

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201692477 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.06.30

(51) Int. Cl. C07K 14/495 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.07.28

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

(31) 62/031,063; 62/195,908

(32) 2014.07.30; 2015.07.23

(33) US

(86) PCT/US2015/042510

(87) WO 2016/018931 2016.02.04

(71) Заявитель:

НДЖМ БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

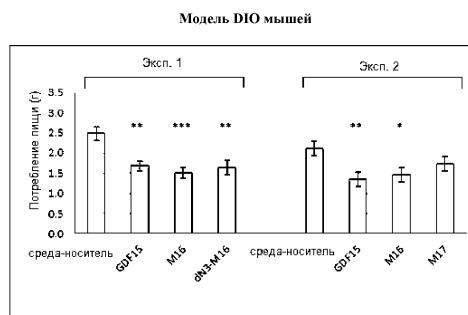
(72) Изобретатель:

Линдхаут Даррин Энтони, Халданкар
Радж, Тянь Хой, Хсу Джер-Юань (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В. (RU)

(57) Предложены способы лечения индивидов с расстройством метаболизма глюкозы и/или расстройством массы тела и композиции, связанные с ними.



A1

201692477

201692477

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Включение списка последовательностей в виде текстового файла посредством

5

ссылки

[0001] В настоящей заявке представлен список последовательностей в виде текстового файла "NGMB-139WO_SeqList.txt» размером 133 кБ, созданного 22 июля 2015 года. Содержание указанного текстового файла полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

10

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 62/031063, поданной 30 июля 2014 г., и предварительной заявке США № 62/195908, поданной 23 июля 2015 г., которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылок.

15

Область изобретения

[0003] Настоящее изобретение относится, в числе прочего, к полипептидам и их композициям, которые можно применять для лечения состояний, связанных с метаболизмом.

20

Введение

[0004] Причиной ожирения чаще всего является чрезмерное потребление пищи в сочетании с ограниченным расходом энергии и/или отсутствием физических упражнений.

25

Ожирение увеличивает вероятность развития различных заболеваний, например, сахарного диабета, гипертензии, атеросклероза, заболевания коронарных артерий, синдрома апноэ во сне, подагры, ревматизма и артрита. Кроме того, риск смертности напрямую коррелирует с ожирением, так что, например, индекс массы тела более 40 приводит к среднему снижению ожидаемой продолжительности жизни более чем на 10 лет.

30

[0005] Современные способы фармацевтического лечения включают подавители аппетита, оказывающие адресное воздействие на рецепторы определенных классов (например, CB1, 5-HT_{2C} и NPY); регуляторы цепей аппетита в гипоталамусе и молекулярного действия грелина; и ингибиторы поглощения питательных веществ, оказывающие адресное воздействие на липазу. К сожалению, ни один из существующих

35

способов не обеспечивает эффективное лечение ожирения, не вызывая неблагоприятных эффектов, некоторые из которых могут быть очень серьезными.

[0006] Высокий уровень глюкозы в крови стимулирует секрецию инсулина бета-клетками поджелудочной железы. Инсулин, в свою очередь, стимулирует проникновение глюкозы в мышцы и жировые клетки, что приводит к накоплению гликогена и триглицеридов и синтезу белков. Активация рецепторов инсулина на клетках различных типов снижает уровень глюкозы в кровотоке за счет увеличения поглощения и утилизации глюкозы, а также снижения образования глюкозы в печени. Разобщение в этой регуляторной сети может привести к диабету и связанным с ним патологическим синдромам, которые наблюдаются у значительной и растущей части населения.

[0007] Пациенты с расстройствами метаболизма глюкозы могут страдать от гипергликемии, гиперинсулинемии и/или непереносимости глюкозы. Примером расстройства, которое часто ассоциируется с патологическим уровнем глюкозы и/или инсулина является инсулинрезистентность, при которой клетки печени, жировые и мышечные клетки теряют способность реагировать на уровень инсулина в крови.

[0008] С учетом распространенности и тяжести ожирения, диабета и связанных с ними метаболических и неметаболических расстройств, сохраняется интерес к способам лечения, которые модулируют, например, аппетит, уровни глюкозы и/или инсулина и усиливают биологическую реакцию на колебания уровня глюкозы у пациента.

[0009] GDF15 дикого типа, также известный как MIC-1 (ингибиторный цитокин макрофагов-1), связан с регуляцией массы тела (Tsai VW, et al., PLoS One 2013; 8 (2): e55174; US8,192,735).

СВОДНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

[0010] Предложены полипептиды с непрерывной аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной аминокислотной последовательности зрелого GDF15 дикого типа человека (SEQ ID NO: 1). Полипептиды согласно настоящему изобретению включают мутеины GDF15, модифицированный GDF15 и модифицированные мутеины GDF15. Кроме того, предложены композиции этих полипептидов. В настоящем изобретении предусмотрено применение полипептидов, описанных в настоящем документе, а также их композиций, для лечения или профилактики расстройств, связанных с массой тела, и/или нарушений метаболизма глюкозы.

[0011] Как отмечено выше, предложен полипептид, содержащий непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: i) D5T/S и R21N; ii) R16N и H18T/S; iii) S23N и E25T/S; iv) L24N и D26T/S; v) S50N и F52T/S или F52N и A54T/S; vi) Q51N и R53T/S или R53N и A55T/S; vii) S64N и H66T/S; viii) L65N и R67T/S; ix) S82N и N84T/S; x) K91N и D93T/S или D93N и G95T/S; xi) T94N и V96T/S или V96N и L98T/S; xii) S97N и Q99T/S; и xiii) A106N и D108T/S.

[0012] Например, непрерывная аминокислотная последовательность может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: i) D5T и R21N или D5S и R21N; ii) R16N и H18T или R16N и H18S; iii) S23N и E25T или S23N и E25S; iv) L24N и D26T или L24N и D26S; v) S50N и F52T; S50N и F52S; F52N и A54T; или F52N и A54S; vi) Q51N и R53T; Q51N и R53S; R53N и A55T; или R53N и A55S; vii) S64N и H66T или S64N и H66S; viii) L65N и R67T или L65N и R67S; ix) S82N и N84T или S82N и N84S; x) K91N и D93T; K91N и D93S; D93N и G95T; или D93N и G95S; xi) T94N и V96T; T94N и V96S; V96N и L98T; или V96N и L98S; xii) S97N и Q99T или S97N и Q99S; и xiii) A106N и D108T или A106N и D108S.

[0013] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: D5T и R21N; S23N и E25T/S; R53N и A55T/S; S64N и H66T/S; K91N и D93T/S; D93N и G95T/S; S97N и Q99T/S; и A106N и D108T/S.

[0014] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: D5T и R21N; D5S и R21N; S23N и E25T; S23N и E25S; R53N и A55T; R53N и A55S; S64N и H66T; S64N и H66S; K91N и D93T; K91N и D93S; D93N и G95T; D93N и G95S; S97N и Q99T; S97N и Q99S; A106N и D108T; и A106N и D108S.

[0015] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: D5T и R21N; S64N и H66T/S; K91N и D93T/S; D93N и G95T/S; и S97N и Q99T/S.

[0016] В других вариантах реализации полипептид может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: K91N и D93T or K91N и D93S; и D93N и G95T or D93N и G95S. В других вариантах реализации полипептид может содержать следующую пару замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1: K91N и D93T.

[0017] В типичных вариантах реализации непрерывная аминокислотная последовательность может быть по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[0018] В других вариантах реализации длина непрерывной аминокислотной последовательности может составлять по меньшей мере 98 аминокислот, и указанная последовательность может быть по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота полипептида соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

[0019] В других вариантах реализации длина непрерывной аминокислотной последовательности может составлять по меньшей мере 98 аминокислот, и указанная последовательность может быть по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота полипептида соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

[0020] Типичные полипептиды, описанные в настоящем документе, содержат непрерывную аминокислотную последовательность, длина которой составляет по меньшей мере 98 аминокислот, и которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и содержит делецию аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1. Например, полипептиды могут быть укорочены по N-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1. Полипептид может быть укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 1, например, на 1-14 аминокислот, на 3-14 аминокислот, на 6-14 аминокислот или на 3-6 аминокислот.

[0021] В некоторых случаях непрерывная аминокислотная последовательность, длина которой составляет по меньшей мере 98 аминокислот, по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и не содержит первые три аминокислоты, соответствующие первым трем аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

[0022] В некоторых случаях длина непрерывной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 98 аминокислот, указанная последовательность по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и не содержит первые шесть аминокислот, соответствующие первым шести аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

[0023] В некоторых случаях длина непрерывной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 98 аминокислот, указанная последовательность по меньшей

мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и не содержит первые четырнадцать аминокислот, соответствующие первым четырнадцати аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

5 **[0024]** В некоторых случаях полипептид может содержать сигнальную последовательность на N-конце, например, сигнальную последовательность IgK. Сигнальную последовательность можно конъюгировать с полипептидом посредством линкера, причем указанный линкер может являться отщепляемым линкером.

[0025] Кроме того, в настоящем документе предложен гибридный белок, содержащий от N-конца к С-концу: гетерологичный полипептид [(G₄S)]₅-GDF15; гетерологичный полипептид [(G₄S)]₅-ΔN3-GDF15; или гетерологичный полипептид [(G₄S)]₅-ΔN6-GDF15.

[0026] В типичных вариантах реализации гетерологичный полипептид может являться сывороточным альбумином, белком, связывающим мальтозу, или иммуноглобулиновым Fc-полипептидом. Сывороточный альбумин может представлять собой сывороточный альбумин человека, сывороточный альбумин яванского макака или бычий сывороточный альбумин. Гибридный белок может содержать сигнальную последовательность на N-конце. Сигнальная последовательность может представлять собой сигнальную последовательность IgK.

[0027] Кроме того, в настоящем документе предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вышеописанные полипептиды или гибридные белки. Молекула нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с элементом, контролирующим экспрессию, обеспечивающим экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или гибридный белок, *in vitro* или *in vivo*. Кроме того, рассматривается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты. Вектор может являться вирусным вектором.

[0028] Некоторые варианты реализации включают трансформированные клетки или клетки-хозяева, экспрессирующие один или более из вышеупомянутых полипептидов.

[0029] В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения один или более из вышеупомянутых полипептидов предназначен для получения фармацевтической композиции, причем указанная композиция также содержит один или более из фармацевтически приемлемых разбавителей, носителей или вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция также содержит по меньшей мере один дополнительный профилактический или терапевтический агент.

[0030] Дальнейшие варианты реализации настоящего изобретения содержат антитело, специфически связывающееся с одним из вышеупомянутых мутеиновых полипептидов. В

некоторых вариантах реализации антитело содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи в составе отдельных полипептидов или одного полипептида. Антитело согласно настоящему изобретению связывает полипептид со сродством от приблизительно 10^7 M^{-1} до приблизительно 10^{12} M^{-1} в некоторых вариантах реализации. В других вариантах реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В дополнительных вариантах реализации антитело мечено обнаруживаемой меткой, причем антитело представляет собой Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ или Fab' в других вариантах реализации.

[0031] В настоящем изобретении также рассматриваются антитела, содержащие ковалентно связанный непептидный полимер (например, полимер поли(этиленгликоля)). В других вариантах реализации антитело содержит ковалентно связанную группу, выбранную из липидной группы, остатка жирной кислоты, полисахаридной группы и углеводной группы.

[0032] В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой одноцепочечное Fv (scFv) антитело, а в других scFv представлено в форме мультимера.

[0033] Антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой моноклональные антитела, поликлональные антитела или гуманизированные антитела, но не ограничиваются ими.

[0034] Кроме того, в настоящем изобретении рассматриваются фармацевтические композиции, содержащие антитело, описанное выше, в составе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, носителем или разбавителем. Такие фармацевтические композиции также могут содержать по меньшей мере один дополнительный профилактический или терапевтический агент.

[0035] Некоторые варианты реализации настоящего изобретения предусматривают стерильный контейнер, который содержит одну из указанных выше фармацевтических композиций и опционально один или несколько дополнительных компонентов. В качестве неограничивающего примера, стерильный контейнер может представлять собой шприц. В дальнейших вариантах реализации стерильный контейнер является одним из компонентов набора; набор также может содержать, например, второй стерильный контейнер, содержащий по меньшей мере один профилактический или терапевтический агент.

[0036] Кроме того, в настоящем документе описан способ изготовления вышеупомянутых полипептидов или гибридных белков. Указанный способ может включать культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей полипептид или гибридный белок; и очистку экспрессированного полипептида или гибридного белка.

[0037] В настоящем изобретении также рассматривается способ лечения или профилактики расстройства метаболизма глюкозы у субъекта (например, человека) путем введения субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутого полипептида или гибридного белка. В некоторых способах лечение или профилактика приводит к снижению уровня глюкозы в плазме субъекта, снижению уровня инсулина в плазме субъекта, снижению массы тела и/или потреблению пищи или повышению переносимости глюкозы у субъекта. В конкретных вариантах реализации указанное расстройство метаболизма представляет собой сахарный диабет.

[0038] Кроме того, описан способ лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта. Способ может включать введение субъекту полипептида или гибридного белка согласно настоящему изобретению, причем указанный полипептид или гибридный белок вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта. В некоторых способах лечение или профилактика приводит к снижению массы тела и/или потребления пищи у субъекта.

