCC
1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCACAC TTCTCCAGG
1801 CCTCCAACAC CATCGAGCCG GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTCAGAGTG TCCCCATCCG
1861 TCTCCGAGTT CCTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
1921 CCGTGGAAC CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGAGCCTG CTGTCCCCAA
1981 GCCCCGAGGG TGACCCGCGC TTCAGCTTCC TCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACGGTAGCCC TGCGTCCCAA GACCGGGTCT CAAGACCAGG
2101 AAGTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTGA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
2161 CAAGCAAAGG CCTCGTCTTG CCCGCCGTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCTCATCG
2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACGCGTTCC CCCAGCAAGC
2281 GGGAGCCCGT GGTGGCGGTG GCTGCCCCGG CCTCCTCGGA GAGCAGCAGC ACCAACCACA
2341 GCATCGGGAG CACCCAGAGC ACCCCCTGCT CCACCAGCAG CATGGCATAG

```

(SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 2 (S-ENG)
(GenBank NM_000118)

1 MDRGTLPLAV ALLIASCSLS PTLAETVHC DLQVGPBERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPF FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
241 SCAPGDLDV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTGGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELFLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAF IQTTPFKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAVS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDLSLF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFFVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLI SPSPEGDFRF SFLHFFYTVF
541 IPKTGTLST VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLF GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSHTREY PRPPQ
(SEQ ID NO: 3)

ФИГ.3

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 2 (S-ENG)
(GenBank NM_000118)**

```

361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCCAGC GCACAGGCCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTTGCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
481 GTCTTGCAAG AACAGTCCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGGG CCCCAGAGAG GGCAGAGTGA
541 CATATACCAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGGCCCCAAT GCCATCCTTG
601 AAGTCCATGT CCTCTTCCTG GAGTTCCCAA CGGGCCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCCTC AGTGTAACA
721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCCACT GCACTTGGCC TACAATTCCA
781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGGG TCAACACCAC AGAGCTGCCA TCCTTCCCCA
841 AGACCCAGAT CCTTGAGTGG GCAGCTGACA GGGGCCCCAT CACCTCTGCT GCTGAGCTGA
901 ATGACCCCCA GAGCATCCTC CTCGACTGG GCCAAGCCCA GGGGTCACTG TCCTTCTGCA
961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGCA CGCTCGAGTG GCGGCCCGGT ACTCCAGCCT
1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CCGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCCTGAGGG
1081 TCCTGCCGGG CCACTCGGCC GGGCCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCG
1141 CACCCGGGGA TCTCGATGCC GTCCTCATCC TGCAGGGTCC CCCCTACGTG TCCTGGCTCA
1201 TCGACGCCAA CCACAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCTTC AAGATCTTTC
1261 CAGAGAAAAA CATTCGTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTTCGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
1381 TCTCACTTCA TGCCTCCAGC TGGGTTGGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
1441 CCACTCCTCC CAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCAT GTCCTTGATC CAGACAAAGT
1501 GTGCCGACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTTCGCGAT TTGAAGTGCA
1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
1621 TTGTCTTGCG CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCAGGT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
1681 ATGAGGCGGT GGTCAATATC CTGTGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAAG GTGCACTGCC
1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCACAC TTCCTCCAGG
1801 CCTCCAACAC CATCGAGCCG GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTGAGAGTG TCCCATCCG
1861 TCTCCGAGTT CCTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
1921 CCGTGGAAGT CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGAGCCTG CTGTCCCCAA
1981 GCCCCGAGGG TGACCCGCGC TTCAGCTTCC TCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACGGTAGCCC TGGTCCCAA GACCGGGTCT CAAGACCAGG
2101 AAGTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTGA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
2161 CAAGCAAAGG CCTGCTCCTG CCCGCCGTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCCTCATCG
2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACGCGTGAG TACCCAGGC
2281 CCCCACAGTG A

```

(SEQ ID NO: 4)

Аминокислотная последовательность ENG мыши, изоформа 1 (L-ENG)
(GenBank NM_007932)

```

1  MDRGVLPPLPI TLLFVIYSFV PTTGLAERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGCVAQAAN
61  AVREVVHVLFL DFPGLMLSHLE LTLQASKQNG TETQEVFLVL VSNKNVFKF QAPEIPLHLA
121 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
181 PFLCLPEAHK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVM
241 ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI
301 AEARKLNASI VTSFVELFLV SNVSLRASSC GGVFQTPAP VVTTPPKDTC SPVLLMSLIQ
361 PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV
421 VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSE QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS
481 PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPFR SFLLRVYMP
541 TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NIVSPDLGK GLVLPSVLGI TFGAFLIGAL
601 LTAALWYIYS HTRGPSKREP VVAVAAPASS ESSSTNHSIG STQSTPCSTS SMA
      (SEQ ID NO: 5)

```

ФИГ.5

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 1 (L-ENG)
(GenBank NM_007932)**

```

361 AGCATGGACC GTGGCGTGCT CCCTCTGCCC ATTACCCTGC TGTTCGTCAI CTATAGCTTT
421 GTACCCACA CAGGTCTCGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCACAC
481 AGGGGTGAGG TGACGTTTAC CACCAGCCAG GTCTCCGAGG GCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCCTCTC CTGGATTTTC CCGGAATGCT GTCACATCTG
601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCCTGGTC
661 CTCGTTTCGA AAAAAATGT CTTCGTGAAG TTCCAGGCCC CGGAAATCCC ATTGCACTTG
721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCAACAT CACAGTGCTA
781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCCAAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
901 GCACCATTCT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
961 CCACGAGCCC AGACCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGAAG GTGTGTCTGG CCACAAGGAG
1021 GCCTACATCC TGAGGATCCT GCCAGGTTCT GAGGCCGGGC CCCGACGGT GACCGTAATG
1081 ATGGAAGTGA GTTGACATC TGGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
1141 TCCTGGTTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
1201 AAGATCTTTC CAGGAAGCAA GGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
1261 ATAGCGGAGG CCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTCACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCCTCCAGC TCGGTTGGTG TGTCCAGAC CACCCCTGCA
1381 CCCGTTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGCCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
1441 CAGCCAAAGT GTGGCAATCA GGTCACTGACT CTGGCACTCA ATAAAAACA CGTGCAGACT
1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
1561 GACGACCATC TTGTCTGAG TAGCGCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAAG
1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCCCAC
1741 TTCCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
1861 GAAGGGGACA TGGTGGAAGT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCTCCGGGT CTACATGGTG
1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGTC
2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCCG CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
2101 AAAGGCCTTG TCCTGCCCTC TGTACTGGGT ATCACCTTTG GTGCCTTCCT GATTGGGGCC
2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGCCCCCAG CAAGCGGGAG
2221 CCCGTGGTGG CAGTGGCTGC CCCGGCCTCC TCTGAGAGCA GCAGTACCAA CCACAGCATC
2281 GGGAGACCCC AGAGCACCCC CTGCTCCACC AGCAGCATGG CGTAG

```

(SEQ ID NO: 6)

Аминокислотная последовательность ENG мыши, изоформа 2 (S-ENG)
(GenBank NM_001146350)

```
1  MDRGVLPLPI  TLLFVIYSFV  PTTGLAERVG  CDLQPVDPTR  GEVTFTTSQV  SEGCVAQAAN
61  AVREHVHVLFL  DFPGLSHLE  LTLOASKQNG  TETQEVFLVL  VSNKNVFKF  QAPEIPLHLA
121 YDSSLVIFQG  QPRVNITVLP  SLTSRKQILD  WAATKGAITS  IAALDDPQSI  VLQLGQDPKA
181 PFLCLPEAHK  DMGATLEWQP  RAQTPVQSCR  LEGVSGHKEA  YILRILPGSE  AGPRTVTVM
241 ELSCTSGDAI  LILHGPPYVS  WFIDINHSMQ  ILTTGEYSVK  IFPGSKVKGV  ELPDTPQGLI
301 AEARKLNASI  VTSFVELFLV  SNVSLRASSC  GGVFQTTPAP  VVTTPPKDTC  SFVLLMSLIQ
361 PKCGNQVMTL  ALNKKHVQTL  QCTITGLTFW  DSSCQAEDTD  DHLVLSSAYS  SCGMKVTAHV
421 VSNEVIISFP  SGSPPLRKKV  QCIDMDSLSE  QLGLYLSPHF  LQASNTIELG  QQAFVQVSVS
481 PLTSEVTVQL  DSCHLDLGPE  GDMVELIQSR  TAKGSCVTLL  SPSPEGDPRE  SFLLRVYMP
541 TPTAGTLSCN  LALRPSTLSQ  EVYKTVSMRL  NIVSPDLGK  GLVLPSVLGI  TFGAFLIGAL
601 LTAALWYIYS  HTREYPKPPP  HSHSKRSGPV  HTTPGHTQWS  L
      (SEQ ID NO: 7)
```

ФИГ.7

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 2 (S-ENG)
(GenBank NM_001146350)**

```

361 AGCATGGACC GTGGCGTGCT CCCTCTGCCC ATTACCCTGC TGTTCGTCAT CTATAGCTTT
421 GTACCCACAA CAGGTCTCGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCACAA
481 AGGGGTGAGG TGACGTTTAC CACCAGCCAG GTCTCCGAGG GCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCTCTTC CTGGATTTTC CCGGAATGCT GTCACATCTG
601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCCTGGTC
661 CTCGTTTCGA ACAAAAATGT CTTCGTGAAG TTCCAGGCCC CGGAAATCCC ATTGCACTTG
721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCAACAT CACAGTGCTA
781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCCAAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
901 GCACCATCTT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
961 CCACGAGCCC AGACCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGAAG GTGTGTCTGG CCACAAGGAG
1021 GCCTACATCC TGAGGATCCT GCCAGGTTCT GAGGCCGGGC CCCGGACGGT GACCGTAATG
1081 ATGGAAGTGA GTTGACATC TGGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
1141 TCCTGGTTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
1201 AAGATCTTTC CAGGAAGCAA GGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
1261 ATAGCGGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTCACCT CTTTGTAGA GCTCCCTCTG
1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCCTCCAGC TGCGGTGGTG TGTTCAGAC CACCCCTGCA
1381 CCCGTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGCCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
1441 CAGCCAAAGT GTGGCAATCA GGTCACTGACT CTGGCACTCA ATAAAAACA CGTGCAGACT
1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
1561 GACGACCATC TTGTCTGAG TAGCGCCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAAG
1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCGCAC
1741 TTCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTGGGGCCCC
1861 GAAGGGGACA TGGTGGAAGT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCTCCGGGT CTACATGGTG
1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGTCC
2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCGC CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
2101 AAAGGCCTTG TCCTGCCCTC TGTACTGGGT ATCACCTTTG GTGCCTTCCT GATTGGGGCC
2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGAGTATCC CAAGCCTCCA
2221 CCCCATTCCC ACAGCAAGCG CTCAGGGCCC GTCCACACCA CCCCAGGGCA CACCCAGTGG
2281 AGCCTCTGA

```

(SEQ ID NO: 8)

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG человека

ETVHC DLQVGPARG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
ILEVHVLFLE FPGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLQQAQGSLS
FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPQHSAG PRTVTVKVEL
SCAPGDLDAV LILQPPYVS WLIDANHNMQ IWTGGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAYS SCGMQVSASM
ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS
PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLI SPSPEGDPRE SPLHFTYTP
IPKTGTLSCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLI GCTSKG (SEQ ID NO: 9)

ФИГ.9

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG мыши