[0039] В некоторых вариантах реализации субъект страдает ожирением и/или расстройством массы тела.

[0040] Хотя настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным путем введения или схемой приема, в некоторых вариантах реализации введение осуществляют путем парентеральной (например, подкожной) инъекции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0041] На фигуре 1 показано выравнивание аминокислотной последовательности мутеинов GDF15, описанной в настоящем документе, с аминокислотной последовательностью зрелого GDF15 дикого типа (дт) человека.

[0042] На фигуре 2 показано выравнивание аминокислотной последовательности мутеинов Δ N3-GDF15, описанной в настоящем документе, с аминокислотной последовательностью зрелого GDF15 дт человека. Мутеины Δ N3-hGDF15 не содержат 3 аминокислот (ARN), присутствующих на N-конце зрелого hGDF15.

[0043] На фигуре 3 изображены два гибридных белка (конструкты M1 и M2), содержащие от N-конца к С-концу: сигнальную последовательность IgK (нижний регистр) (IgK) - аминокислотную последовательность (D25-L609) человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) - неотщепляемый (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ линкер [(G₄S)]₃ (подчеркнутый шрифт) - аминокислотную последовательность зрелого GDF15 человека (hGDF15) (полужирный шрифт). Конструкт M1 (IgK-ЧСА-[(G₄S)]₃-hGDF15) содержит полноразмерный зрелый hGDF15, в то время как конструкт M2 (IgK-ЧСА-[(G₄S)]₃- Δ N3-

hGDF15) содержит $\Delta N3$ -hGDF15, в котором первые 3 аминокислоты (ARN), соответствующие N-концевым аминокислотам зрелого hGDF15, делетированы.

[0044] На фигуре 4 изображен невосстановленный, окрашенный кумасси ДСН-ПААГ-гель экспрессии конструкторов M1 и M2 из среды стабильной линии клеток CHOK1SV GSKO. Звездочками (*) отмечены укороченные варианты, встречающиеся в M1 при секреции из CHOK1SV. ЖХ/МС-идентификация сайтов укорачивания приводит к разработке конструктора с повышенной стабильностью (M2), укороченного на 3 аминокислоты (Δ ARN или $\Delta N3$) на N-конце зрелого hGDF15.

[0045] На фигуре 5 изображены две гибридные молекулы с аминокислотной последовательностью человеческого сывороточного альбумина (D25-L609) с сигнальной последовательностью IgK (нижний регистр), присоединенной к N-концу аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт) посредством неотщепляемого $[(G_4S)]_5$ линкера (подчеркнутый шрифт). Конструктор M3 (IgK-ЧСА- $[(G_4S)]_5$ - $\Delta N3$ -hGDF15) укорочен на 3 аминокислоты (Δ ARN) с N-конца зрелого hGDF15; в то время как конструктор M4 (IgK-ЧСА- $[(G_4S)]_5$ - $\Delta N6$ -hGDF15) укорочен на 6 аминокислот (Δ ARNGDH) по сравнению с N-концом зрелого hGDF15.

[0046] На фигуре 6 показано влияние на потребление пищи у мышей с алиментарным ожирением (DIO) после однократного острого подкожного введения среды-носителя, гибридных молекул M1, M3 и M4 (40 нмоль/кг). Как отмечено на фигуре, параметры потребления пищи определяли через 24 часа после введения и через 7 дней после введения. В каждой группе мышей ($n = 8$) значения p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) определяли с помощью Т-критерия для независимых выборок при сравнении групп, получавших различные дозы, с контрольной группой, получавшей носитель, в каждый указанный момент времени.

[0047] На фигуре 7 показано влияние на массу тела DIO мышей после однократного острого подкожного введения среды-носителя, гибридных молекул M1, M3 и M4 (40 нмоль/кг). Как отмечено на фигуре, параметры массы тела определяли через 24 часа после введения и через 7 дней после введения по сравнению со значениями массы в группе до введения. В каждой группе мышей ($n = 8$) значения p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) определяли с помощью Т-критерия для независимых выборок при сравнении групп, получавших различные дозы, с контрольной группой, получавшей носитель, в каждый указанный момент времени.

[0048] На фигуре 8А показаны аминокислотные последовательности моногликозилированных и дигликозилированных мутеинов, полученных путем внедрения консенсусных сайтов N-связанного гликозилирования (M5-M21). Эти последовательности

содержат сигнальную последовательность IgK (нижний регистр), объединенную с N-концом аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт). На фигуре 8B показаны нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности, изображенные на фигуре 8A. На фигуре 8C показаны аминокислотные последовательности ΔN3-M16 и нуклеотидные последовательности, кодирующие ΔN3-M16. На фигуре 8D показана аминокислотная последовательность зрелого GDF15 дт человека, содержащая сигнальную последовательность IgK (IgK-дт-GDF15), и нуклеотидная последовательность, кодирующая IgK-дт-GDF15.

[0049] На фигуре 9 представлена сводная информация о секреции и образованию димера наряду с улучшениями относительной растворимости для каждого сконструированного N-гликозилированного мутеина GDF15 человека, приведенного на фигуре 8A, и для ΔN3-M16.

[0050] На фигуре 10 показано влияние на потребление пищи у мышей с алиментарным ожирением (DIO) после однократного острого подкожного введения среды-носителя (PBS), полипептидов GDF15, M16, ΔN3-M16 и M17 (1 мг/кг (40 нмоль/кг)).

[0051] На фигуре 11 показано влияние на массу тела у DIO-мышей после однократного острого подкожного введения среды-носителя (PBS), полипептидов GDF15, M16, ΔN3-M16 и M17 (1 мг/кг (40 нмоль/кг)).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0052] Перед дальнейшим описанием способов и композиций согласно настоящему изобретению следует понимать, что настоящее изобретение не ограничиваются конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе, а также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения.

[0053] Если представлен диапазон величин, следует понимать, что каждое промежуточное значение, до десятой части единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределом этого интервала и любое другое заданное или промежуточное значение в этом заданном интервале, находятся в рамках изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших интервалов могут независимо быть включены в меньшие интервалы и также находятся в рамках изобретения, кроме любого специально исключенного предела в заданном интервале.

Если заданный интервал включает один или оба предела, то интервалы без одного или
обоих пределов также включены в изобретение. Если не указано иное, все технические и
научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно
5 понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее
изобретение.

[0054] Следует отметить, что при использовании в настоящем документе и
прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на
множественное число, если из контекста очевидно не следует иное. Так, например,
упоминание «мутантного полипептида» включает упоминание одного или более
10 мутантных полипептидов и т.д. Дополнительно следует отметить, что может быть
составлен план формулы изобретения, чтобы исключить любой необязательный элемент.
В связи с этим предполагается, что данное утверждение служит в качестве
предшествующего основания для таких исключаящих терминов, как "исключительно",
"только" и тому подобных в связи с перечислением элементов формулы изобретения, или
15 для использования "отрицательных" ограничений.

[0055] Публикации, обсуждаемые в настоящей заявке, приведены исключительно для
их описания до даты подачи настоящей заявки. Никакую информацию в настоящей заявке
не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не имеет права
датировать подобную публикацию более ранним числом в силу действия предыдущего
20 изобретения. Более того, данные представленных публикаций могут отличаться от
фактически опубликованных данных, что может потребовать независимого
подтверждения.

Определения

[0056] Термины "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо для
25 обозначения человека или животного, которое не являющегося человеком (например,
млекопитающего).

[0057] Термины "лечить", "лечение" и т.п. относятся к порядку действий (например,
введению агента, например, полипептида или фармацевтической композиции,
30 содержащей полипептид), начинаемому после диагностики, обнаружения и т.п.
Заболевания, расстройства или состояния или их симптомов с целью устранения,
снижения, подавления или облегчения, временного или постоянного, по меньшей мере
одной из основных причин заболевания, расстройства или состояния, от которого страдает
субъект, или по меньшей мере одного из симптомов ассоциированных с заболеванием,
35 расстройством или состоянием, от которого страдает субъект. Таким образом, лечение

включает подавление (т.е. прекращение развития или дальнейшего развития заболевания, расстройства или состояния или клинических симптомов, ассоциированных с ними) активного заболевания (например, с целью снижения уровня инсулина и/или глюкозы в кровотоке, повышения переносимости глюкозы с целью минимизации колебаний уровня глюкозы и/или защиты от заболеваний, вызванных разобщением гомеостаза глюкозы).

[0058] Термин "нуждающийся в лечении", используемый в данном контексте, относится к решению, сделанному врачом или другим лицом ухаживающим за пациентом, о том, что пациент имеет необходимость в лечении или такое лечение пойдет ему на пользу. Это решение принимается на основе целого ряда факторов, которые находятся в сфере компетенции врача или лица, ухаживающего за пациентом.

[0059] Термины «предотвращать», «предотвращение», «профилактика» и т.п. относятся к порядку действий (например, введению агента, например, полипептида или фармацевтической композиции, содержащей полипептид), начинаемому таким образом (например, до проявления заболевания, расстройства или состояния или их симптома) с целью предотвращения, подавления, ингибирования или снижения, временного или постоянного, риска развития заболевания, расстройства или состояния и т.п. (например, на основании отсутствия клинических симптомов) у субъекта или задержки их проявления, главным образом у субъекта, предрасположенного к конкретному заболеванию, расстройству или состоянию. В некоторых случаях термины также относятся к замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния или ингибирования его прогрессирования к вредному или иным образом нежелательному состоянию.

[0060] Термин "нуждающийся в предотвращении", используемый в данном контексте, относится к решению, сделанному врачом или другим лицом ухаживающим за пациентом, о том, что пациент имеет необходимость в профилактическом уходе или такой профилактический уход пойдет ему на пользу. Это заключение делают на основании ряда факторов, входящих в компетенцию врача или лица, осуществляющим уход.

[0061] Фраза «терапевтически эффективное количество» относится к введению агента субъекту отдельно или в составе фармацевтической композиции, однократно или в рамках серии доз, в количестве, способном оказать обнаружимое положительное влияние на какой-либо симптом, аспект или характеристики заболевания, расстройства или состояния при введении пациенту. Терапевтически эффективное количество можно установить путем измерения соответствующих физиологических эффектов. Например, в случае гипергликемического состояния снижение или уменьшение уровня глюкозы в крови или улучшение теста переносимости глюкозы можно использовать для определения

эффективности лечения гипергликемического состояния за счет указанного количества агента. Например, терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения или уменьшения уровня (например, исходного уровня) глюкозы в плазме натощак (FPG), причем, например, указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с более 200 мг/дл до менее 200 мг/дл, причем 5 указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с 175-200 мг/дл до уровня менее исходного, причем указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с 150-175 мг/дл до уровня менее исходного, причем указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с 125-150 мг/дл до уровня менее исходного и т.д. 10 (например, снижения уровня до менее 125 мг/дл, менее 120 мг/дл, менее 115 мг/дл, менее 110 мг/дл и т.д.). В случае уровня HbA1c эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения или уменьшения уровня более чем на приблизительно 10-9%, более чем на приблизительно 9-8%, более чем на приблизительно 8-7%, более чем на приблизительно 7-6%, более чем на приблизительно 6-5% и т.д. В 15 частности, снижение или уменьшение уровня HbA1c на приблизительно 0,1%, 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50% или более рассматривается в настоящем изобретении. Терапевтически эффективное количество можно скорректировать в зависимости от схемы введения, диагностического анализа состояния субъекта и т.п.

20 **[0062]** Фраза "в количестве, достаточном, чтобы вызвать изменение" означает, что существует детектируемая разница между уровнем показателя, измеренного перед (например, базовый уровень) и после введения определенной терапии. Показатели включают любой объективный (например, уровень глюкозы или инсулина или потребления пищи) или субъективный параметр (например, хорошее самочувствие или 25 аппетит субъекта).

[0063] Фраза «переносимость глюкозы» в настоящем документе относится к способности субъекта контролировать уровень глюкозы в плазме и/или инсулина в плазме при колебаниях потребления глюкозы. Например, переносимость глюкозы охватывает способность субъекта снижать уровень глюкозы в плазме до уровня, определенного до 30 потребления глюкозы, в течение приблизительно 120 минут.