```

          ERVG CDLPVDPTR GEVTFFTSQV SEGCVAQAAN
AVREHVHVLFL DFPGLSHLE LTLQASKQNG TETREVFLVL VSNKNVFKF QAFEIFLHLA
YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
PFLCLPEAHK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRLPGSE AGPRTVTVM
ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKG V ELPDTPQGLI
AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLRASSC GGVFQTPAP VVTTPPKDTC SPVLLMSLIQ
PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV
VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSE QGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS
PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEG DPRF SFLLRVYMP
TPTAGTLCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NVVSPDLGK G          (SEQ ID NO: 10)

```

ФИГ.10

Аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека

```

1   GGPKSCDKTH TCPPCPAFEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
61  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK
121 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
181 PPVLDSGSGF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 11)

```

ФИГ.11

Аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека, укороченного с N-конца

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
61  EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
121 PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
181 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
(SEQ ID NO: 12)

```

ФИГ.12

Аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SP~~CA~~ETVHCD LQVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSOLELT LOASKQNGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSE PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRP RTP
 201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLD AVL
 251 ILOGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
 301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKD TCS
 351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
 401 KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
 451 IGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG
 501 GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV
 551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISPDLSG CTSK~~GT~~GGP KSCDKTHTCP
 601 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 651 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDWLNGK EYKCKVSNKA
 701 LPAPIERTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 751 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFPLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
 801 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 16)

ФИГ.13

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-586)-hFc

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTCAGCCTG
101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
   GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
201 CCTGGAGTTC CCAACGGGGC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
   CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
   GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
   GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
   AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGGC GCGTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
   GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGGCC CGGACGGTGA
701 CGGTGAAGGT GGAAGTGAAG TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
   ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
   AAAACATTCT TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
   GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTTGTAGC
   CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACGACGCCAT
1101 GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTGTC GCATTGAAG TGCACCATCA
   CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201 AAGTTTGTCT TGGCCAGTGC TTAATCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
   AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTGC AGCTCATCAC
1301 CACAGCGGAA AAAGGTGCAC TGCCTCAACA TGGACAGCCT CTCTTTCCAG
   CTGGGCCCTCT ACCTCAGCCC AACTTCCTC CAGGCCTCCA ACACCATCGA
1401 GCCGGGGCAG CAGAGCTTTG TGCAGGTCAG AGTGTCCTCA TCCGTCCTCG
   AGTTCCTGCT CCAGTTAGAC AGCTGCCACC TGGACTTGGG GCCTGAGGGA
1501 GGCACCGTGG AACTCATCCA GGGCCGGGCG GCCAAGGGCA ACTGTGTGAG
   CCTGCTGTCC CCAAGCCCCG AGGGTGACCC GCGCTTCAGC TTCTCCTCC
1601 ACTTCTACAC AGTACCCATA CCCAAAACCG GCACCTCAG CTGCACGGTA
   GCCCTGCGTC CCAAGACCGG GTCTCAAGAC CAGGAAGTCC ATAGGACTGT
1701 CTTTCATGCGC TTGAACATCA TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT TGCACAAGCA
   AAGGCACCGG TGGTGGACCC AAATCTGTG ACAAACTCA CACATGCCCC
1801 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
   CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT

```

1901 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
2001 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGTCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
2101 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
AGAACCACAG GTGTACACCC TCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA
2201 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
2301 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAT AGCAAGCTCA
CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
2401 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
CCCCGGTAAA TGA
(SEQ ID NO: 17)

ФИГ.14
продолжение

**Аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc с укороченным
с N-конца доменом Fc**

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQVGP ERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSOLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFOEPP GVNTTELP SF PKTOILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPOSILLR LGQAQGSLSF CMLEASODMG RTLEWRP RTP
 201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
 251 ILQGPYVSW LIDANHNMOI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
 301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTS PAPI OTTPPKDTCS
 351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
 401 KFLVRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
 451 LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLOLD SCHLDLGPEG
 501 GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDP RFS FLLHFYTVPI PKTGTL SCTV
 551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISFDLSG CTSKG TGGGT HTCPPCPAPE
 601 LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
 651 VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
 701 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 751 NGQFENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 801 NHYTQKSLSL SP GK

(SEQ ID NO: 18)

ФИГ.15

Аминокислотная последовательность mENG(27-581)-mFc

1 MDAMKRG LCC VLLLCGAVFV SPGGGERV GCD LQVDPTRGE VTFTTSQVSE
 51 GCVAQAANAV REVHVLF LDF PGMLSHLELT LQASKQNGTE TOEVFLVLVS
 101 NKNVFVKFQA PEIPLHLAYD SSLVIFQGQP RVNITVLP SL TSRKQILDWA
 151 ATKGAITSIA ALDDPQSIVL QLGQDPKAPF LCLPEAHKDM GATLEWQ PRA
 201 QTPVQSCRLE GVS GHKEAYI LRILPGSEAG PRTVTVM MEL SCTSGDAILI
 251 LHGPPYVSWF IDINHSMQIL TTGEYSVKIF PGSKVKGVEL PDTPQGLIAE
 301 ARKLNASIVT SFVELPLVSN VSLRASSCGG VFQTPAPVV TTPPKDTCSP
 351 VLLMSLIQPK CGNQVMTLAL NKKHVQTLQC TITGLTFWDS SCQAEDTDDH
 401 LVLSSAYSSC GMKVTAHVVS NEVIISFPSG SPPLRKKVQC IDMDSLSFQL
 451 GLYLSPHFLO ASNTIELGQQ AFVQVSVSPL TSEVTVQLDS CHLDLGPEGD
 501 MVELIQSR TA KGSCVTLLSP SPEGDPRFSF LLRVYMVPTP TAGTILSCNLA
 551 LRPSTLSQEV YKTVSMRLNI VSPDLGKCT GGGEPRVPIT QNPCPPLKEC
 601 PPCAAPDLLG GPSVFIFPPK IKDVLMISLS PMVTCVVVDV SEDDPDVQIS
 651 WFNNNVEVHT AQTQTHREDY NSTLRVVSAL PIQHQDWMSG KEFKCKVNNR
 701 ALPSPIEKTI SKPRGPVRAP QVYVLP PPAE EMTKKEFSLT CMITGFLPAE
 751 IAVDWTSNGR TEQNYKNTAT VLDSDCSYFM YSKLRVQKST WERGS LFACS
 801 VVHEGLHNL TTKTISRSLG K

(SEQ ID NO: 19)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая mENG(27-581)-mFc

```

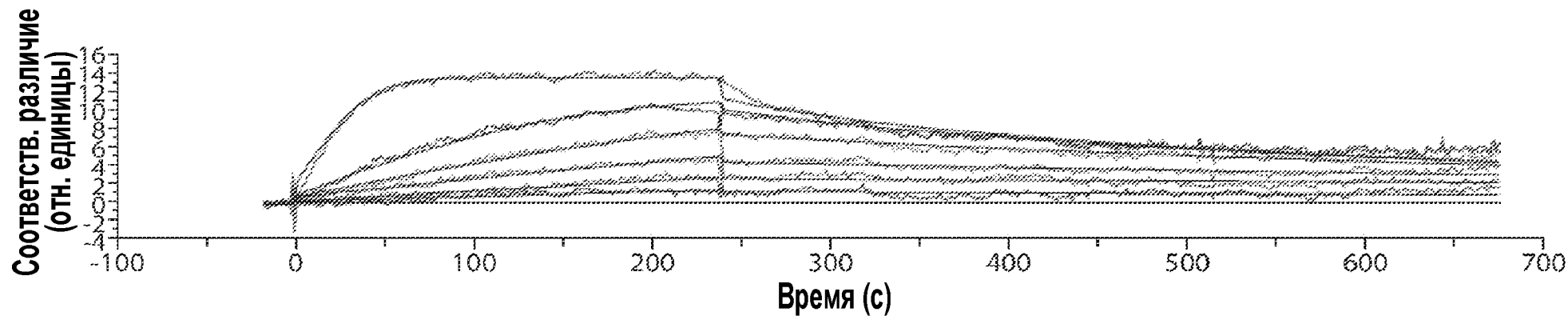
1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG GGAAGAGT CGGCTGTGAT CTACAGCCTG
101 TGGACCCAC AAGGGGTGAG GTGACGTTTA CCACCAGCCA GGTCTCCGAG
   GGCTGTGTAG CTCAGGCTGC CAATGCTGTG CGTGAAGTCC ACGTTCTCTT
201 CCTGGATTTT CCCGGAATGC TGTACATCTT GGAGCTGACT CTTCAGGCAT
   CCAAGCAAAA TGGCACGGAG ACCCAGGAGG TGTTCCTGGT CCTCGTTTCG
301 AACAAAAATG TCTTCGTGAA GTTCCAGGCC CCGGAAATCC CATTGCACTT
   GGCCTACGAC TCCAGCCTGG TCATCTTCCA AGGACAGCCA AGAGTCAACA
401 TCACAGTGCT ACCATCCCTT ACCTCCAGGA AACAGATCCT CGACTGGGCA
   GCCACCAAGG GCGCCATCAC CTCGATAGCA GCACTGGATG ACCCCCAAAG
501 CATCGTCCTC CAGTTGGGCC AAGACCCAAA GGCACCATTC TTGTGCTTGC
   CAGAAGCTCA CAAGGACATG GCGGCCACAC TTGAATGGCA ACCACGAGCC
601 CAGACCCCAG TCCAAAGCTG TCGCTTGGAA GGTGTGTCTG GCCACAAGGA
   GGCCTACATC CTGAGGATCC TGCCAGGTTT TGAGGCCGGG CCCCAGACGG
701 TGACCGTAAT GATGGAAGTG AGTTGCACAT CTGGGGACGC CATTCTCATC
   CTGCATGGTC CTCCATATGT CTCCTGGTTC ATCGACATCA ACCACAGCAT
801 GCAGATCTTG ACCACAGGTG AATACTCCGT CAAGATCTTT CCAGGAAGCA
   AGGTCAAAGG CGTGGAGCTC CCAGACACAC CCCAAGGCCT GATAGCGGAG
901 GCCCAGCAAG TCAATGCCAG CATTGTCACC TCCTTTGTAG AGCTCCCTCT
   GGTACGCAAT GTCTCCCTGA GGGCCTCCAG CTGCGGTGGT GTGTTCCAGA
1001 CCACCCCTGC ACCCGTTGTG ACCACACCTC CCAAGGACAC ATGCAGCCCC
   GTGCTACTCA TGTCCCTGAT CCAGCCAAAG TGTGGCAATC AGGTATGAC
1101 TCTGGCACTC AATAAAAAAC ACGTGCAGAC TCTCCAGTGC ACCATCACAG
   GCCTGACTTT CTGGGACTCC AGCTGCCAGG CTGAAGACAC TGACGACCAT
1201 CTTGTCTCTG GTAGCGCCTA CTCCAGCTGC GGCATGAAAG TGACAGCCCA
   TGTGGTCAGC AATGAGGTGA TCATCAGTTT CCGTCAGGC TCACCACCAC
1301 TTCGGAAAAA GGTACAGTGC ATCGACATGG ACAGCCTCTC CTTCAGCTG
   GGCCTCTACC TCAGCCCGCA CTTCTCCAG GCATCCAACA CCATCGAACT
1401 AGGCCAGCAG GCCTTCGTAC AGGTGAGCGT GTCTCCATTG ACCTCTGAGG
   TCACAGTCCA GCTAGATAGC TGCCATCTGG ACTTGGGGCC CGAAGGGGAC
1501 ATGGTGGAAC TCATCCAGAG CCGAACAGCC AAGGGCAGCT GTGTGACCTT
   GCTGTCTCCA AGCCCTGAAG GTGACCCACG CTTGAGCTTC CTCCTCCGGG
1601 TCTACATGGT GCCACACCC ACCGCTGGCA CCCTCAGTTG CAACTTAGCT
   CTGCGCCCTA GCACCTTGTC CCAGGAAGTC TACAAGACAG TCTTCATCTT
1701 CCTGAACATC GTCAGCCCTG ACCTGTCTGG TAAAGGCACC GGTGGGGGTG
   AGCCAGAGT GCCATAACA CAGAACCCTT GTCCTCCACT CAAAGAGTGT
1801 CCCCATGCG CAGCTCCAGA CCTCTGGGGT GGACCATCCG TCTTCATCTT
   CCTCCAAAG ATCAAGGATG TACTCATGAT CTCCCTGAGC CCCATGGTCA

```

1901 CATGTGTGGT GGTGGATGTG AGCGAGGATG ACCCAGACGT CCAGATCAGC
TGGTTTGTGA ACAACGTGGA AGTACACACA GCTCAGACAC AAACCCATAG
2001 AGAGGATTAC AACAGTACTC TCCGGGTGGT CAGTGCCCTC CCCATCCAGC
ACCAGGACTG GATGAGTGGC AAGGAGTTCA AATGCAAGGT CAACAACAGA
2101 GCCCTCCCAT CCCCCATCGA GAAAACCATC TCAAAACCCA GAGGGCCAGT
AAGAGCTCCA CAGGTATATG TCTTGCCCTCC ACCAGCAGAA GAGATGACTA
2201 AGAAAGAGTT CAGTCTGACC TGCATGATCA CAGGCTTCTT ACCTGCCGAA
ATTGCTGTGG ACTGGACCAG CAATGGGCGT ACAGAGCAAA ACTACAAGAA
2301 CACCGCAACA GTCCTGGACT CTGATGGTTC TTACTTCATG TACAGCAAGC
TCAGAGTACA AAAGAGCACT TGGGAAAGAG GAAGTCFTTT CGCCTGCTCA
2401 GTGGTCCACG AGGGTCTGCA CAATCACCTT ACGACTAAGA CCATCTCCCG
GTCTCTGGGT AAATGA
(SEQ ID NO: 20)

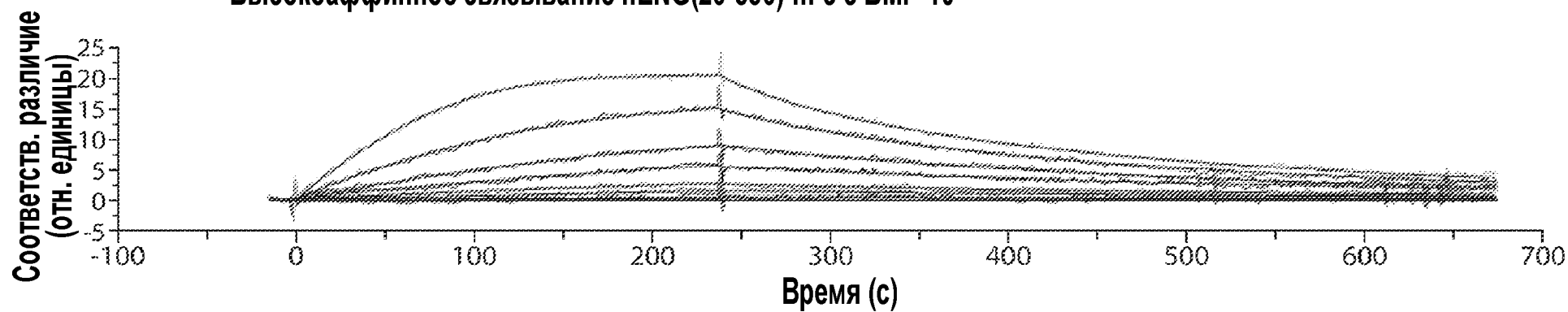
ФИГ.17
продолжение

Высокоаффинное связывание hENG(26-586)-hFc с BMP-9



ФИГ.18

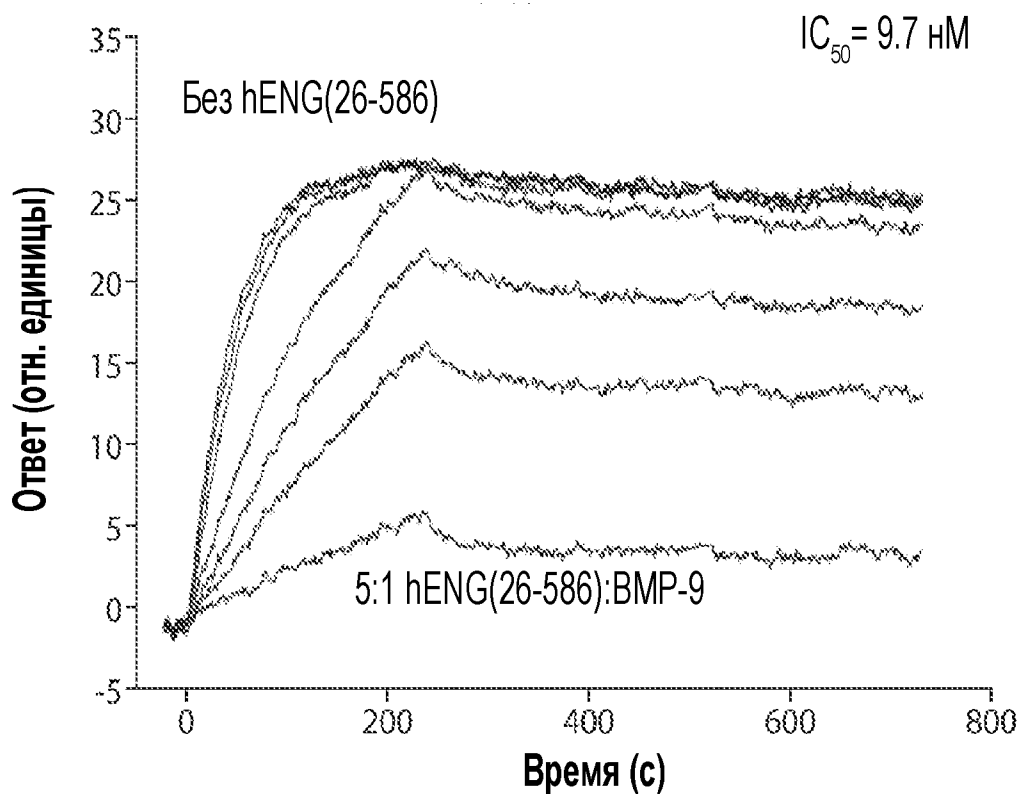
Высокоаффинное связывание hENG(26-586)-hFc с BMP-10



ФИГ.19

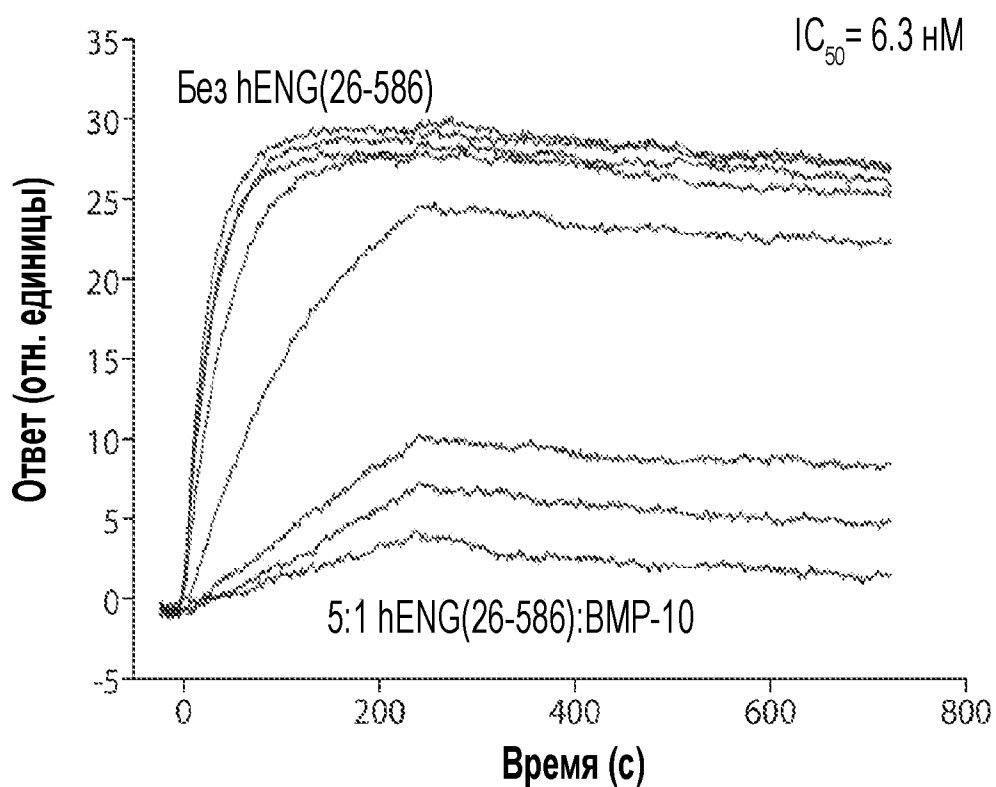
20/43

**Эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586),
в отношении связывания BMP-9 с ALK1**



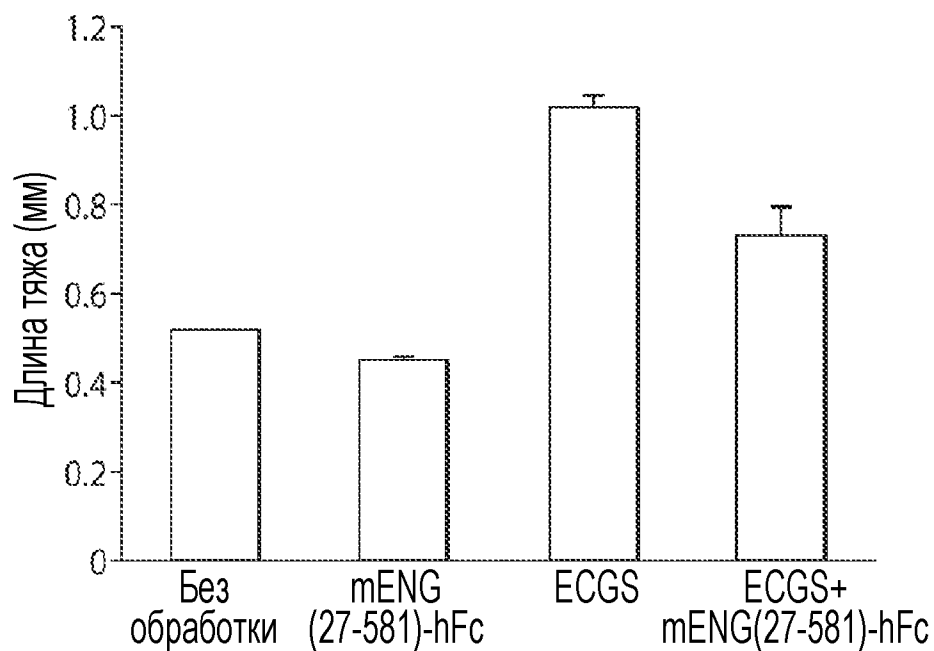
ФИГ.20

**Эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586),
в отношении связывания BMP-10 с ALK1**



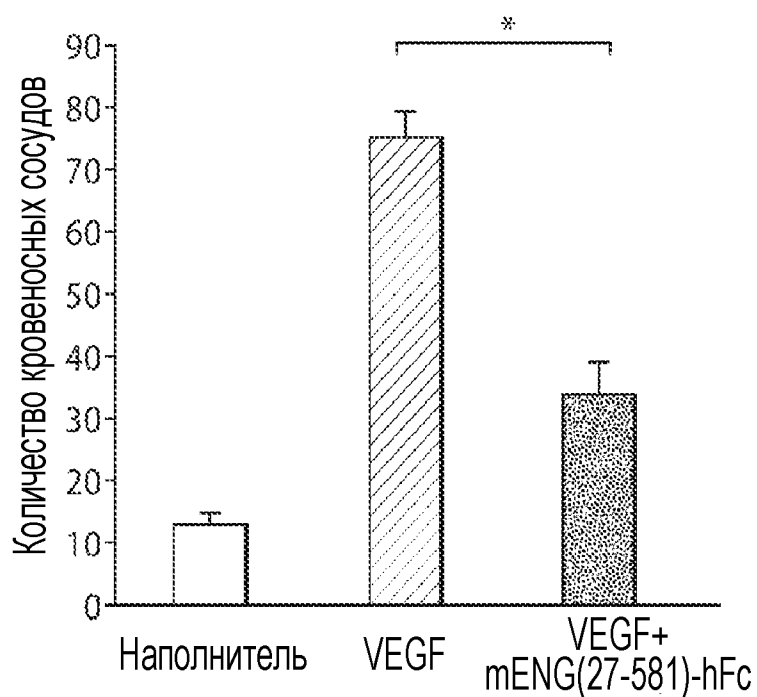
ФИГ.21

Эффект mENG(27-581)-hFc в отношении образования тяжа эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) в культуре