[0064] Термины «диабет» и «диабетический» относятся к прогрессирующему заболеванию, связанному с метаболизмом углеводов, включающему недостаточную продукцию или утилизацию инсулина, часто характеризующемуся гипергликемией и глюкозурией. Термины «предиабет» и «предиабетический» относятся к состоянию, при 35 котором у субъекта нет характерных признаков, симптомов и т.п., обычно

наблюдающихся при диабете, но есть характерные признаки, симптомы и т.п., которые при отсутствии лечения могут прогрессировать до диабета. Наличие этих состояний можно определить с помощью, например, анализа глюкозы в плазме натощак (FPG) или теста на пероральную переносимость глюкозы (OGTT). Оба эти анализа требуют, чтобы субъект не принимал пищу в течение по меньшей мере 8 часов до начала анализа. При анализе FPG уровень глюкозы в крови субъекта измеряют после голодания; как правило, субъект не принимает пищу в течение ночи, а глюкозу в крови измеряют утром, до того как субъект поест. У здорового субъекта, как правило, концентрация FPG составляет от приблизительно 90 до приблизительно 100 мг/дл, у субъекта с «преддиабетом», как правило, концентрация FPG составляет от приблизительно 100 до приблизительно 125 мг/дл, и у субъекта с «диабетом», как правило, уровень FPG превышает приблизительно 126 мг/дл. При OGTT глюкозу в крови субъекта измеряют после голодания и повторно через два часа после приема напитка, обогащенного глюкозой. Через два часа после приема напитка, обогащенного глюкозой, концентрация глюкозы в крови здорового субъекта, как правило, составляет менее приблизительно 140 мг/дл, концентрация глюкозы в крови субъекта с преддиабетом, как правило, составляет от приблизительно 140 до приблизительно 199 мг/дл, а концентрация глюкозы в крови субъекта с диабетом, как правило, составляет приблизительно 200 мг/дл или более. В то время как вышеупомянутые значения гликемии относятся к субъектам-людям, у субъектов-мышей нормогликемию, умеренную гипергликемию и выраженную гипергликемию определяют по-другому. У здорового субъекта-мыши после четырехчасового голодания, как правило, концентрация FPG составляет от приблизительно 100 до приблизительно 150 мг/дл, у субъекта-мыши с «преддиабетом», как правило, концентрация FPG составляет от приблизительно 175 до приблизительно 250 мг/дл, и у субъекта-мыши с «диабетом», как правило, концентрация FPG превышает приблизительно 250 мг/дл.

[0065] Термин «инсулинрезистентность» в настоящем документе относится к состоянию, когда нормальное количество инсулина не может привести к нормальной физиологической или молекулярной реакции. В некоторых случаях гиперфизиологическое количество инсулина, продуцированное эндогенно или введенное извне, может полностью или частично преодолеть инсулинрезистентность и привести к биологической реакции.

[0066] Термин «метаболический синдром» относится к взаимосвязанной группе признаков, которая включает гиперинсулинемию, патологическую переносимость глюкозы, ожирение, перераспределение жира в брюшной полости или верхней части тела, гипертензию, дисфибринолиз и дислипидемию, характеризующуюся высоким уровнем

триглицеридов, низким уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и высоким уровнем частиц липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), но не ограничивается ими. Субъекты с метаболическим синдромом подвержены риску развития диабета 2 типа и/или других расстройств (например, атеросклероза).

5 **[0067]** Фраза «расстройство метаболизма глюкозы» охватывает любое расстройство, характеризующееся клиническим симптомом или комбинацией клинических симптомов, связанными с повышенным уровнем глюкозы и/или повышенным уровнем инсулина у субъекта по сравнению со здоровым индивидом. Повышенный уровень глюкозы и/или инсулина может проявляться при следующих заболеваниях, расстройствах и состояниях, в
10 числе прочего: гипергликемии, сахарном диабете II типа, гестационном диабете, сахарном диабете I типа, инсулинрезистентности, нарушении переносимости глюкозы, гиперинсулинемии, нарушении метаболизма глюкозы, предиабете, других метаболических расстройствах (например, метаболическом синдроме, который также называют синдромом X) и ожирении. Полипептиды согласно настоящему изобретению и
15 их композиции можно применять, например, для достижения и/или поддержания гомеостаза глюкозы, например, для снижения уровня глюкозы в кровотоке и/или снижения уровня инсулина до диапазона, характерного для здорового субъекта.

[0068] Термин «гипергликемия» в настоящем документе относится к состоянию, при котором в плазме крови субъекта циркулирует повышенное количество глюкозы по сравнению со здоровым индивидом. Гипергликемию можно диагностировать, используя
20 способы, известные в данной области техники, включая измерение уровня глюкозы в крови натошак, как описано в настоящем документе.

[0069] Термин «гиперинсулинемия» в настоящем документе относится к состоянию, при котором повышен уровень циркулирующего инсулина при сопутствующем
25 повышенном или нормальном уровне глюкозы в крови. Гиперинсулинемия может быть вызвана инсулинрезистентностью, которая ассоциирована с дислипидемией, например, высоким уровнем триглицеридов, высоким уровнем холестерина, высоким уровнем липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и низким уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП); высоким уровнем мочевой кислоты; синдромом поликистозных
30 яичников; диабетом II типа и ожирением. Гиперинсулинемию можно диагностировать как уровень инсулина в плазмы, превышающий 2 мкЕд/мл.

[0070] В настоящем документе фраза «расстройство массы тела» относится к состояниям, ассоциированным с чрезмерной массой тела и/или повышенным аппетитом. Для определения наличия у субъекта избыточной массы тела по сравнению с эталонным
35 здоровым индивидом используют различные параметры, в том числе возраст, рост, пол и

состояние здоровья субъекта. Например, можно считать, что у субъекта избыточный вес или ожирение, за счет оценки индекса массы тела (ИМТ) субъекта, который рассчитывают путем деления массы тела субъекта в килограммах на квадрат роста субъекта в метрах. Считается, что у взрослого субъекта с ИМТ в диапазоне от $\sim 18,5$ до $\sim 24,9$ кг/м^2 нормальный вес; у взрослого субъекта с ИМТ между ~ 25 и $\sim 29,9$ кг/м^2 избыточный вес (предожирение); и можно считать, что взрослый субъект с ИМТ ~ 30 кг/м^2 или выше страдает ожирением. Повышенный аппетит часто способствует избыточному весу. Существует несколько состояний, ассоциированных с повышенным аппетитом, в том числе, например, синдром ночного питания, который характеризуется утренней анорексией и вечерней полифагией и часто ассоциируется с бессонницей, но может быть связан с повреждением гипоталамуса.

[0071] Термин «активаторы» относится к агентам, которые, например, стимулируют, повышают, активируют, облегчают, усиливают активацию, сенсибилизируют или индуцируют функцию или действие одного или более агентов, например, полипептидов, используемых для лечения или профилактики метаболического расстройства. Кроме того, активаторы включают агенты, действующие по тому же механизму, что и полипептиды согласно настоящему изобретению (т.е. агенты, модулирующие тот же сигнальный путь, что и указанные полипептиды, аналогично указанным полипептидам) и способные вызывать биологическую реакцию, сопоставимую с (или превышающую) с реакцией, вызываемой указанными полипептидами. Примеры активаторов включают агонисты, например, низкомолекулярные соединения.

[0072] Термин «модуляторы» совместно относится к полипептидам согласно настоящему изобретению и активаторам.

[0073] Термины «модулировать», «модуляция» и т.п. относятся к способности агента (например, активатора) прямо или косвенно усиливать функцию или активность одного или более из полипептидов (или молекул нуклеиновых кислот, кодирующих их); или способности агента вызывать эффект, сопоставимый с эффектом одного или более из полипептидов.

[0074] Термины "полипептид", "пептид" и "белок", используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать в себя генетически кодируемые и не генетически кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или производные аминокислот, и полипептиды, которые имеют модифицированную первичную структуру белка. Данные термины включают гибридные белки, в том числе гибридные белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, гибридные белки с

гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионина или без них; иммунологически меченые белки; и т.п., но не ограничиваются ими. В конкретных вариантах реализации указанные термины относятся к аминокислотной полимерной форме любой длины, содержащей генетически кодируемые аминокислоты. В конкретных вариантах реализации указанные термины относятся к аминокислотной полимерной форме любой длины, содержащей генетически кодируемые аминокислоты, объединенные с гетерологичной аминокислотной последовательностью. В конкретных вариантах реализации указанные термины относятся к аминокислотной последовательности длиной 112 аминокислот, необязательно объединенной с гетерологичной последовательностью. В конкретных вариантах реализации в соответствующих случаях при упоминании белков и молекул, описанных в настоящем документе, термины «полипептид», «пептид» и «белок» относятся к полипептидам, соответствующим определению в настоящем документе.

[0075] Следует принимать во внимание, что на всем протяжении данного изобретения ссылка делается на аминокислоты в соответствии с однобуквенным или трехбуквенным кодом. Для удобства читателя, однобуквенные и трехбуквенные коды аминокислот приведены ниже:

G	Glycine	Gly		P	Proline	Pro
A	Alanine	Ala		V	Valine	Val
L	Leucine	Leu		I	Isoleucine	Ile
M	Methionine	Met		C	Cysteine	Cys
F	Phenylalanine	Phe		Y	Tyrosine	Tyr
W	Tryptophan	Trp		H	Histidine	His
K	Lysine	Lys		R	Arginine	Arg
Q	Glutamine	Gln		N	Asparagine	Asn
E	Glutamic Acid	Glu		D	Aspartic Acid	Asp
S	Serine	Ser		T	Threonine	Thr

[0076] В настоящем документе термин «вариант» охватывает естественные варианты (например, гомологи и аллельные варианты) и варианты неестественного происхождения (например, рекомбинантно модифицированные). Естественные варианты включают гомологи, т. е., нуклеиновые кислоты и полипептиды, нуклеотидные или аминокислотные последовательности которых, соответственно, различаются у разных видов. Естественные варианты включают аллельные варианты, т. е., нуклеиновые кислоты и полипептиды, нуклеотидные или аминокислотные последовательности которых, соответственно, различаются у разных индивидов в пределах вида. Варианты неестественного

происхождения включают нуклеиновые кислоты и полипептиды, содержащие изменения в нуклеотидной или аминокислотной последовательности, соответственно, где указанное изменение в последовательности внесено искусственно, например, получено в лаборатории или другом учреждении за счет человеческого вмешательства (5 «человеческими руками»).

[0077] Термин «нативный» или «дикого типа» по отношению к GDF15 относится к биологически активному природному GDF15, в том числе биологически активным природным вариантам GDF15. Данный термин включает последовательность зрелого GDF15 человека длиной 112 аминокислот (SEQ ID NO: 1).

10 **[0078]** Термин «мутеины» в настоящем документе в широком смысле относится к рекомбинантным белкам, т.е. полипептиду, содержащему искусственно введенное изменение в аминокислотной последовательности, например, изменение в аминокислотной последовательности, полученное в лаборатории или другом учреждении за счет человеческого вмешательства («человеческими руками»). Эти полипептиды
15 обычно содержат одиночную или множественные аминокислотные замены или делеции и часто происходят от клонированных генов, подвергшихся сайт-специфическому или случайному мутагенезу, или от полностью синтетических генов. «Мутеины GDF15» согласно настоящему изобретению, таким образом, охватывают, например, аминокислотные замены и/или аминокислотные делеции (например, укорачивание по N-
20 концу на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 или более аминокислот) по сравнению с эталонным полипептидом, например, по сравнению с зрелым GDF15 человека (SEQ ID NO: 1).

[0079] В настоящем документе термины «модифицированный», «модификация» и т.д. по отношению нативному GDF15 человека или мутеину GDF15 относятся к одному или
25 более изменениям, меняющим свойства GDF15 человека, естественного варианта GDF15 или мутеина GDF15, причем указанные изменения не влияют на первичную аминокислотную последовательность GDF15. Такое свойство включает, например, растворимость, период полужизни в кровотоке, стабильность, клиренс, иммуногенность или аллергенность и технологичность (например, стоимость и эффективность).

30 «Модификация» включает ковалентную химическую модификацию, которая не влияет на саму первичную аминокислотную последовательность полипептида GDF15 (нативного или мутеина). Возможные изменения GDF15 человека, естественного варианта GDF15 или мутеина GDF15 включают ПЭГилирование (ковалентное присоединение одной или более молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) или их производных); гликозилирование (например,
35 N-гликозилирование), полисиалирование и присоединение ГЭК; объединение с мальтоза-

связывающим белком; объединение с альбумином (например, с ЧСА); связывание с альбумином через, например, конъюгированную цепь жирной кислоты (ацилирование); объединение с Fc; и объединение с имитатором ПЭГ, но не ограничиваются ими. Некоторые конкретные варианты реализации приводят к модификациям, связанным с полиэтиленгликолем, другие конкретные варианты реализации приводят к модификациям, связанным с альбумином, а иные конкретные варианты реализации приводят к модификациям, связанным с гликозилированием, или комбинациям вышеуказанного.

[0080] Термины "ДНК", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "полинуклеотид" и тому подобные используются в данном описании взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов либо рибонуклеотидов, или их аналогов. Примеры, не имеющие ограничительного характера, включают линейные и циклические нуклеиновые кислоты, матричную РНК (мРНК), комплементарную ДНК (кДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, векторы, зонды, праймеры и тому подобные.

[0081] Термин «зонд» относится к фрагменту ДНК или РНК, соответствующему исследуемому гену или последовательности, причем указанный фрагмент мечен радиоактивной (например, путем включения ^{32}P или ^{35}S) или некоторыми другими обнаруживаемыми молекулами, например, биотином, дигоксигенином или флуоресцеином. Поскольку цепи ДНК или РНК с комплементарными последовательностями должны гибридизоваться, зонд можно применять, например, для мечения вирусных бляшек, бактериальных колоний или полос в геле, содержащих исследуемый ген. Зонд может представлять собой клонированную ДНК или синтетическую цепь ДНК; последний вариант можно использовать для получения кДНК или геномного клона из выделенного белка, например, выполнив микросеквенирование части белка, получив нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, синтезировав олигонуклеотид, несущий эту последовательность, пометив последовательность радиоактивной меткой и используя ее в качестве зонда для скрининга библиотеки кДНК или геномной библиотеки.

[0082] Термин «гетерологичный» относится к двум компонентам, заданным структурами, происходящими из различных источников. Например, в контексте полипептида, «гетерологичный» полипептид может содержать функционально связанные аминокислотные последовательности, происходящие от различных полипептидов (например, первый компонент, содержащий рекомбинантный полипептид, и второй компонент, происходящий от нативного полипептида GDF15). Аналогичным образом, в контексте полинуклеотида, кодирующего химерный полипептид, «гетерологичный» полинуклеотид может содержать функционально связанные нуклеотидные

последовательности, происходящие от различных генов (например, первый компонент из нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный полипептид согласно варианту реализации, описанному в настоящем документе, и второй компонент из нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид-носитель). Другие типичные «гетерологичные» нуклеиновые кислоты включают экспрессирующие конструкторы, в которых нуклеиновая кислота, содержащая кодирующую последовательность, функционально связана с регуляторным элементом (например, промотором), генетическое происхождение которого отличается от происхождения кодирующей последовательности (например, с целью обеспечить экспрессию в исследуемой клетке-хозяине, генетическое происхождение которой может отличаться от происхождения промотора, кодирующей последовательности или как промотора, так и кодирующей последовательности). Например, промотор T7, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид GDF15 или его домен, называют гетерологичной нуклеиновой кислотой. В контексте рекомбинантных клеток термин «гетерологичный» может относиться к наличию нуклеиновой кислоты (или продукта гена, например, полипептида), генетическое происхождение которой отличается от клетки-хозяина, в которой она присутствует.

[0083] Термин «функционально связанный» относится к связи между молекулами, обеспечивающей желательную функцию. Например, «функционально связанные» в контексте нуклеиновых кислот относится к функциональной связи между нуклеотидными последовательностями. Например, последовательность, контролирующая экспрессию нуклеиновой кислоты (например, промотор, сигнальная последовательность или массив сайтов связывания факторов транскрипции) может быть функционально связана со вторым полинуклеотидом, причем указанная последовательность, контролирующая экспрессию, влияет на транскрипцию и/или трансляцию второго полинуклеотида. В контексте полипептида термин «функционально связанные» относится к функциональной связи между аминокислотными последовательностями (например, разными доменами), обеспечивающей описанную активность полипептида.

[0084] Используемый в данном описании в контексте структуры полипептида, "N-конец" (или "амино-конец") и "С-конец" (или "карбоксильный конец") относятся к крайним аминокислотным концам полипептида, соответственно, в то время как термины "N-концевой" и "С-концевой" относятся к относительным положениям в аминокислотной последовательности полипептида по направлению к N- и С-концу, соответственно, и могут включать остатки на N- и С-конце, соответственно. "Непосредственно N-концевой" или "непосредственно С-концевой" относится к положению первого аминокислотного остатка относительно второго аминокислотного

остатка, где первый и второй аминокислотные остатки ковалентно связаны для обеспечения непрерывной аминокислотной последовательности.

[0085] Термин «происходящий от» в контексте аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности (например, аминокислотная последовательность, «происходящая от» полипептида GDF15), предназначен для обозначения, что полипептид или нуклеиновая кислота содержат последовательность, основанная на последовательности эталонного полипептида или нуклеиновой кислоты (например, естественного полипептида GDF15 или нуклеиновой кислоты, кодирующей GDF15), и не предназначен для ограничения источника или способа, с помощью которого получен белок или нуклеиновая кислота. Например, термин «происходящий от» включает гомологи или варианты эталонных аминокислотных последовательностей или последовательностей ДНК.

[0086] В контексте полипептида термин «выделенный» относится к исследуемому полипептиду, который (если он является естественным полипептидом) находится в среде, отличающейся от среды, в которой он может встречаться в естественных условиях. Под термином "выделенный" подразумеваются полипептиды, которые находятся в образцах, основательно обогащенных на представляющий интерес полипептид и/или в которых такой полипептид является частично или значительно очищенным. Если полипептид не встречается в естественных условиях, термин «выделенный» означает, что полипептид отделен от среды, в которой он был получен с использованием синтетических или рекомбинантных средств.

[0087] «Обогащенный» означает, что образец подвергали искусственным манипуляциям (например, в лаборатории, например, ученый или клиницист), так что исследуемый полипептид присутствует в а) повышенной концентрации (например, по меньшей мере в 3 раза превышающей, по меньшей мере в 4 раза превышающей, по меньшей мере в 8 раз превышающей, по меньшей мере в 64 раза превышающей или более) по сравнению с концентрацией полипептида в исходном образце, например, биологическом образце (например, образце, в котором полипептид встречается в естественных условиях или в котором он присутствует после введения), или б) концентрации, превышающей концентрацию в среде, в которой указанный полипептид был получен (например, в бактериальной клетке).

[0088] Термин "в основном чистый" означает, что компонент (например, полипептид) составляет более чем около 50% от общего содержания композиции, и, как правило, более, чем около 60% от общего содержания полипептида. Более типично, "в основном чистый" относится к композициям, в которых по меньшей мере 75%, по меньшей мере

85%, по меньшей мере 90% или большее количество от общей композиции составляет компонент интереса. В некоторых случаях полипептид будет составлять более чем около 90%, или более чем около 95% от общего содержания композиции.

[0089] Термины «антитела» (Ат) и «иммуноглобулины» (Ig) относятся к гликопротеинам, имеющим одинаковые структурные характеристики. В то время как антитела демонстрируют специфичность связывания с конкретными антигенами, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы, которые не обладают специфичностью к антигену. Антитела подробно описаны далее в настоящем документе.

[0090] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против единственного антигенного сайта.

В отличие от препаратов поликлональных антител, которые могут содержать различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена.

[0091] В контексте антитела термин «выделенное» относится к антителу, отделенному и/или очищенному от загрязняющих компонентов природной среды; такие загрязняющие компоненты включают материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества.

[0092] Фраза «консервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислотных остатков в следующих группах: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; и 6) D, E. Консервативные аминокислотные замены могут сохранять активность белка при замене аминокислот(ы) в составе белка аминокислотой, содержащей боковую цепь с аналогичными кислотными, щелочными свойствами, зарядом, полярностью или размером. Руководство по замене, inserции или делеции может быть основано на выравнивании аминокислотных последовательностей различных вариантов белков или белков из разных видов.

Фактор дифференцировки роста 15 (GDF15)

[0093] GDF15, также известный как MIC-1 (ингибиторный цитокин макрофагов-1), PDF (фактор дифференцировки предстательной железы), PLAB (плацентарный костный морфогенетический белок), NAG-1 (ген, активируемый нестероидными

противовоспалительными препаратами (НПВП)), ТФР-PL и PTGFB, является членом надсемейства трансформирующего фактора роста β (ТФР- β). GDF15, синтезирующийся в виде 62-кДа внутриклеточного белка-предшественника, впоследствии расщепляемого фурин-подобной протеазой, секретируется в виде 25-кДа белка, связанного дисульфидными связями. [См., например, Fairlie et al., J. Leukoc. Biol 65:2-5 (1999)]. мРНК GDF15 встречается в нескольких тканях, в том числе в печени, почках, поджелудочной железе, толстой кишке и плаценте, и экспрессию GDF15 в печени может в значительной степени усиливаться при повреждении таких органов, как печень, почки, сердце и легкие.

[0094] Предшественник GDF15 представляет собой 308-аминокислотный полипептид (№ последовательности в NCBI NP_004855.2), содержащий 29-аминокислотный сигнальный пептид, 167-аминокислотный продомен и зрелый домен длиной 112 аминокислот, вырезаемый из продомена фурин-подобными протеазами. 308-Аминокислотный полипептид GDF15 называют «полноразмерным» полипептидом GDF15; 112-аминокислотный полипептид GDF15 (аминокислоты 197-308 «полноразмерного» GDF15) представляет собой «зрелый» полипептид GDF15 (SEQ ID NO: 1). Если не указано иное, термин «GDF15» относится к зрелой последовательности человека длиной 112 аминокислот. Кроме того, численные упоминания конкретных остатков GDF15 относятся к зрелой последовательности длиной 112 аминокислот (т.е. остаток 1 представляет собой Ala (A), а остаток 112 представляет собой Ile (I); см. SEQ ID NO: 1). Следует отметить, что хотя аминокислотная последовательность предшественника GDF15 позволяет предсказать три сайта вырезания, что приводит к трем гипотетическим формам «зрелого» GDF15 человека (т.е. длиной 110, 112 и 115 аминокислот), 112-аминокислотная зрелая последовательность принята за правильный вариант.

[0095] Рамки настоящего изобретения включают ортологи GDF15 и их модифицированные формы, полученные из других видов млекопитающих, в том числе мыши (NP_035949), шимпанзе (XP_524157), орангутанга (XP_002828972), резуса (EHH29815), гигантской панды (XP_002912774), гиббона (XP_003275874), морской свинки (XP_003465238), хорька (AER98997), коровы (NP_001193227), свиньи (NP_001167527), собаки (XP_541938) и утку (Ornithorhynchus anatinus; AFV61279), а также их применение. Зрелая форма GDF15 человека обладает приблизительно 67% идентичностью аминокислотной последовательности по сравнению с ортологом мыши.

[0096] Для удобства, модифицированные молекулы GDF15 человека, варианты GDF15 (например, мутеины) и модифицированные мутеины GDF15, описанные далее, совместно называются далее в настоящем документе «полипептидом(ами)». Следует отметить, что любое упоминание «человека» в связи с полипептидами и молекулами нуклеиновых

кислот согласно настоящему изобретению не означает ограничения в отношении способа или источника получения указанного полипептида или нуклеиновой кислоты, а лишь относится к последовательности, поскольку она может соответствовать последовательности естественного полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты человека. В конкретных вариантах реализации молекулы модифицированного GDF15 человека представляют собой N-гликозилированные димеры. В определенных вариантах реализации молекулы модифицированного GDF15 человека представляют собой N-гликозилированные гомодимеры. Кроме полипептидов человека и молекул нуклеиновых кислот, кодирующих их, в настоящем изобретении рассматриваются полипептиды, родственные GDF15, и соответствующие молекулы нуклеиновых кислот из других видов.

А. Полипептиды с желательными физическими свойствами

[0097] В настоящем изобретении, в частности, рассматриваются полипептиды, содержащие непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (зрелому GDF15 человека длиной 112-аминокислот). Полипептиды могут содержать одну или более аминокислотных замен и/или делеций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах реализации, кроме аминокислотных замен, полипептиды согласно настоящему изобретению могут также содержать делеции аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации полипептиды согласно настоящему изобретению могут содержать делеции аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

[0098] Для удобства и ясности, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 используют в качестве эталонной последовательности для полипептидов, представленных в настоящем документе. Следовательно, положения аминокислот в настоящем документе пронумерованы по отношению к SEQ ID NO: 1. Последовательность SEQ ID NO: 1 представлена ниже:

[0099] ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTQYDDLAKDC
HCl

[00100] В некоторых вариантах реализации полипептиды согласно настоящему изобретению могут включать одну, две, три или более аминокислотные замены, добавления или делеции, внедряющие один или более консенсусный(х) сайт(ов) N-связанного гликозилирования в области, где такой сайт отсутствует в SEQ ID NO: 1.

Консенсусный сайт N-связанного гликозилирования содержит последовательность NXS/T, где N представляет собой Asn; X - любая аминокислота, кроме пролина, после которой находится Ser (S) или Thr (T).

[00101] Примеры полипептидов согласно настоящему изобретению включают полипептиды, содержащие один, два, три, четыре или более консенсусных сайтов гликозилирования (например, консенсусных сайтов N-связанного гликозилирования) в аминокислотном положении, где такой сайт отсутствует в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[00102] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO: 1, обеспечивающую образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положении замещения (например, последовательность NGD в SEQ ID NO: 1 можно заменить на NGT/S путем одной замены; положение замещения подчеркнуто). В других случаях полипептид может содержать две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1, обеспечивающие образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положениях замещения (например, последовательность KTD в SEQ ID NO: 1 можно заменить на NTT/S путем двух замен; положения замещения подчеркнуты). В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать три аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1, обеспечивающие образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положениях замещения (например, последовательность GPG в SEQ ID NO: 1 можно заменить на NTT/S путем трех замен; положение замещения подчеркнуто).

[00103] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать одну или более аминокислотную делецию по сравнению с SEQ ID NO: 1, обеспечивающие образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положении делеции. Например, последовательность NGDHCPLGPGRCCRLHT в SEQ ID NO: 1 можно изменить путем делеции аминокислот D-H (подчеркнуты)), тем самым обеспечивая образование консенсусного сайта N-связанного гликозилирования: NGT.

[00104] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать добавление одной или более аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO: 1, обеспечивающие образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положении(ях) добавления. Пример внедрения консенсусного сайта N-связанного гликозилирования путем добавления одной аминокислоты включает добавление N к последовательности LHT в SEQ ID NO: 1, что позволяет получить последовательность LNHT, где NHT - консенсусный сайт N-связанного гликозилирования.

[00105] Как отмечено выше, полипептид может содержать одну или более аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO: 1, и замены можно нумеровать, как положение соответствующей аминокислоты в последовательности SEQ ID NO: 1.