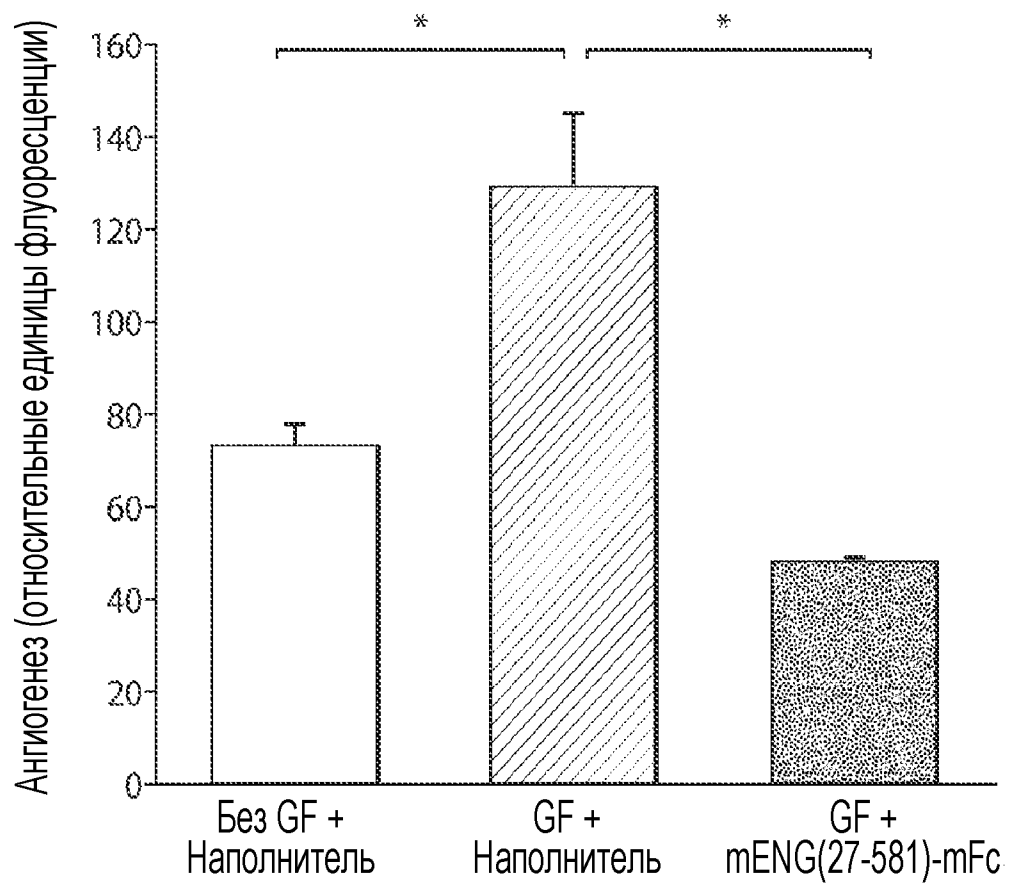
ФИГ.22

mENG(27-581)-hFc ингибирует ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе CAM



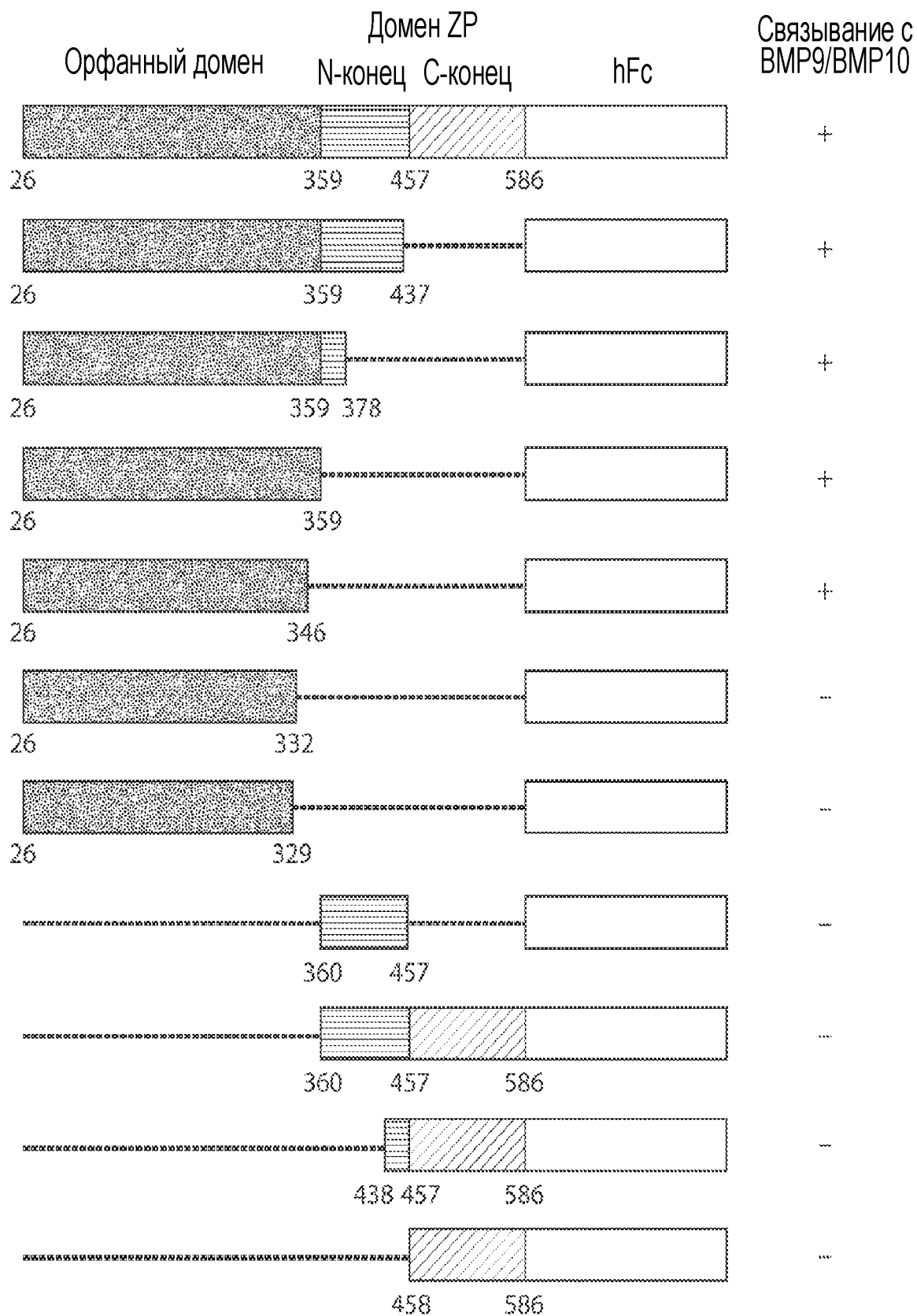
ФИГ.23

Эффект mENG(27-581)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого факторами роста, в анализе ангиореактора мыши



ФИГ.24

Схематическое сравнение выбранных укороченных конструкций hENG



ФИГ.25

Аминокислотная последовательность hENG(26-437)-hFc

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SP~~CA~~ETVHCD LOPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPF GVNTTELPF PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF
 201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL
 251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
 301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSAPFI QTTTPKDTCS
 351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
 401 KFLVRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRT~~TC~~GG PKSCDKTHTC
 451 PPCPAPELLG GPSVFLEPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
 501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
 551 ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD
 601 IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
 651 VMHEALHNNY TQKSLSLSPG K
 (SEQ ID NO: 21)

ФИГ.26

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-437)-hFc

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTCAGCCTG
101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
   GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCTCTTT
201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
   CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCT
   GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
   GAGAGGGGGC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
   AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCCTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
   GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGGCC CGGACGGTGA
701 CGGTGAAGGT GGAAGTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
   ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCTTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
   AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
   GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
   CCGGAGCTGC TCATGTCTTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACCACGCCAT
1101 GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTGTC GCATTGAAG TGCACCATCA
   CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201 AAGTTTGTCT TGCGCAGTGC TTAATCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
   AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTGC AGCTCATCAC
1301 CACAGCGGAC CGGTGGTGGA CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC
   CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
1401 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
   CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
1501 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA
   GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTCTG
1601 ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
   GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
1701 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
   AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
1801 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
   CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC
1901 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
   GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
2001 GTCCCCGGGT AAATGA

```

(SEQ ID NO: 22)

Аминокислотная последовательность hENG(26-378)-hFc

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SP~~CA~~ETVHCD LQVGP~~ER~~DE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSOLELT LOASKONGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFOEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF
 201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDVAVL
 251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRCFK LPDTPQGGLG
 301 EARMNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSAPAI QTTPPKDTCS
 351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVA~~TGG~~ ~~Q~~THTCPPCPA PELLGGPSVF
 401 LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 451 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG
 501 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
 551 KTTPEVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 601 SLSPGK

(SEQ ID NO: 23)

ФИГ.28

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-378)-hFc

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT CTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
61  TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG TGGGCCCCGA GAGGGACGAG
121  GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
181  CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
241  CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301  AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT GGCTTACAAT
361  TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
421  CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
481  CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC
541  TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601  GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
661  AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAAGTGAGC
721  TGGCGACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTTC ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTTGG
781  CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
841  TTTCCAGAGA AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901  GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
961  ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021  CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC CCGGAGCTGC TCATGTCTTT GATCCAGACA
1081  AAGTGTGCCG ACGACGCCAT GACCTTGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTGTC GACCGGTGGT
1141  GGAACTCACA CATGCCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
1201  CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGCG
1261  GTGGTGCTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
1321  GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
1381  GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
1441  AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1501  CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC
1561  CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCA CCGACATCGC CGTGGAGTGG
1621  GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACACT AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGAC
1681  GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1741  GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1801  TCCCTGTCCC CGGGTAAATG A

```

(SEQ ID NO: 24)

Аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SP~~GA~~ETVHCD LQVGP~~PER~~DE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFOEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LQQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF
 201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
 251 ILOGPPYVSW LIDANHHMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
 301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSAPAI QTPPKDTCF
 351 PELLMSLI~~TC~~ GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 401 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 451 VLTIVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 501 REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 551 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLF PGK

(SEQ ID NO: 25)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTTCAGCCTG
101 TGGGCCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
   GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
201 CCTGGAGTTC CCAACGGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
   CCAAGCAAAA TGGCACCTEG CCCCAGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
   GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
   GAGAGGGGGC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
   AAGCCAGCCA GGACATGGEC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601 GCCTTGCTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
   GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
701 CGGTGAAGGT GGAAGTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTCTC
   ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
   AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
   GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
   CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCACCGT GGTGGACCCA AATCTTGTGA
1101 CAAAACACAC ACATGCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
   CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC
1201 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
   TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
1301 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
   GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGA CTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
1401 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
   AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC
1501 CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG
   CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
1601 AGAACAAC TAAGACCACG CCTCCCCTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
   TTCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
1701 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
   AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC CCGGGTAAAT GA

```

(SEQ ID NO: 26)

**Аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc
с укороченным с N-конца доменом Fc**

```

1  MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPCAETVHCD LOPVGPERDE VTYTTSQVSK
51  GCVAQAFNAI LEVHVLFLEF PTGPSOLELT LQASKONGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSE PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LQQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILOGPPYVSW LIDANHNMQI WFTGEYSFKI FPEKNIRGEK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPIPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLITG GGTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
401 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
451 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
501 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
551 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

```

(SEQ ID NO: 27)

ФИГ.32

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc с
укороченным с N-конца доменом Fc**

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
   GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCCTCTT
201 CCTGGAGTTC CCAACGGGGC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
   CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
   GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
   GAGAGGGGGC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
   AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGGC GCGTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCCGCC ACAAGGAGGC
   GCACATCCTG AGGCTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGCTGA
701 CGGTGAAGGT GGAAGTGAGC TGCCGACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
   ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCTTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
   AAAACATTCTG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGCCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
   GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
   CCGGAGCTGC TCATGTCTTT GATCACCGGT GGTGGACTC ACACATGCCC
1101 ACCGTGCCCC GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC
   CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTCACA
1201 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
   GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
1301 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGCTCA GCGTCCTCAC CGTCTGCAC
   CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
1401 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC
   GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGGAGGA GATGACCAAG
1501 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
   CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
1601 CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA TAGCAAGCTC
   ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT
1701 GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT
   CCCCGGGTAA ATGA

```

(SEQ ID NO: 28)

**Аминокислотная последовательность hENG(26-346)-hFc с
укороченным с N-конца доменом Fc**

```

1  MDANKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
51  GCVAQAFNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKONGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPF GVNTTELPSE PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LQQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTF
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPIVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSAPI QTPPTTCGGT
351 HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
401 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
451 SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
501 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
551 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

```

(SEQ ID NO: 29)

ФИГ.34

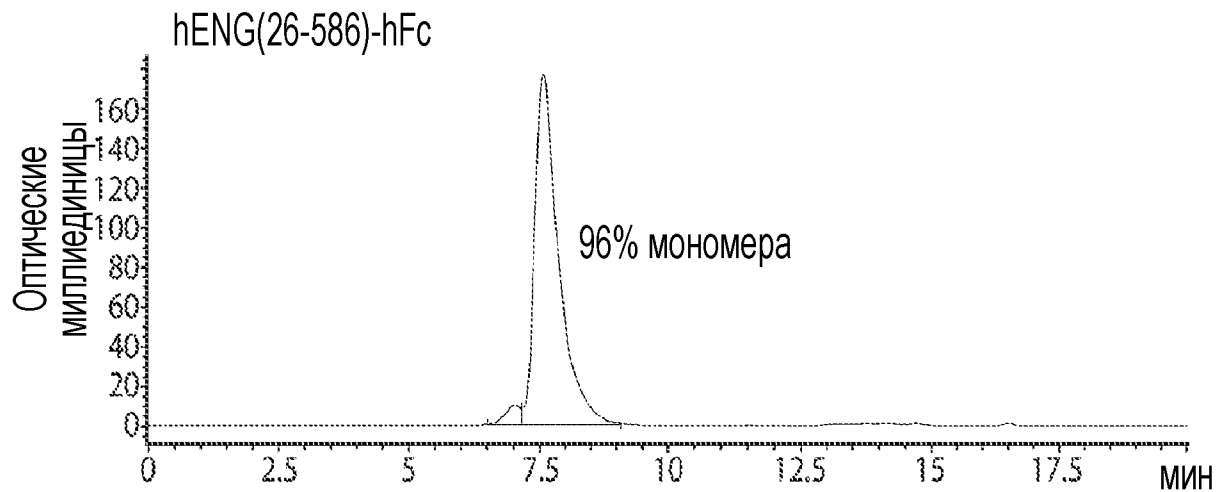
**Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-346)-hFc с
укороченным с N-конца доменом Fc**