[00106] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанная непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен по сравнению с соответствующими аминокислотами в последовательности SEQ ID NO: 1:

- [00107]** i) D5T и R21N или D5S и R21N;
- [00108]** ii) R16N и H18T или R16N и H18S;
- [00109]** iii) S23N и E25T или S23N и E25S;
- [00110]** iv) L24N и D26T или L24N и D26S;
- [00111]** v) S50N и F52T; S50N и F52S; F52N и A54T; или F52N и A54S;
- [00112]** vi) Q51N и R53T; Q51N и R53S; R53N и A55T; или R53N и A55S;
- [00113]** vi) S64N и H66T или S64N и H66S;
- [00114]** vii) L65N и R67T или L65N и R67S;
- [00115]** viii) S82N и N84T или S82N и N84S;
- [00116]** ix) K91N и D93T; K91N и D93S; D93N и G95T; или D93N и G95S;
- [00117]** x) T94N и V96T; T94N и V96S; V96N и L98T; или V96N и L98S;
- [00118]** xi) S97N и Q99T или S97N и Q99S; и
- [00119]** xii) A106N и D108T или A106N и D108S.

[00120] Например, замены, представленные выше в пункте i), означают, что полипептид содержит треонин (T) или серин (S) в аминокислотном положении, соответствующем аминокислотному положению 5 в SEQ ID NO: 1, причем в SEQ ID NO: 1 в аминокислотном положении 5 присутствует аспартат (D). Замену D в положении 5 на T или S можно обозначить как D5T/S. Положение соответствующей аминокислоты в полипептиде по сравнению с SEQ ID NO: 1 можно определить путем выравнивания аминокислотных последовательностей.

[00121] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать две аминокислотные замены (пару замен), обеспечивающие образование одной консенсусной последовательности N-гликозилирования в положении, где консенсусная последовательность N-гликозилирования отсутствует в SEQ ID NO: 1. Примеры таких замен включают R16N и H18T/S; K91N и D93T/S; T94N и V96T/S; и другие замены, перечисленные выше. R16N и H18T/S означают, что полипептид содержит N в

положении, соответствующем положению 16 SEQ ID NO: 1, причем в SEQ ID NO: 1 там присутствует R, и полипептид содержит T или S в положении, соответствующем положению 18 в SEQ ID NO: 1, где присутствует H. Поскольку последовательность RXH (в положениях 16-18) в SEQ ID NO: 1 не содержит остатков консенсусной последовательности N-связанного гликозилирования, указанная пара замен приводит к внедрению консенсусной последовательности N-связанного гликозилирования.

[00122] В альтернативных вариантах реализации одиночной аминокислотной замены может быть достаточно для появления консенсусной последовательности N-связанного гликозилирования, например, поскольку последовательность NGD (в положении 3-5) присутствует в SEQ ID NO: 1, единственная замена D на T или S приводит к образованию последовательности NGT или NGS, соответственно, которые представляют собой консенсусные последовательности N-гликозилирования.

[00123] В некоторых случаях в GDF15 дикого типа можно внедрить более одной консенсусной последовательности N-гликозилирования. Например, аминокислотную последовательность GDF15 дикого типа можно модифицировать путем замены и/или делеции, получая одну, две, три, четыре или более консенсусных последовательности N-гликозилирования. В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать 112-аминокислотную непрерывную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью 112-аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где 112 смежных аминокислот содержат одну, две, три, четыре или более консенсусных последовательности N-гликозилирования, например, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, 1-3 или 1-2 консенсусные последовательности N-гликозилирования.

[00124] Пример полипептида с двумя консенсусными последовательностями N-гликозилирования включает мутеин GDF15, содержащий T/C в положении 5 (по сравнению с SEQ ID NO: 1 и N в положении 21 (по сравнению с SEQ ID NO: 1)).

[00125] Типичные полипептиды согласно настоящему изобретению включают полипептиды, содержащие две или более консенсусные последовательности N-связанного гликозилирования. Например, полипептид может содержать комбинацию двух или более из следующих пар замены:

[00126] i) D5T и R21N или D5S и R21N;

[00127] ii) R16N и H18T или R16N и H18S;

[00128] iii) S23N и E25T или S23N и E25S;

[00129] iv) L24N и D26T или L24N и D26S;

[00130] v) S50N и F52T; S50N и F52S; F52N и A54T; или F52N и A54S;

[00131] vi) Q51N и R53T; Q51N и R53S; R53N и A55T; или R53N и A55S;

- [00132]** vi) S64N и H66T; или S64N и H66S;
- [00133]** vii) L65N и R67T; или L65N и R67S;
- [00134]** viii) S82N и N84T или S82N и N84S;
- [00135]** ix) K91N и D93T; K91N и D93S; D93N и G95T; или D93N и G95S;
- 5 **[00136]** x) T94N и V96T; T94N и V96S; V96N и L98T; или V96N и L98S;
- [00137]** xi) S97N и Q99T; или S97N и Q99S; и
- [00138]** xii) A106N и D108T или A106N и D108S.

[00139] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,
 10 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанная непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен по сравнению с соответствующими аминокислотами в последовательности SEQ ID NO: 1:

- [00140]** i) D5T и R21N или D5S и R21N;
- 15 **[00141]** ii) R16N и H18T или R16N и H18S;
- [00142]** iii) S23N и E25T или S23N и E25S;
- [00143]** iv) S50N и F52T; S50N и F52S; F52N и A54T; или F52N и A54S;
- [00144]** v) Q51N и R53T; Q51N и R53S; R53N и A55T; или R53N и A55S;
- [00145]** vi) S64N и H66T; или S64N и H66S;
- 20 **[00146]** vii) K91N и D93T; K91N и D93S; D93N и G95T; или D93N и G95S;
- [00147]** viii) T94N и V96T; T94N и V96S; V96N и L98T; или V96N и L98S;
- [00148]** ix) S97N и Q99T; или S97N и Q99S; и
- [00149]** x) A106N и D108T или A106N и D108S;

[00150] где замена создает один или более консенсусный сайт N-связанного
 25 гликозилирования, содержащий последовательность NXS/T, где N представляет собой Asn; X - любая аминокислота, кроме пролина, после которой находится Ser (S) или Thr (T), и, кроме того, один или более из консенсусных сайтов N-связанного гликозилирования связаны с N-гликаном. В дополнительном варианте реализации полипептид образует димер. В дополнительном варианте реализации полипептид
 30 укорочен по N-концу и/или C-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1. Полипептид может быть укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом, например, SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте реализации полипептид укорочен на первые три N-концевых остатка GDF15 (ΔARN или ΔN3). В дополнительном варианте реализации полипептид обладает растворимостью по
 35 меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл,

по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл или по меньшей мере 25 мг/мл, например, растворимостью в диапазоне от 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 20 мг/мл, от 3 мг/мл до 25 мг/мл, от 3 мг/мл до 20 мг/мл, от 5 мг/мл до 25 мг/мл, от 5 мг/мл до 20 мг/мл или от 5 мг/мл до 18 мг/мл в буферном растворе. В некоторых случаях полипептид обладает растворимостью по меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл или по меньшей мере 25 мг/мл, например, растворимостью в диапазоне от 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 20 мг/мл, от 3 мг/мл до 25 мг/мл, от 3 мг/мл до 20 мг/мл, от 5 мг/мл до 25 мг/мл, от 5 мг/мл до 20 мг/мл или от 5 мг/мл до 18 мг/мл в буферном растворе. Буфер может представлять собой фосфатный буфер, трис-буфер, HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер и т.п. или их комбинацию. В некоторых случаях буфер может содержать физиологический раствор с фосфатным буфером. В некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия и хлорид натрия. В некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия, хлорид натрия и муравьиную кислоту. Например, буфер может содержать 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ фосфата калия, 100-200 мМ хлорида натрия и 10-30 мСм/см муравьиной кислоты. В дополнительных вариантах реализации полипептид снижает уровень глюкозы в крови, массу тела и/или потребление пищи по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с состоянием до введения полипептида.

[00151] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанная непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен по сравнению с соответствующими аминокислотами в последовательности SEQ ID NO: 1:

- [00152]** i) D5T и R21N;
- [00153]** ii) S23N и E25T;
- [00154]** iii) F52N и A54T;
- [00155]** iv) R53N и A55T;
- [00156]** v) S64N и H66T;
- [00157]** vi) K91N и D93T;

[00158] vii) D93N и G95T;

[00159] viii) S97N и Q99T; и

[00160] ix) A106N и D108T;

[00161] где замена создает один или более консенсусный сайт N-связанного
5 гликозилирования, содержащий последовательность NXS/T, где N представляет собой
Asn; X - любая аминокислота, кроме пролина, после которой находится Ser (S) или Thr
(T), и, кроме того, один или более из консенсусных сайтов N-связанного
гликозилирования связаны с N-гликаном. В дополнительном варианте реализации
полипептид образует димер. В дополнительном варианте реализации полипептид
10 укорочен по N-концу и/или C-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1. Полипептид может
быть укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более аминокислот по
сравнению с эталонным полипептидом, например, SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте
реализации полипептид укорочен на первые три N-концевых остатка GDF15 (Δ ARN или
 Δ N3). В дополнительном варианте реализации полипептид обладает растворимостью по
15 меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл,
по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по
меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей
мере 20 мг/мл или по меньшей мере 25 мг/мл, например, растворимостью в диапазоне от
0,5 мг/мл до 25 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 20
20 мг/мл, от 3 мг/мл до 25 мг/мл, от 3 мг/мл до 20 мг/мл, от 5 мг/мл до 25 мг/мл, от 5 мг/мл до
20 мг/мл или от 5 мг/мл до 18 мг/мл в буферном растворе. В некоторых случаях
полипептид обладает растворимостью по меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей
мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4
мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по
25 меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл или по меньшей мере 25 мг/мл,
например, растворимостью в диапазоне от 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл,
от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 20 мг/мл, от 3 мг/мл до 25 мг/мл, от 3 мг/мл до 20
мг/мл, от 5 мг/мл до 25 мг/мл, от 5 мг/мл до 20 мг/мл или от 5 мг/мл до 18 мг/мл в
буферном растворе. Буфер может представлять собой фосфатный буфер, трис-буфер,
30 HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер и т.п. или их комбинацию. В некоторых
случаях буфер может содержать физиологический раствор с фосфатным буфером. В
некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия и хлорид натрия. В
некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия, хлорид натрия и
муравьиную кислоту. Например, буфер может содержать 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ
35 фосфата калия, 100-200 мМ хлорида натрия и 10-30 мСм/см муравьиной кислоты. В

дополнительных вариантах реализации полипептид снижает уровень глюкозы в крови, массу тела и/или потребление пищи по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с состоянием до введения полипептида. В конкретных вариантах реализации полипептид содержит или состоит в основном из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30. В конкретных вариантах реализации полипептид содержит или состоит в основном из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 100. В определенных вариантах реализации полипептид может содержать непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанная непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен по сравнению с соответствующими аминокислотами в последовательности SEQ ID NO: 1:

- [00162]** i) D5T и R21N;
- [00163]** ii) S64N и H66T;
- [00164]** iii) K91N и D93T;
- [00165]** iv) D93N и G95T; и
- [00166]** v) S97N и Q99T; где замена создает один или более консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, содержащий последовательность NXS/T, где N представляет собой Asn; X - любая аминокислота, кроме пролина, после которой находится Ser (S) или Thr (T), и, кроме того, один или более из консенсусных сайтов N-связанного гликозилирования связаны с N-гликаном; кроме того, полипептид образует димер; и, кроме того, полипептид обладает растворимостью по меньшей мере 1 мг/мл в буферном растворе.

[00167] В дополнительных вариантах реализации полипептид обладает растворимостью по меньшей мере 5 мг/мл в буферном растворе. Буфер может представлять собой фосфатный буфер, трис-буфер, HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер и т.п. или их комбинацию. В некоторых случаях буфер может содержать физиологический раствор с фосфатным буфером. В некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия и хлорид натрия. В некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия, хлорид натрия и муравьиную кислоту. Например, буфер может содержать 10-100 mM трис (pH 7), 1-50 mM фосфата калия, 100-200 mM хлорида натрия и 10-30 мСм/см муравьиной кислоты. В дополнительных вариантах реализации полипептид снижает уровень глюкозы в крови, массу тела и/или потребление пищи по

меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с состоянием до введения полипептида. В дополнительном варианте реализации полипептид укорочен по N-концу и/или C-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1. Полипептид может быть укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом, например, SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте реализации полипептид укорочен на первые три N-концевых остатка GDF15 (Δ ARN или Δ N3). В конкретных вариантах реализации полипептид содержит или состоит в основном из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 30. В конкретных вариантах реализации полипептид содержит или состоит в основном из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 100.

[00168] В некоторых вариантах реализации полипептид может содержать 112-аминокислотную непрерывную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью 112-аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, где 112 смежных аминокислот содержат одну, две, три, четыре или более из пар замен, представленных выше.

[00169] На фигуре 1 изображены аминокислотные последовательности типичных полипептидов (с номерами от 1 до 17), рассматриваемые в настоящем изобретении, выровненные с аминокислотной последовательностью зрелого GDF15 дикого типа человека (дт hGDF15; SEQ ID NO: 1). На фигуре 1 изображены полипептиды, содержащие два консенсусных сайта N-связанного гликозилирования (мутант номер 1; SEQ ID NO: 2), а также полипептиды, содержащие один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования (мутанты номер 2-17; SEQ ID NO: 3-18, соответственно).

[00170] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рассматривается модифицированный N-гликозилированный димер GDF15, причем указанный димер содержит два полипептида, описанных в настоящем документе, ковалентно присоединенные к друг другу. В конкретных вариантах реализации указанные два полипептида содержат аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 5 аминокислот; причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В конкретных вариантах реализации указанные два полипептида содержат аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 5 аминокислот; причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным.

NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 2 аминокислот; причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В конкретных вариантах реализации каждый из указанных двух полипептидов состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 100 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 5 аминокислот; причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В конкретных вариантах реализации каждый из указанных двух полипептидов состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 100 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 2 аминокислот; причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В дополнительных вариантах реализации модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 является гомодимером, соединенным межцепочечной дисульфидной связью. В дополнительных вариантах реализации модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 является гомодимером, содержащим два полипептида, описанные в настоящем документе, каждый из которых содержит одинаковую аминокислотную последовательность, причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным.

[00171] В настоящем изобретении также рассматриваются полипептиды, представляющие собой активные фрагменты (например, подпоследовательности) полипептидов, описанных выше. Длина активных фрагментов или подпоследовательностей может составлять от 40 до 111 аминокислот, например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 106, 109 или до 111 аминокислот.

[00172] Полипептиды обладают заданой идентичностью последовательности по сравнению с эталонной последовательностью на протяжении непрерывной последовательности аминокислот заданной длины (например, «окна сравнения»). Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита-Ватермана (Smith & Waterman), Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания

гомологии Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch), J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью метода поиска подобия Пирсона-Липмана (Pearson & Lipman), Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Мэдисон, штат Висконсин, США), или ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 приложение)).

[00173] Например, подходящий полипептид может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 98%, или по меньшей мере на приблизительно 99% идентичную непрерывной цепи из 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или до 112 аминокислот из SEQ ID NO : 1.

[00174] Типичные фрагменты полипептидов, описанных в настоящем документе, включают полипептиды, содержащие аминокислотные делеции по сравнению с SEQ ID NO: 1. Например, полипептиды могут быть укорочены по N-концу и/или по C-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1. Полипептид может быть укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом, например, SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации исследуемый полипептид может содержать одну или более замен, позволяющих внедрить консенсусную последовательность N-связанного гликозилирования, например, описанную в настоящем документе, и укорочен по N-концу и/или C-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1.

[00175] В некоторых вариантах реализации длина полипептида может составлять по меньшей мере 98 аминокислот, а его аминокислотная последовательность может быть по меньшей мере на 90% идентична соответствующей 98-аминокислотной цепи SEQ ID NO: 1. Полипептид может не содержать первых трех-четырнадцати аминокислот (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот), присутствующих на N-конце SEQ ID NO: 1, но сохранять аминокислоты, присутствующие на C-конце SEQ ID NO:1. Другими словами, удаленная(ые) аминокислота(ы) соответствуют N-концевым аминокислотам SEQ ID NO: 1.

[00176] В некоторых вариантах реализации длина мутеина GDF15 может составлять по меньшей мере 106 аминокислот, а его аминокислотная последовательность может быть по меньшей мере на 90% идентична соответствующей 106-аминокислотной цепи SEQ ID NO: 1. Мутеин GDF15 может не содержать первые шесть аминокислот, присутствующие на N-конце SEQ ID NO: 1.

[00177] В некоторых вариантах реализации длина полипептида может составлять по меньшей мере 109 аминокислот, а его аминокислотная последовательность может быть по меньшей мере на 90% идентична соответствующей 109 аминокислотной цепи SEQ ID NO: 1. Мутеин GDF15 может не содержать первые три аминокислоты, присутствующие на N-конце SEQ ID NO: 1.

[00178] Типичные полипептиды согласно настоящему изобретению изображены на фигуре 2. Типичные полипептиды (номера 1-17), показанные на рисунке 1, имеют такую же длину, как и дт hGDF15. Длина типичных полипептидов (номера 18-34; SEQ ID NO: 19-35), изображенных на фигуре 2, составляет 109 аминокислот, и они содержат делецию трех N-концевых аминокислот ($\Delta N3$) по сравнению с дт hGDF15. Однако при упоминании положения аминокислотных замен указанный номер остатка представляет собой остаток, соответствующий положению в зрелом hGDF15 дт (дт; SEQ ID NO: 1). Таким образом, аминокислота G на N-конце полипептидов относится к остатку 4, хотя она представляет собой первую аминокислоту в аминокислотной последовательности полипептида.

[00179] Как отмечалось выше, фрагменты полипептидов могут содержать одну или более из аминокислотных замен, внедряющих консенсусную последовательность N-гликозилирования по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1, например, одну, две или более аминокислотных замен, описанных в настоящем документе.

[00180] Как указано выше и подробно описано ниже, полипептиды согласно настоящему изобретению можно модифицировать путем, например, ПЭГилирования (ковалентного присоединения одной или более молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) или их производных); гликозилирования (например, N-гликозилирования), полисиалирования; образования гибридных молекул с альбумином, содержащих сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), сывороточный альбумин яванского макака или бычий сывороточный альбумин (БСА)); связывания с альбумином через, например, конъюгированную цепь жирной кислоты (ацилирования); объединения с Fc; и объединения с имитатором ПЭГ. В некоторых вариантах реализации модификации вводят сайт-специфическим образом. В других вариантах реализации модификация включает линкер. Линкер может конъюгировать модифицирующую группу с полипептидом.

[00181] В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения рассматривается модификация зрелого GDF15 человека и мутеинов GDF15 (например, полипептидов, описанных выше) путем конъюгации с альбумином. В других вариантах реализации настоящего изобретения рассматривается модификация полипептидов посредством N-гликозилирования или O-гликозилирования. Характеристики конъюгатов альбуминов и

полипептида (например, гибридных белков) и гликозилированных полипептидов описаны далее.

Конкретные модификации с целью изменения и/или имитации функции GDF15

5 **[00182]** Полипептид может включать одну или более из модификаций, улучшающих желательные свойства белка в составе для терапии (например, период полужизни в сыворотке), позволяющих вызывать образование антител для использования в обнаруживающих анализах (например, маркеры эпитопов), обеспечивающих простоту очистки белка и т.д. Такие модификации включают ПЭГилирование (ковалентное
10 присоединение одной или более молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) или их производных); гликозилирование (N - и O-связанное); полисиалирование; объединение с альбумином; связывание с альбумином через конъюгированную цепь жирной кислоты (ацилирование); Fc-гибридные белки; и объединение с имитатором ПЭГ, но не ограничиваются ими.

[00183] Как изложено в настоящем документе, в настоящем изобретении
15 рассматриваются гибридные молекулы, содержащие зрелый полипептид GDF15 (например, зрелый GDF15 человека) или мутеиновый полипептид GDF15 (например, мутеин зрелого GDF15 человека), где зрелый полипептид GDF15 или мутеиновый полипептид GDF15 содержит по меньшей мере одну модификацию, не влияющую на его аминокислотную последовательность, которой модификация улучшает хотя бы одно
20 физическое свойство полипептида или мутеинового полипептида. В одном варианте реализации модификация полипептида GDF15 или мутеинового полипептида GDF15 включает конъюгирование с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), сывороточным альбумином яванского макака или бычьим сывороточным альбумином (БСА)). В некоторых вариантах реализации
25 физическое свойство представляет собой растворимость.

[00184] В вариантах реализации, где гибридная молекула содержит модифицированный полипептид GDF15 или мутеин GDF15 (например, полипептиды, описанные выше), любой из которых конъюгирован с альбумином, общая растворимость гибридной молекулы улучшается по сравнению с неконъюгированным рекомбинантным GDF15
30 человека. В некоторых вариантах реализации гибридная молекула обладает растворимостью, составляющей по меньшей мере 1 мг/мл в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) при pH 7,0. В других вариантах реализации гибридная молекула обладает растворимостью, составляющей по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл или по меньшей мере 5 мг/мл. В других вариантах
35 реализации гибридная молекула обладает растворимостью, составляющей по меньшей

мере 6 мг/мл в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) при pH 7,0, по меньшей мере 7 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 9 мг/мл или по меньшей мере 10 мг/мл. В конкретных вариантах реализации гибридная молекула обладает растворимостью более 10 мг/мл.

5 **[00185]** ПЭГилирование: Клиническая эффективность белковых терапевтических средств часто ограничена коротким времени полужизни в плазме и подверженностью к разложению за счет протеаз. Исследования различных терапевтических белков (например, филграстима) показали, что такие сложности можно преодолеть за счет различных модификаций, включая конъюгирование или связывание последовательности
10 полипептида с любым из различных небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем или полиоксикалканами (см., например, обычно за счет связывающей группы, ковалентно связанной с белком и небелковым полимером, например, ПЭГ). Показано, что такие ПЭГ-конъюгированные биомолекулы обладают клинически полезными свойствами, включая улучшенную
15 физическую и термическую стабильность, защиту от ферментативного разложения, повышенную растворимость, более длительное время полужизни в кровотоке *in vivo* и пониженный клиренс, пониженную иммуногенность и антигенность и пониженную токсичность.

[00186] Молекулы ПЭГ, подходящие для конъюгирования с последовательностью
20 полипептида, обычно растворимы в воде при комнатной температуре и обладают общей формулой $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R - атом водорода или защитная группа, например, алкильная или алканольная группа, и где n — целое число от 1 до 1000. Если R представляет собой защитную группу, она обычно содержит от 1 до 8 атомов углерода. ПЭГ, конъюгированный с последовательностью полипептида, может быть линейным или
25 разветвленным. Разветвленные производные ПЭГ, «звездчатые ПЭГ» и многолучевые ПЭГ рассматриваются в настоящем изобретении. Молекулярная масса ПЭГ, используемого в настоящем изобретении, не ограничивается каким-либо определенным диапазоном, однако в некоторых вариантах реализации молекулярная масса составляет от 500 до 20000, а в других вариантах реализации - от 4000 до 10000.

30 **[00187]** В настоящем изобретении также рассматриваются композиции конъюгатов, где ПЭГ характеризуется различными значениями n и, таким образом, присутствуют различные ПЭГ в определенных соотношениях. Например, некоторые композиции содержат смесь конъюгатов, где n = 1, 2, 3 и 4. В некоторых композициях доля конъюгатов, где n = 1, составляет 18-25%, доля конъюгатов, где n = 2, составляет 50-66%,
35 доля конъюгатов, где n = 3, составляет 12-16% и доля конъюгатов, где n = 4, составляет до

5%. Такие композиции можно получить с использованием условий реакции и способов очистки, известных в данной области техники. Например, катионообменную хроматографию можно использовать для разделения конъюгатов, а затем определить фракцию, содержащую конъюгат с, например, желательным количеством присоединенных молекул ПЭГ, очистить от немодифицированных белковых последовательностей и от конъюгатов с другим количеством присоединенных молекул ПЭГ.

[00188] ПЭГ можно присоединить к полипептиду согласно настоящему изобретению за счет концевой реакционноспособной группы. Концевая реакционноспособная группа может опосредовать связь между свободной amino- или карбоксильной группой одной или более из полипептидных последовательностей и полиэтиленгликолем. Концевую реакционноспособную группу можно присоединить к полиэтиленгликолевому спейсеру дискретной длины. Эти ПЭГ-спейсеры увеличивают растворимость реагента и конъюгата, минимизируют токсические и иммунологические эффекты по сравнению со спейсерами, не содержащими ПЭГ, и позволяют получить несколько вариантов конкретных дистанций перекрестного сшивания между ПЭГ и полипептидом. Типичные ПЭГ-спейсеры с реакционноспособными группами содержат реакционноспособные по отношению к аминокетам пэгиллированные перекрестные линкеры (например, бис(сукцинимид)пента(этиленгликоль) ($BS(ПЭГ)_5$)); реакционноспособные по отношению к сульфгидрильным группам пэгиллированные перекрестные линкеры (1,11-бис-малеимидтриэтиленгликоль ($BM(ПЭГ)_3$)); бифункциональные пэгиллированные перекрестные линкеры (сложный эфир NHS-ПЭГn-малеимидсукцинимидил-([N-малеимидпропионамид]-этиленгликоля) ($SM(ПЭГ)_n$); $n = 2-24$). ПЭГ-спейсер можно связать со свободной аминокетом. ПЭГ-спейсеры включают N-гидроксисукцинимидполиэтиленгликоль, который можно получить путем активации сложного эфира янтарной кислоты и полиэтиленгликоля N-гидроксисукцинимидом. Еще один активированный полиэтиленгликоль, который можно связать со свободной аминокетом, представляет собой 2,4-бис-(O-метоксиполиэтиленгликоль)-6-хлор-s-триазин, который можно получить путем взаимодействия монометилового эфира полиэтиленгликоля с цианурхлоридом. Активированный полиэтиленгликоль, связанный со свободной карбоксильной группой, включает полиоксиэтилендиамин.