```

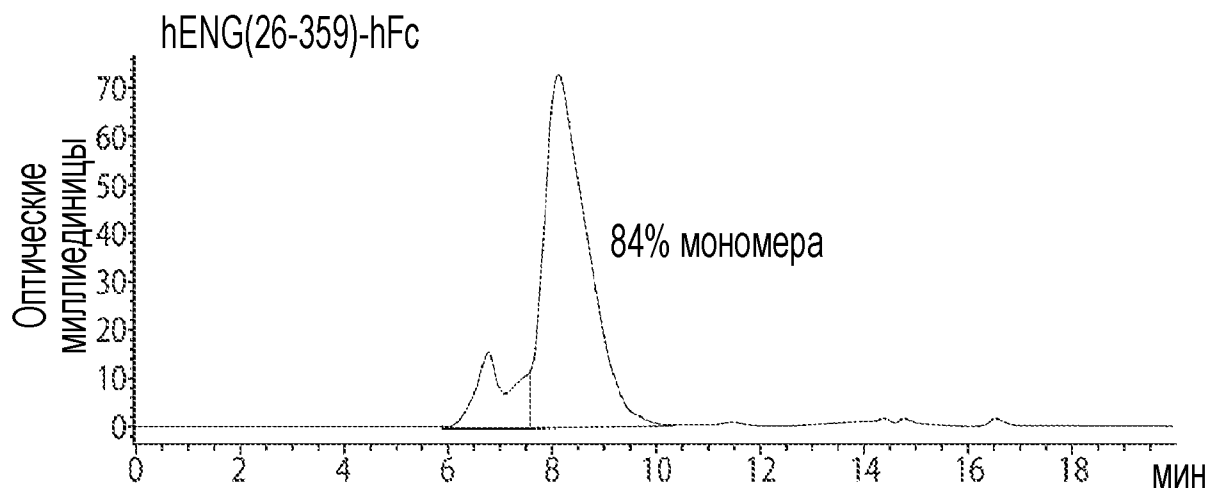
1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
61  TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG TGGGCCCCGA GAGGGACGAG
121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
181 CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGAG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT GGCCTACAAT
361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
421 CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC
541 TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
601 GCCTTGSTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
661 AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGGCGGGCCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAAGTGAAG
721 TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTTC ATCCTGCAGG GTCCCCCTA CGTGTCTCTG
781 CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
841 TTTCCAGAGA AAAACATTCTG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
961 ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021 CAGACCACTC CTCCCACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
1081 CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTCTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
1141 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
1201 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
1261 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
1321 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