[00189] Конъюгирование одной или более из полипептидных последовательностей согласно настоящему изобретению с ПЭГ, содержащим спейсер, можно осуществить различными известными способами. Например, реакцию конъюгирования можно осуществить в растворе при pH от 5 до 10, при температуре от 4 °C до комнатной

температуры, в течение времени от 30 минут до 20 часов, используя молярное отношение реагента к белку от 4:1 до 30:1. Можно выбрать условия реакции, направляющие реакцию в сторону преимущественного получения желательной степени замещения. В целом, низкая температура, низкий pH (например, $\text{pH} = 5$) и короткое время реакции, как правило, снижают количество присоединенных молекул ПЭГ, в то время как высокая температура, нейтральный или высокий pH (например, $\text{pH} \geq 7$), а также более длительное время реакции, как правило, увеличивают количество присоединенных молекул ПЭГ. Для остановки реакции можно использовать различные средства, известные в данной области техники. В некоторых вариантах реализации реакцию останавливают путем подкисления реакционной смеси и замораживания, например, при -20°C .

[00190] В настоящем изобретении также рассматривается применение имитаторов ПЭГ. Разработаны рекомбинантные имитаторы ПЭГ, сохраняющие свойства ПЭГ (например, повышенное время полужизни в сыворотке) и при этом придающие конъюгату некоторые дополнительные выгодные свойства. Например, простые полипептидные цепи (содержащие, например, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser и Thr), способные образовывать развернутую конформацию, аналогичную ПЭГ, можно получить рекомбинантными способами в уже объединенном виде с исследуемым пептидным или белковым лекарственным средством (например, с помощью технологии Amunix' XTEN, Маунтин-Вью, штат Калифорния, США). Это устраняет необходимость в дополнительном этапе конъюгирования в процессе производства. Кроме того, установленные молекулярно-биологические методики позволяют контролировать состав боковой цепи полипептидных цепей, что позволяет оптимизировать иммуногенность и производственные свойства.

[00191] Гликозилирование: Для целей настоящего изобретения подразумевается, что «гликозилирование» в широком смысле относится к ферментативному процессу присоединения гликанов к белкам, липидам или другим органическим молекулам. Использование термина "гликозилирование" в сочетании с настоящим изобретением, как правило, означает добавление или удаление одной или более из углеводных групп (путем удаления основного сайта гликозилирования или путем устранения гликозилирования химическими и/или ферментативными средствами), и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которые могут или не могут присутствовать в нативной последовательности. Кроме того, эта фраза включает качественные изменения гликозилирования нативных белков, связанные с изменением природы и пропорции различных присутствующих углеводных остатков.

[00192] Гликозилирование может существенно влиять на физические свойства белков и может иметь важное значение для стабильности, секреции и субклеточной локализации

белка. Фактически, гликозилирование мутеиновых полипептидов GDF15, описанных в настоящем документе, выгодно улучшает их физические свойства. В качестве неограничивающего примера, растворимость мутеинов GDF15 можно улучшить путем гликозилирования, и такое улучшение может быть значительным (см. раздел «Примеры»).

5 Гликозилированные мутеиновые полипептиды GDF15, описанные в настоящем документе, обладают более высокой растворимостью по сравнению с негликозилированным GDF15 дикого типа. В некоторых вариантах реализации гликозилированные мутеины GDF15, описанные в настоящем документе, обладают растворимостью по меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 1 мг/мл, по
10 меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл или по меньшей мере 25 мг/мл, например, растворимостью в диапазоне от 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 20 мг/мл, от 3 мг/мл до 25 мг/мл, от 3 мг/мл до 20 мг/мл, от 5
15 мг/мл до 25 мг/мл, от 5 мг/мл до 20 мг/мл или от 5 мг/мл до 18 мг/мл в буферном растворе. В некоторых случаях гликозилированные мутеины GDF15, описанные в настоящем документе, могут обладать растворимостью по меньшей мере 0,5 мг/мл, например, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10
20 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл или по меньшей мере 25 мг/мл, например, растворимостью в диапазоне от 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, от 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 20 мг/мл, от 3 мг/мл до 25 мг/мл, от 3 мг/мл до 20 мг/мл, от 5 мг/мл до 25 мг/мл, от 5 мг/мл до 20 мг/мл или от 5 мг/мл до 18 мг/мл в буферном растворе. Буфер может представлять собой фосфатный буфер, трис-буфер,
25 HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер и т.п. или их комбинацию. В некоторых случаях буфер может содержать физиологический раствор с фосфатным буфером. В некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия и хлорид натрия. В некоторых случаях буфер может содержать трис, фосфат калия, хлорид натрия и муравьиную кислоту. Например, буфер может содержать 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ
30 фосфата калия, 100-200 мМ хлорида натрия и 10-30 мСм/см муравьиной кислоты.

[00193] Гликозилированные мутеиновые полипептиды GDF15, описанные в настоящем документе, превосходят зрелый полипептид GDF15 дикого типа. Эти гликозилированные мутеиновые полипептиды GDF15 обладают улучшенными характеристиками по сравнению со зрелым полипептидом GDF15 дикого типа, включая одно или более из:
35 повышенный выход в культуре клеток, улучшенное образование димеров, повышенную

растворимость, а также пониженную иммуногенность, но не ограничиваясь ими. Улучшение растворимости, демонстрируемое такими модифицированными мутеинами GDF15, может, например, включать получение составов, более подходящих для фармацевтического введения, чем негликозилированный GDF15/мутеины GDF15.

5 Гликозилированный GDF15/мутеиновые полипептиды GDF15 также могут демонстрировать повышенную стабильность. Кроме того, можно улучшить одно или несколько из фармакокинетических свойств полипептидов, например, период полужизни.

[00194] Добавление сайтов гликозилирования можно осуществить путем изменения аминокислотной последовательности, как описано выше. Изменение полипептида можно
10 осуществить, например, путем добавления или замены одного или более из остатков серина или треонина (для сайтов О-связанного гликозилирования) или аспарагина (для сайтов N-связанного гликозилирования). Структуры N-связанных и О-связанных олигосахаридов и остатков углеводов, обнаруживаемых при каждом типе, могут различаться. Один из углеводов, обычно присутствующий при обоих вариантах,
15 представляет собой N-ацетилнейраминовую кислоту (далее называемую сиаловой кислотой). Сиаловая кислота обычно является концевым остатком как N-связанных, так и О-связанных олигосахаридов и, за счет своего отрицательного заряда, может придавать гликопротеину кислые свойства. Конкретный вариант реализации настоящего изобретения включает получение и применение вариантов N-гликозилирования,
20 описанных выше.

[00195] Еще одним способом увеличения количества углеводных остатков в составе полипептида является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду.

[00196] Клетки яичника китайского хомяка (CHO), дефицитные по
25 дигидрофолатредуктазе (DHFR), представляют собой клетки-хозяева, обычно используемые для получения рекомбинантных гликопротеинов. Эти клетки не экспрессируют фермент бета-галактозид-альфа-2,6-сиалилтрансферазу и поэтому не присоединяют сиаловую кислоту с помощью альфа-2,6 связи к N-связанным олигосахаридам гликопротеинов, продуцируемых в этих клетках.

[00197] Полисиалирование: В настоящем изобретении также рассматривается применение полисиалирования, конъюгирование пептидов и белков с естественной биоразлагаемой альфа-(2→8)-связанной полисиаловой кислотой ("PSA") с целью
30 улучшения их стабильности и фармакокинетики *in vivo*. PSA является биоразлагаемым, нетоксичным природным полимером, обладающим высокой гидрофильностью, что
35 придает ему значительную кажущуюся молекулярную массу в крови и повышает его

период полужизни в сыворотке. Кроме того, полисиалирование ряда пептидных и белковых терапевтических средств привело к заметно пониженному протеолизу, сохранению активности *in vivo* и снижению иммуногенности и антигенных свойств (см., например, G. Gregoriadis et al., *Int. J. Pharmaceutics* 300(1-2):125-30). Как и в случае с модификациями за счет других конъюгатов (например, ПЭГ), доступны различные методики сайт-специфического полисиалирования (см, например, T. Lindhout et al., *PNAS* 108(18)7397-7402 (2011)).

[00198] Гибридные белки. В настоящем изобретении рассматриваются гибридные белки на основе зрелого GDF15 дикого типа (например, GDF15 человека), а также гибридные белки на основе полипептидов согласно настоящему изобретению (например, модифицированные молекулы GDF15 человека, мутеины GDF15 человека, модифицированные мутеины GDF15 и т.п.). Такие гибридные белки, как правило, содержат полипептид, не являющийся GDF15 (например, альбумин (например, ЧСА) или его фрагмент: альбумин-связывающий домен (ABD); Fc-полипептид; мальтоза-связывающий домен (MBD), которые могут называться в настоящем документе "партнером по объединению", конъюгированные с полипептидом GDF15 дикого типа или полипептидом согласно настоящему изобретению по его N-концу или C-концу. Партнер по объединению необязательно можно конъюгировать с GDF15 дикого типа или полипептидом посредством полипептидного линкера. Линкерный полипептид необязательно может представлять собой расщепляемый линкер, например, ферментативно расщепляемый линкер. Примеры партнеров по объединению описаны ниже.

[00199] Гибриды с альбумином: Подходящие для конъюгирования партнеры по объединению включают альбумины, например, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), сывороточный альбумин яванского макака и бычий сывороточный альбумин (БСА).

[00200] Зрелый ЧСА, полипептид длиной 585 аминокислот (~ 67 кДа), обладающий периодом полужизни в сыворотке ~ 20 дней, в первую очередь отвечает за поддержание коллоидного осмотического давления крови, pH крови, а также транспортировку и распределение многочисленных эндогенных и экзогенных лигандов. Белок содержит три структурно гомологичных домена (домены I, II и III), почти полностью находящиеся в альфа-спиральной конформации и жестко стабилизированные 17 дисульфидными мостиками. Три основные области в составе альбумина, связывающие лекарственные вещества, находятся в каждом из трех доменов в пределах поддоменов IB, IIА и IIIА.

[00201] Синтез альбумина происходит в печени, которая продуцирует короткоживущий первичный продукт препроальбумин. Таким образом, полноразмерный ЧСА содержит сигнальный пептид длиной 18 аминокислот с последующим продоменом длиной 6 аминокислот; этот пептид длиной 24 аминокислотных остатка можно называть препродоменом. ЧСА можно экспрессировать и секретировать, используя его эндогенный сигнальный пептид в качестве препродомена. В качестве альтернативы, ЧСА можно экспрессировать и секретировать, используя сигнальный пептид IgK, объединенный со зрелым ЧСА. Препроальбумин быстро расщепляется одновременно с трансляцией в просвете эндоплазматического ретикулума по N-концу с образованием стабильного полипептида-предшественника длиной 609 аминокислот, проальбумина. Затем проальбумин транспортируется в аппарат Гольджи, где он преобразуется в зрелый альбумин длиной 585 аминокислот путем фуринзависимого N-концевого расщепления. Если не указано иное, «альбумин» или «зрелый альбумин» относится к ЧСА.

[00202] Первичная аминокислотная последовательность, структура и функции альбуминов являются высококонсервативными среди различных видов, как и процессы синтеза и секреции альбумина. Сывороточные альбуминовые белки, сопоставимые с ЧСА, обнаружены, например, у яванских макаков, коров, собак, кроликов и крыс. Среди видов животных, не являющихся человеком, бычий сывороточный альбумин (БСА) наиболее структурно сходен с ЧСА. [См., например, Kosa et al., J Pharm Sci. 96(11):3117-24 (Nov 2007)]. В настоящем изобретении рассматривается применение альбумина видов животных, не являющихся человеком, включая альбумин вышеизложенных животных, например, в гибридах с полипептидом GDF15, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах реализации вид животного, не являющийся человеком, является коровой. В некоторых вариантах реализации вид животного, не являющийся человеком, является яванским макаком.

[00203] Согласно настоящему изобретению, альбумин можно конъюгировать с молекулой лекарственного вещества (например, полипептидом, описанным в настоящем документе) по С-концу, N-концу, как С-, так и N-концу, или внутренней части (см., например, USP 5876969 и USP 7056701). Кроме того, в настоящем изобретении рассматриваются гибридные белки на основе альбумина, содержащие более одной гомологичной (например, несколько молекул мутеина GDF15) или гетерологичной (например, молекулу мутеина GDF15 и отдельный антидиабетический агент) молекулы лекарственного вещества.

[00204] В конъюгатах ЧСА-полипептид, рассматриваемых в настоящем изобретении, можно применять различные формы альбумина, например, варианты, например,

фрагменты ЧСА. Такие формы, как правило, обладают одной или более из желательных активностей альбумина. В дополнительных вариантах реализации настоящее изобретение включает гибридные белки, содержащие молекулу полипептидного лекарственного средства, прямо или косвенно объединенную с альбумином, фрагмент альбумина и вариант альбумина и т. д., причем гибридный белок обладает более высокой стабильности в плазме, чем негибридная молекула лекарственного вещества, и/или гибридный белок сохраняет терапевтическую активность негибридной молекулы лекарственного вещества. В некоторых вариантах реализации не прямое объединение осуществляют посредством линкера, например, пептидного линкера или его модифицированного варианта.

5 [00205] ЧСА можно конъюгировать посредством линкера с полипептидом, описанным в настоящем документе, с образованием гибридного белка. Примеры подходящих линкеров описаны ниже. В некоторых вариантах реализации рассматривается пептидный линкер, например, длиной от четырех до тридцати аминокислот.