1381 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
1441 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
1501 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
1561 ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCTT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1621 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1681 AACCACCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGGTA AATGA

```

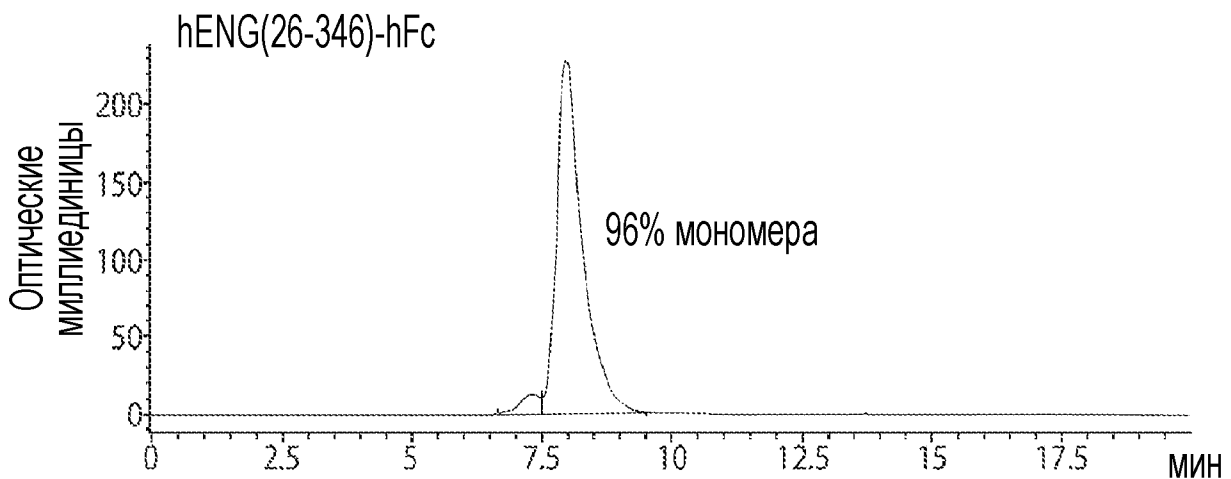
(SEQ ID NO: 30)

Эксклюзионная хроматограмма белков hENG-hFc после начальной очистки

ФИГ.36А

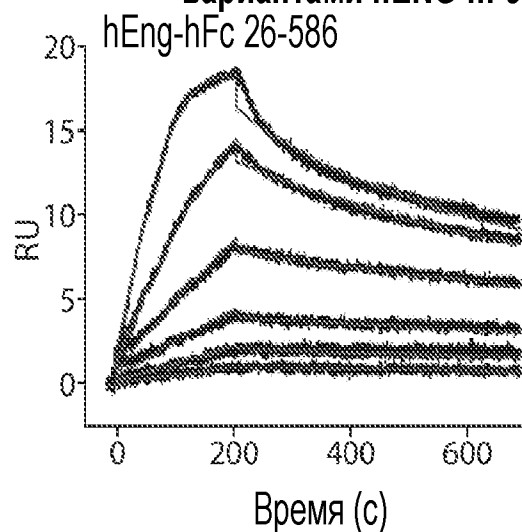
Эксклюзионная хроматограмма белков hENG-hFc после начальной очистки

ФИГ.36В

Эксклюзионная хроматограмма белков hENG-hFc после начальной очистки

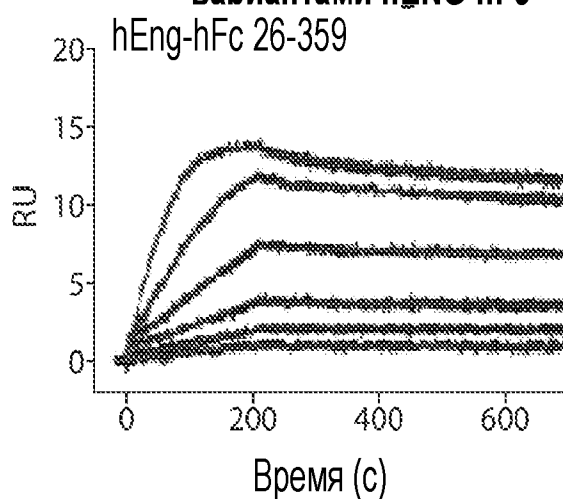
ФИГ.36С

Определение характеристик высокоаффинного связывания BMP-9 с вариантами hENG-hFc



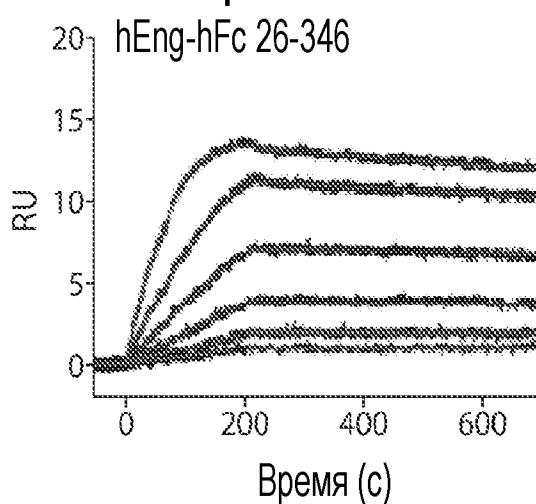
ФИГ.37А

Определение характеристик высокоаффинного связывания BMP-9 с вариантами hENG-hFc



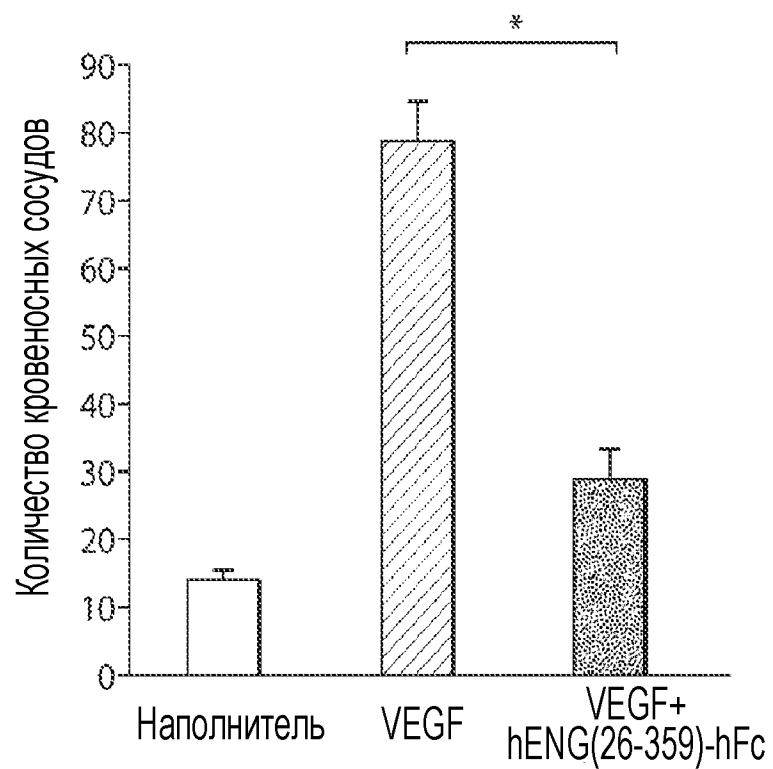
ФИГ.37В

Определение характеристик высокоаффинного связывания BMP-9 с вариантами hENG-hFc



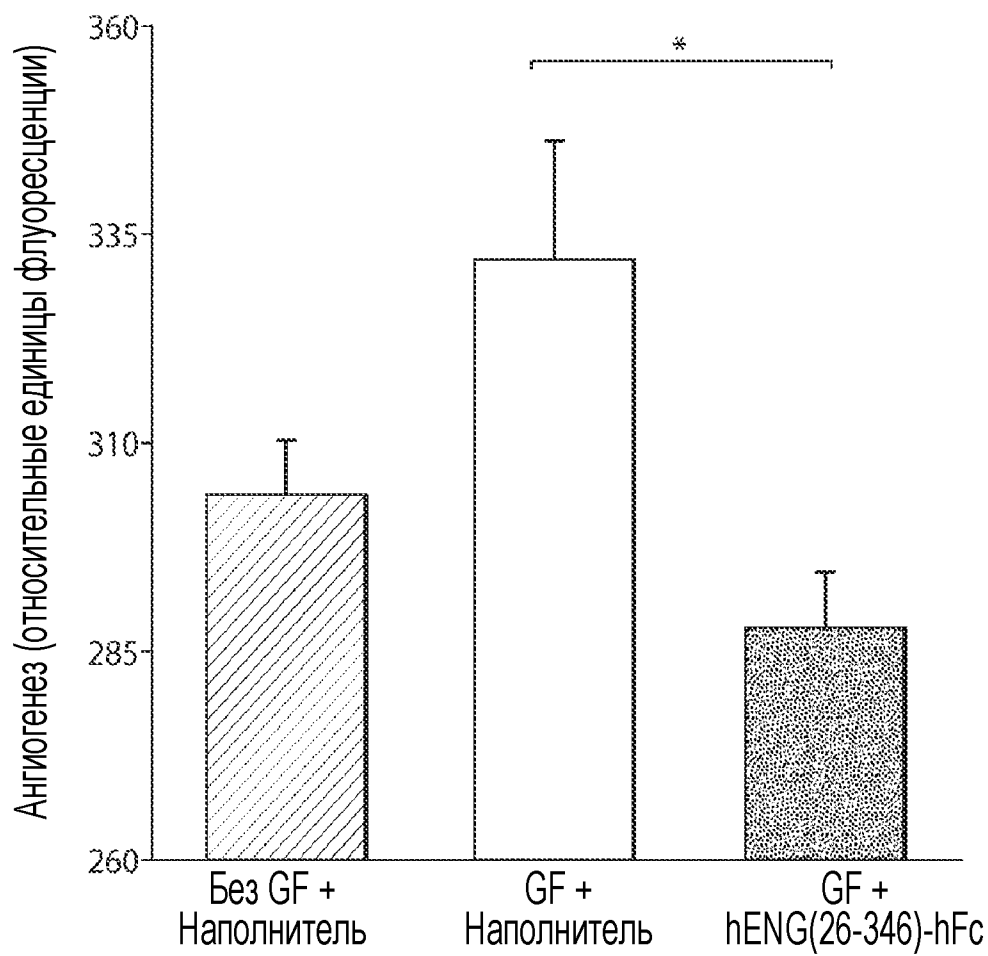
ФИГ.37С

hENG(26-359)-hFc ингибирует ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе CAM



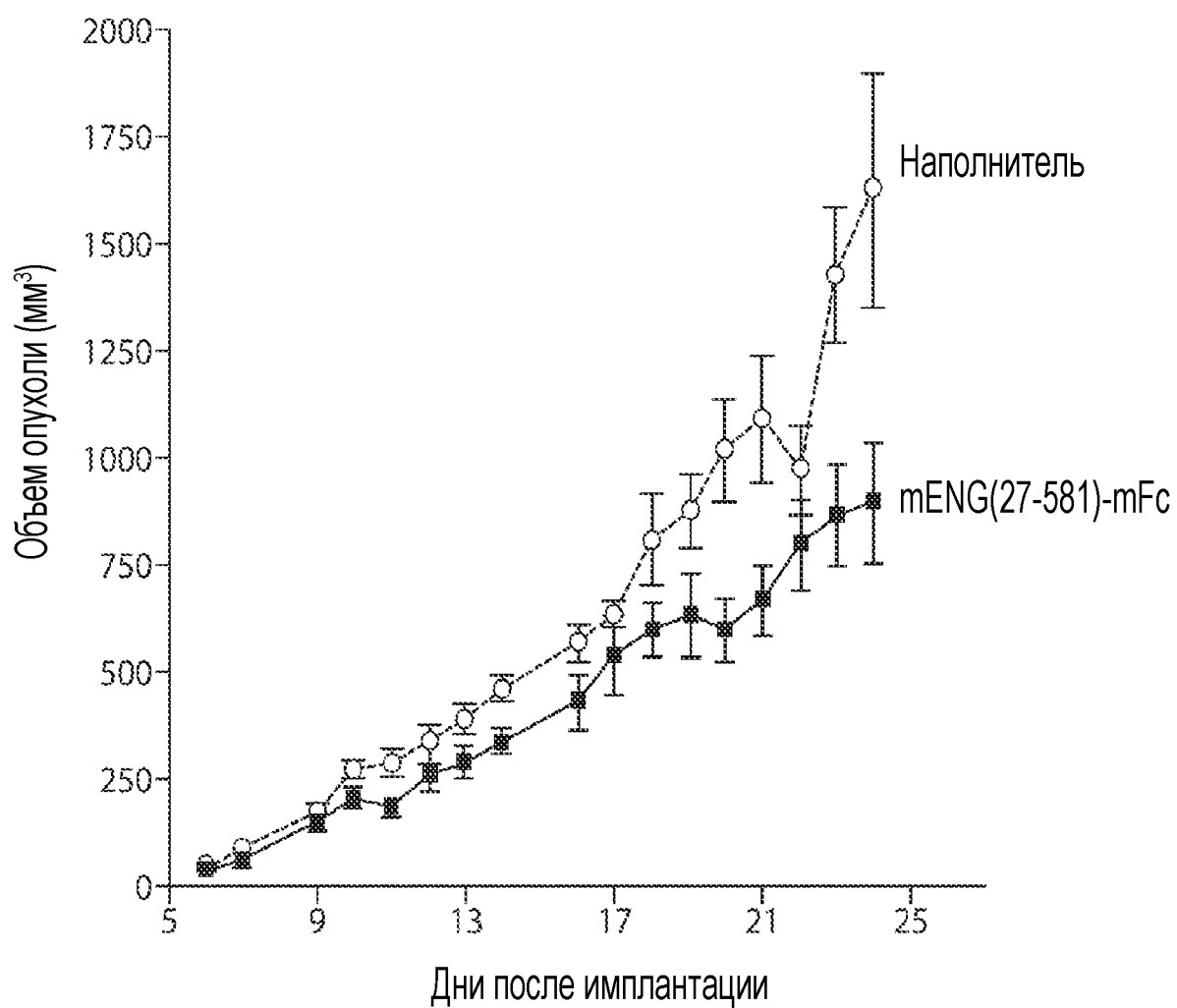
ФИГ.38

Эффект hENG(26-346)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого факторами роста, в анализе ангиореактора мыши



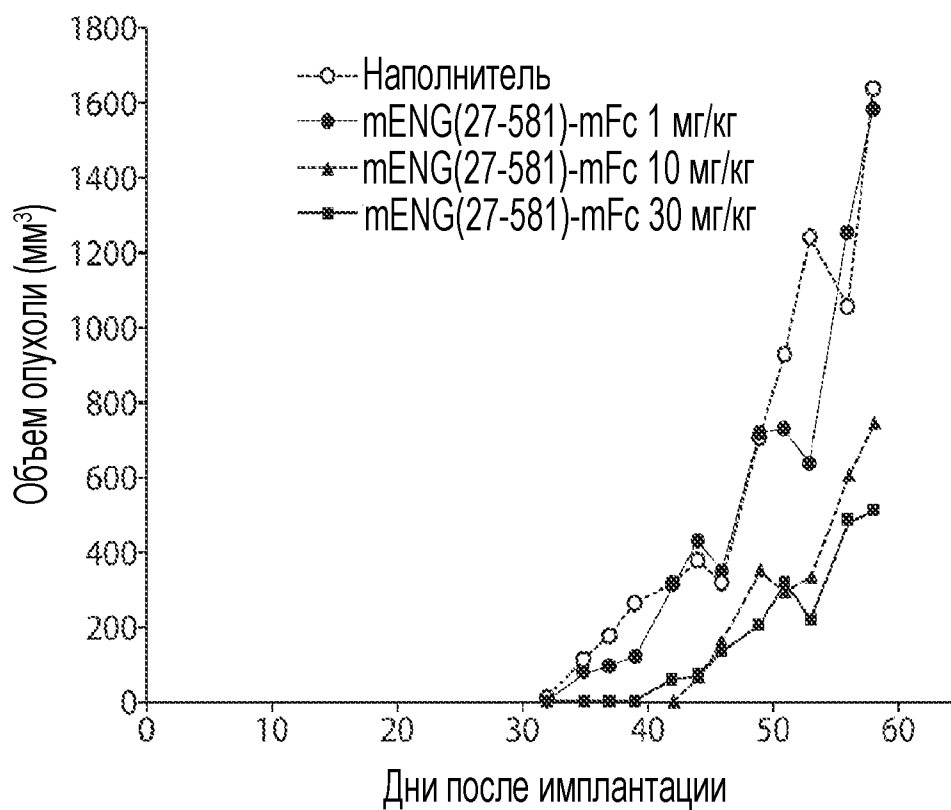
ФИГ.39

**Эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста опухолей
молочной железы 4T1 у мышей**



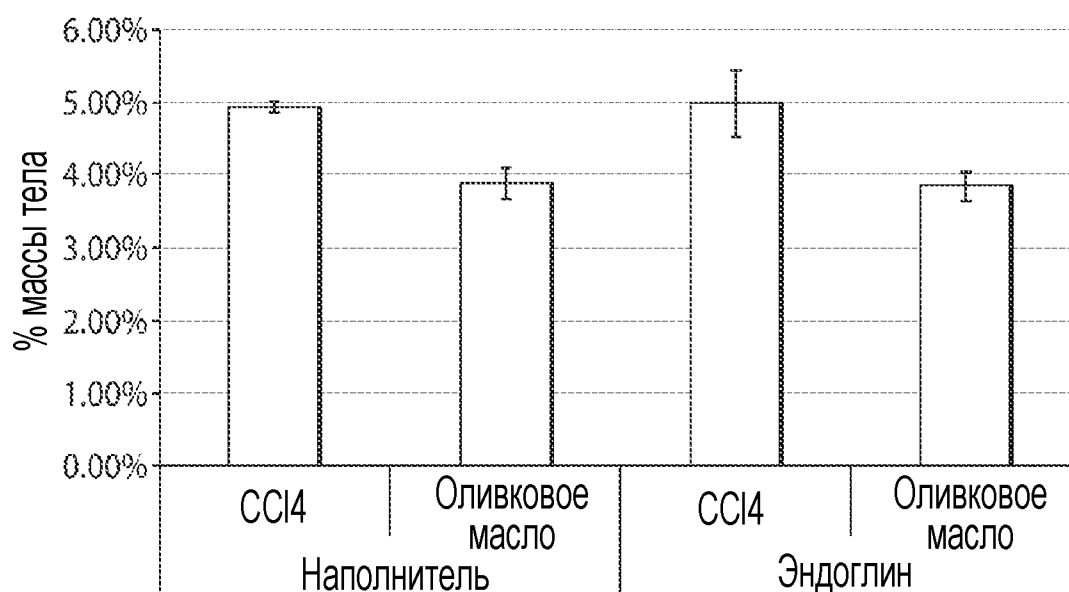
ФИГ.40

Эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста опухолей Colon-26 у мышей



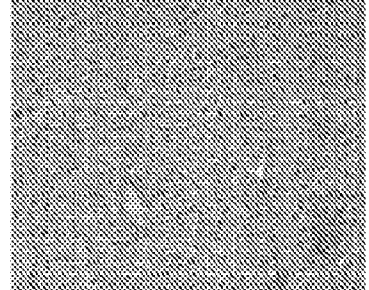
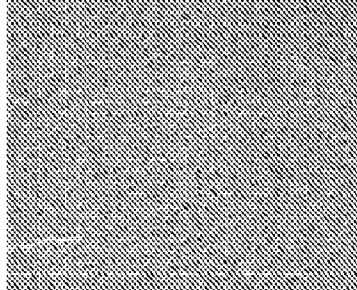
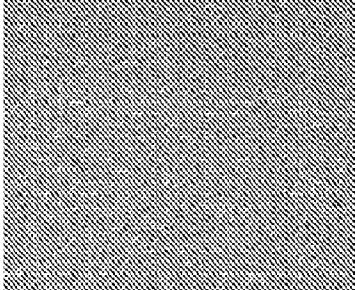
ФИГ.41

Печень как % массы тела

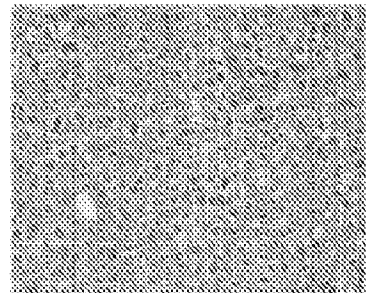
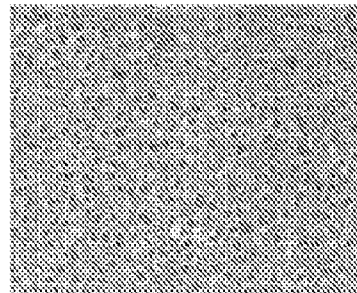
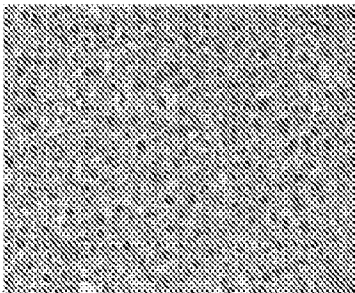


ФИГ.42

Оливковое масло

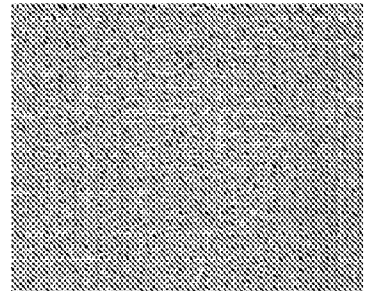
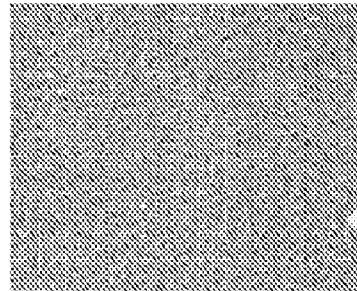
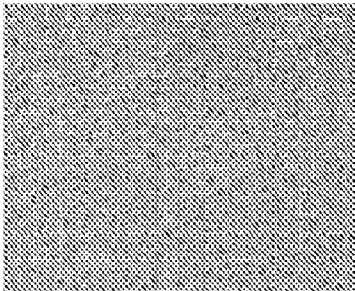


ССL4 + Оливковое
масло

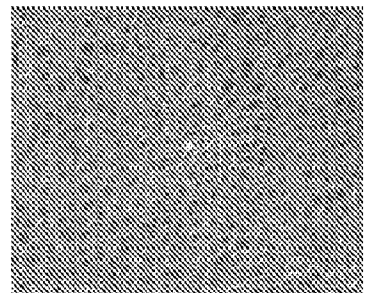
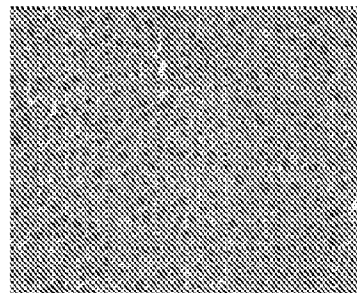
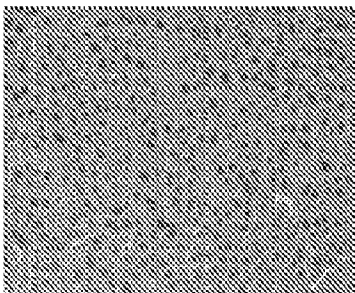


ФИГ.43

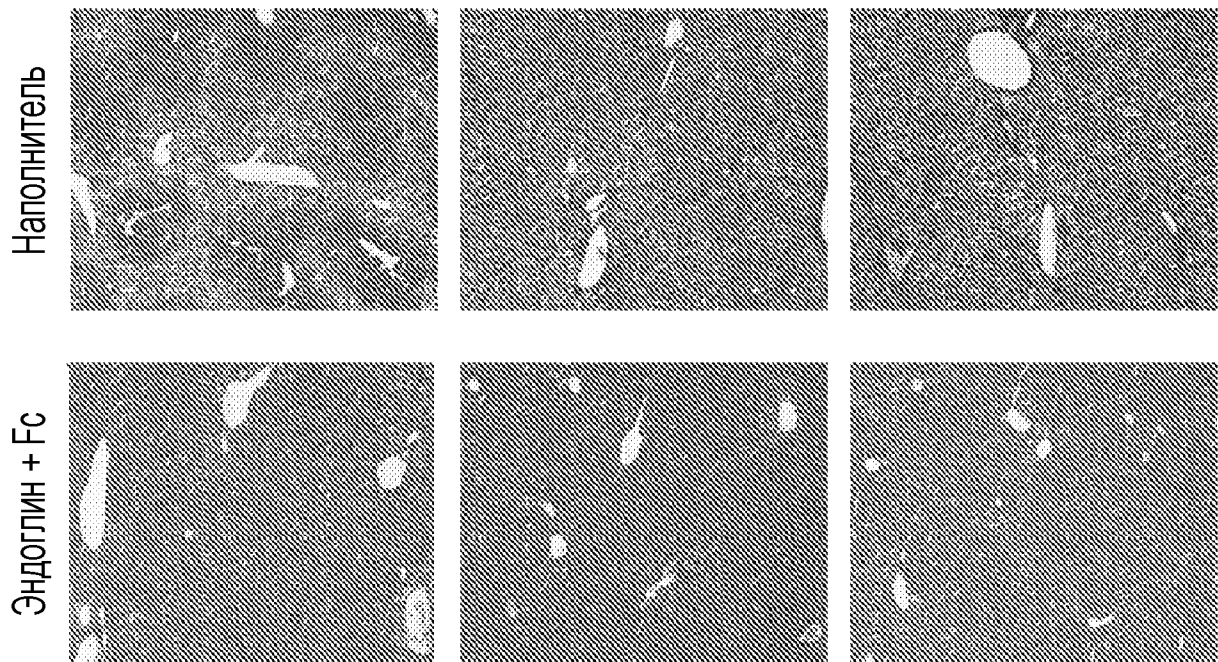
Оливковое масло



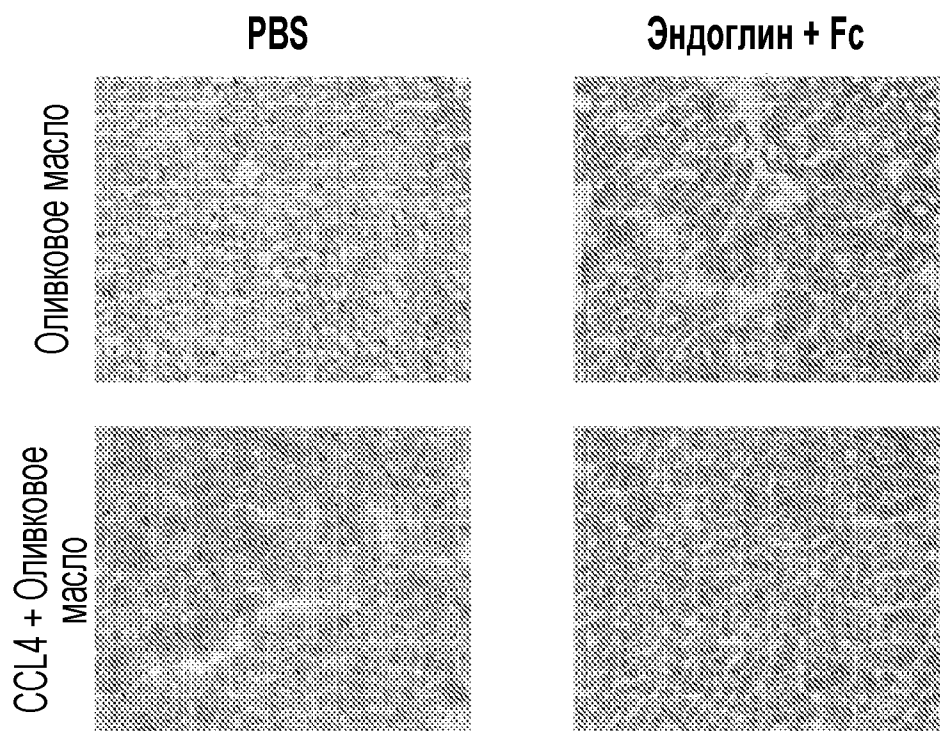
ССL4 + Оливковое
масло



ФИГ.44

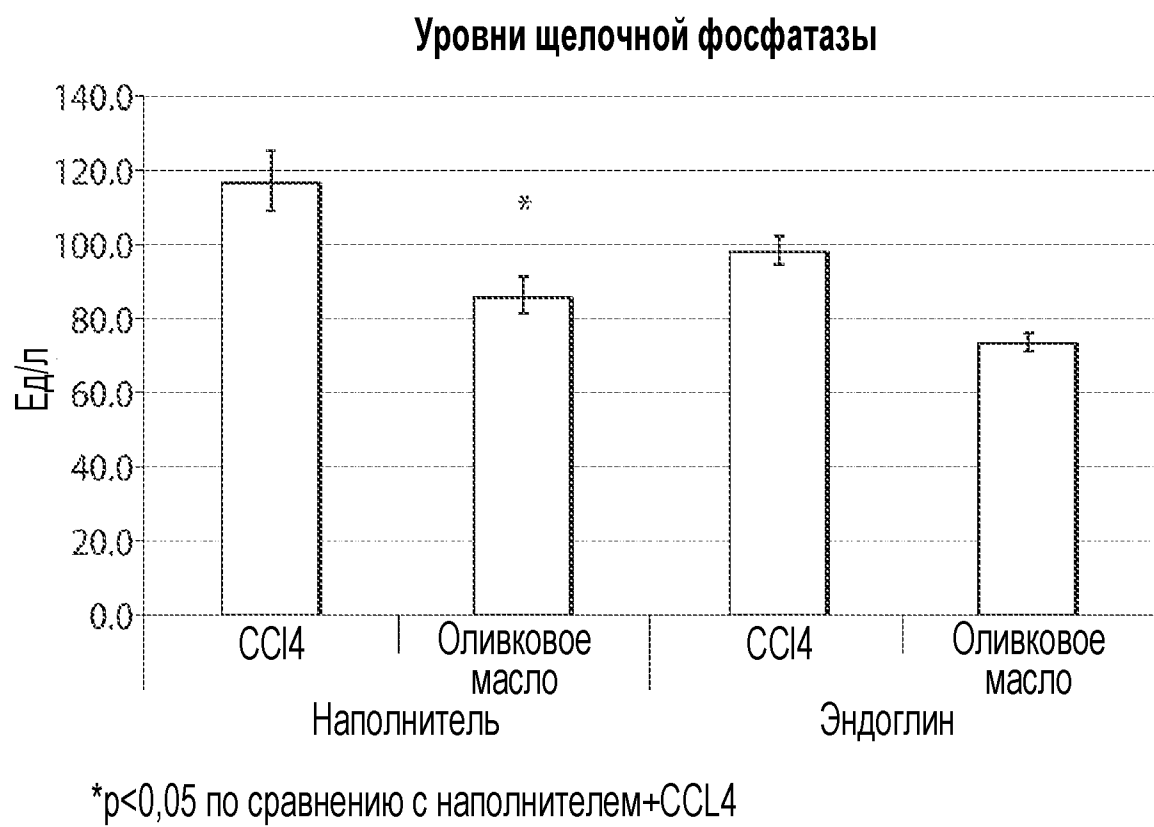


ФИГ.45



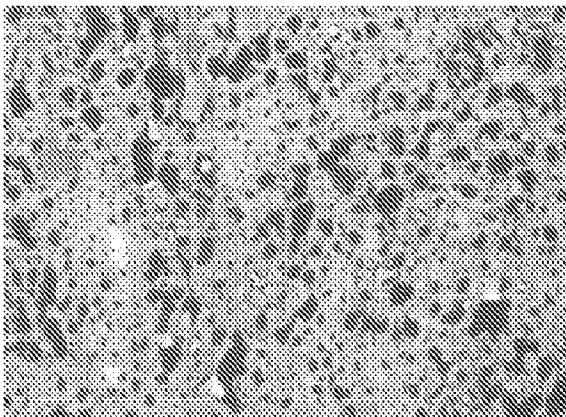
Животные, которым вводили эндоглин-Fc, имели наименьшую процентную долю печеней с обширным положительным окрашиванием масляным красным O

ФИГ.46



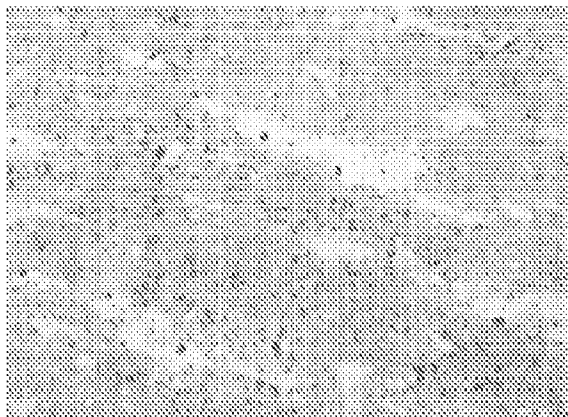
ФИГ.47

Наполнитель



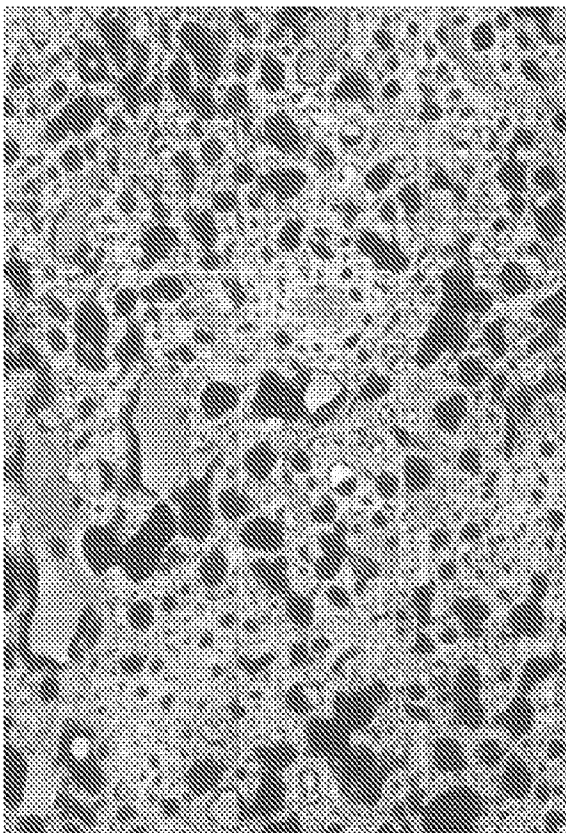
ФИГ.48А

ENG-Fc



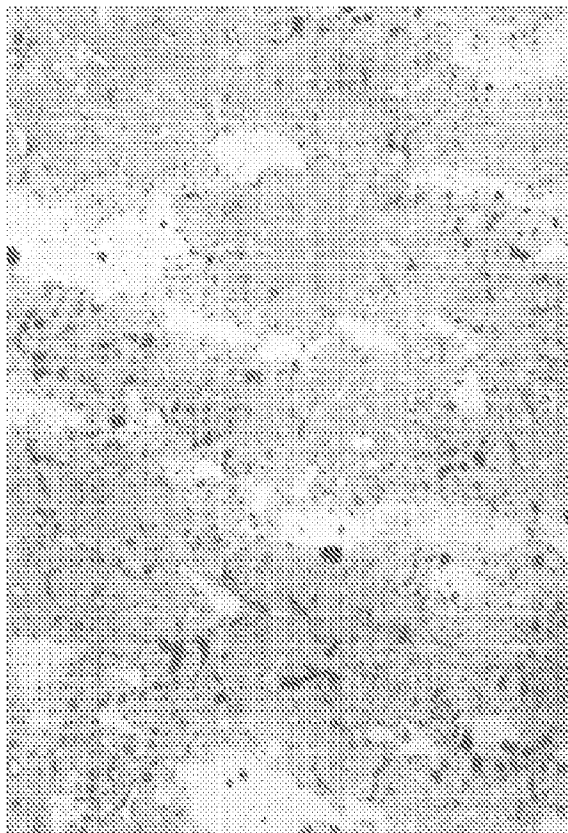
ФИГ.48В

Наполнитель



ФИГ.48С

ENG-Fc



ФИГ.48D