10 [00206] В вариантах реализации, где гибридный белок содержит линкер, указанный линкер может быть нерасщепляемым линкером. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения описана гибридная молекула, в которой аминокислотную последовательность предшественника ЧСА или зрелого ЧСА объединяют с N-концом аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека или мутеина GDF15 посредством нерасщепляемого $(G_4S)_3$ линкера.

15 [00207] В других вариантах реализации, где гибридный белок содержит линкер, указанный линкер может быть расщепляемым линкером. Например, в настоящем изобретении рассматривается гибридная молекула, в которой аминокислотную последовательность предшественника ЧСА или аминокислотную последовательность зрелого ЧСА объединяют с N-концом аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека или мутеина GDF15, представленной в настоящем документе, посредством протеаза-чувствительного $(G_4S)_2$ линкера, расщепляемого фактором Ха.

20 [00208] Молекулы конструкторов ЧСА-расщепляемый линкер-зрелый рекомбинантный GDF15/мутеин GDF15, а также гибридные молекулы конструкторов зрелый рекомбинантный GDF15/мутеин GDF15-расщепляемый линкер-ЧСА можно использовать для облегчения оценки, например, растворимости и определения эффективности GDF15/мутеина GDF15 *in vivo*. В таких вариантах реализации GDF15/ мутеин GDF15 можно вырезать из шаперона ЧСА посредством внутриклеточного расщепления или посредством ферментативного расщепления *in vitro*. В некоторых вариантах реализации вырезание осуществляют путем протеолитического гидролиза расщепляемого линкера с использованием любой жизнеспособной протеазы. В других вариантах реализации

25
30
35

мутеины GDF15 также можно получить в виде гибридов, не содержащих ЧСА, посредством конструктора на основе сигнального пептида, объединенного с полипептидами, представленных в настоящем документе.

5 [00209] Внутриклеточное расщепление можно осуществлять ферментативным путем, например, с использованием фурина или каспазы. Клетка-хозяин, экспрессирующая гибридный белок, может на низком уровне экспрессировать эти эндогенные ферменты, способные расщеплять фрагмент гибридных молекул внутри клетки; так, некоторые из этих полипептидов секретируются клеткой в неконъюгированном с ЧСА виде, в то время как некоторые из полипептидов секретируются в виде гибридных молекул, содержащих

10 ЧСА. В вариантах реализации настоящего изобретения рассматривается применение различных гибридных конструкторов фурина. Например, можно разработать конструкторы, содержащие последовательность RGRR (SEQ ID NO: 36), RKRKKR (SEQ ID NO: 37), RKKR (SEQ ID NO: 38) или RRRKKR (SEQ ID NO: 39). Такие конструкторы могут содержать следующую общую структуру: Igk-ЧСА-(G₄S)₂-последовательность фурина-

15 hGDF15.

[00210] В настоящем изобретении также рассматривается внеклеточное расщепление (например, расщепление *ex vivo*), при котором гибридные молекулы выделяют из клетки, подвергают очистке, затем расщепляют (например, используя, например, линкер, чувствительный к протеазе фактора Ха или энтерокиназе). Следует понимать, что

20 указанное вырезание может привести к отщеплению от полипептида (например, зрелого GDF15 или мутеина GDF15) всего комплекса ЧСА-линкер, или фрагмента меньшего размера, чем весь комплекс ЧСА-линкер.

[00211] Как описано выше, объединение альбумина с одним или более полипептидами согласно настоящему изобретению можно, например, осуществить за счет генетической

25 манипуляции, так, что ДНК, кодирующую ЧСА или его фрагмент, присоединяют к ДНК, кодирующей одну или более из полипептидных последовательностей. После этого можно трансформировать или трансфицировать подходящего хозяина гибридными нуклеотидными последовательностями в виде, например, подходящей плазмиды, с целью экспрессии гибридного полипептида. Экспрессию можно осуществлять *in vitro* ,

30 например, в прокариотических или эукариотических клетках, или *in vivo* , например, в трансгенном организме. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения экспрессию гибридных белков осуществляют в линиях клеток млекопитающих, например, линиях клеток СНО. Термин «трансформация» широко используют в настоящем документе для обозначения генетической модификации клетки, возникающей вследствие

35 непосредственного поглощения, включения и экспрессии экзогенного генетического

материала (экзогенной ДНК) из окружения клетки и через клеточную мембрану(ы). Трансформация происходит в естественных условиях у некоторых видов бактерий, однако ее также можно осуществить искусственным путем в других клетках.

[00212] Кроме того, сам альбумин можно модифицировать для увеличения периода его полужизни в кровотоке. Объединение модифицированного альбумина с одним или более полипептидами согласно настоящему изобретению можно осуществить путем генетической манипуляции/рекомбинантных методик, описанных выше, или химического конъюгирования; полученная гибридная молекула обладает периодом полужизни, превышающим период полужизни гибридов с немодифицированным альбумином. (см., например, WO2011/051489).

[00213] Существуют отлаженные технологические платформы для генетического синтеза и химического конъюгирования полипептидов (например, полипептидов, описанных в настоящем документе) и рекомбинантного альбумина. Например, гибкую платформу ALBUFUSE® (Novozymes Biopharma A/S; Дания) можно применять для генетического объединения одной или более из рекомбинантных молекул альбумина с одним или более из полипептидов, что приводит к получению непрерывной кДНК, кодирующей полипептид(ы) и альбумин(ы), для получения единого гомогенного белка. Эту платформу можно использовать, например, с системами экспрессии на основе хозяйев-дрожжей и млекопитающих. В качестве дополнительного примера, гибкую платформу RECOMBUMIN® (Novozymes Biopharma A/S; Дания) можно применять для химического конъюгирования полипептидов согласно настоящему изобретению с рекомбинантным альбумином без дальнейшей модификации альбумина. Хотя конъюгирование можно выполнять по нескольким аминокислотным остаткам (например, лизина и тирозина), свободная тиоловая группа при Cys34 представляет собой распространенную стратегию из-за сайт-специфичности, позволяющей получить более однородный конечный продукт.

[00214] Альтернативные стратегии связывания альбумина: В качестве альтернативы прямому объединению разработано несколько стратегий связывания альбумина, в том числе связывание альбумина посредством конъюгированной цепи жирной кислоты (ацилирование). Поскольку сывороточный альбумин является транспортным белком для жирных кислот, эти природные лиганды с альбумином-связывающей активностью применяют для увеличения периода полужизни небольших терапевтических белков. Например, инсулин детермир (LEVEMIR), одобренный продукт для лечения диабета, содержит цепь миристиловой кислоты, конъюгированную с генетически модифицированным инсулином, что приводит к получению аналога инсулина длительного действия.

[00215] В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные белки, содержащие полипептидную последовательность альбумин-связывающего домена (ABD) и последовательность одного или более из полипептидов, описанных в настоящем документе. Любая последовательность ABD-полипептида, описанная в настоящем документе или в литературе, может являться одним из компонентов гибридных белков. Компоненты гибридных белков можно при необходимости ковалентно связать посредством линкера, например, линкеров, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гибридные белки содержат последовательность ABD-полипептида в виде N-концевой группы и полипептиды, описанные в настоящем документе, в виде С-концевой группы.

[00216] В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные белки, содержащие фрагмент альбумин-связывающего полипептида, причем указанный фрагмент в значительной степени сохраняет способность к связыванию альбумина; или мультимер альбумин-связывающих полипептидов или их фрагментов, содержащий по меньшей мере два альбумин-связывающих полипептида или их фрагмента в качестве мономерных единиц.

[00217] Безотносительно к какой-либо конкретной теории, считается, что полипептиды, описанные в настоящем документе, связываются с последовательностью ABD-полипептида, тем самым секвестрируя полипептиды в организме субъекта, что приводит к увеличению продолжительности действия в организме субъекта.

[00218] Общее обсуждение ABD и связанных с ними технологий см. в WO 2012/050923, WO 2012/050930, WO 2012/004384 и WO 2009/016043.

[00219] Гибридные белки, содержащие мальтоза-связывающие белки или их фрагменты: В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные белки, содержащие мальтоза-связывающий белок (MBP) или его фрагмент и аминокислотную последовательность одного или более из полипептидов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации фрагмент MBP содержит мальтоза-связывающий домен (MBD). Любая последовательность MBP или его фрагмента или MBD-полипептида, описанная в настоящем документе или в литературе, может являться одним из компонентов гибридных белков согласно настоящему изобретению. Компоненты гибридных белков можно при необходимости ковалентно связать посредством линкера, например, линкеров, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гибридные белки содержат последовательность MBP или его фрагмент или последовательность MBD-полипептида в

виде N-концевой группы и полипептиды, описанные в настоящем документе, в виде С-концевой группы.

[00220] В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные белки, содержащие фрагмент MBP или MBD-полипептида, причем указанный фрагмент в значительной степени сохраняет мальтоза-связывающую активность; или мультимер мальтоза-связывающих полипептидов или их фрагментов (например, мультимер MBD), содержащий по меньшей мере два мальтоза-связывающих полипептида или их фрагмента в качестве мономерных единиц (например, два или более MBD-полипептида).

[00221] Общее обсуждение MBP и MBD и связанных с ними технологий см., например, в работе Kapust et al. (1999) Protein Sci 8(8):1668-74.

[00222] Fc-гибридные белки. В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные белки, содержащие Fc-полипептид или его фрагмент и аминокислотную последовательность одного или более из полипептидов, описанных в настоящем документе (например, молекулы GDF15 человека, модифицированные молекулы GDF15 человека, мутеины GDF15 и модифицированные мутеины GDF15). Любая последовательность Fc-полипептида, описанная в настоящем документе или в литературе, может являться одним из компонентов гибридных белков согласно настоящему изобретению. Компоненты гибридных белков можно при необходимости ковалентно связать посредством линкера, например, линкеров, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гибридные белки содержат последовательность Fc-полипептида в виде N-концевой группы и полипептиды, описанные в настоящем документе, в виде С-концевой группы.

[00223] В настоящем изобретении также рассматриваются партнеры по объединению Fc-полипептида и гибридные белки, содержащие такие молекулы, где партнер по объединению Fc-полипептида модифицирован и является одним из партнеров заряженной пары Fc. «Партнер заряженной пары Fc» относится к (i) «отрицательно заряженной» Fc-последовательности (с необязательно отсутствующей шарнирной областью), содержащей мутацию зарядовой пары или (ii) «положительно заряженной» Fc-последовательности (с необязательно отсутствующей шарнирной областью), содержащей мутацию зарядовой пары. Термины «положительно заряженный» и «отрицательно заряженный» используются в настоящем документе для удобства описания природы мутации зарядовой пары в последовательностях Fc, а не для указания, что последовательность или конструктор в целом обязательно имеет положительный или отрицательный заряд. Аминокислотные последовательности заряженного Fc, пригодные для использования в конструкторах

полипептида (например, мутеина GDF15, модифицированных мутеинов GDF15) согласно настоящему изобретению описаны в, например, WO 2013/113008.

[00224] Примеры положительно заряженного Fc («Fc(+)») включают Fc, содержащий мутацию замены аспарагиновой кислоты на лизин (E356K) и мутацию замены глутаминовой кислоты на лизин (D399K) Fc-последовательности с отсутствующей шарнирной областью. Примеры отрицательно заряженного Fc («Fc(-)») включают Fc, содержащий две мутации замены лизина на аспартат (K392D, K409D) в Fc-последовательности с отсутствующей шарнирной областью. С-концевой лизин (K477) также можно необязательно удалить. При совместном инкубировании гибридного белка на основе Fc(+)-полипептида (например, гибридного белка Fc(+)-мутеин GDF15) и гибридного белка на основе Fc(-)-полипептида (например, гибридного белка Fc(-)-мутеин GDF15) остатки аспартата ассоциируют с остатками лизина посредством электростатических сил, что облегчает образование Fc-гетеродимеров между Fc(+) и Fc(-)-последовательностями гибридных белков на основе полипептида GDF15.

[00225] В настоящем изобретении также рассматриваются конструкторы, называемые конструкторами «геми» или «геми-Fc», содержащие две Fc-последовательности, соединенные тандемом посредством линкера, который соединяет N-уонец первой Fc-последовательности с С-концом второй Fc-последовательности. В некоторых вариантах реализации мономер содержит последовательность полипептида (например, зрелого модифицированного GDF15 или мутеина GDF15), связанную с первой последовательностью Fc посредством первого линкера, соединяющего N-конец последовательности GDF15 с С-концом первой Fc-последовательности, причем первая Fc-последовательность соединена со второй последовательностью Fc посредством второго линкера, соединяющего N-конец первой Fc-последовательности с С-концом второй Fc-последовательности. Первая и вторая Fc-последовательности также связаны посредством шарнирных областей Fc. Два таких мономера ассоциируют, образуя димер, в котором мономеры связаны посредством межцепочечной дисульфидной связи между двумя последовательностями полипептида. Примеры геми-Fc-полипептидов, пригодные для использования с мутеинами GDF15 согласно настоящему изобретению, см. в WO 2013/113008.

[00226] В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные белки, содержащие мультимер Fc-полипептидов или их фрагментов, включая партнер заряженной пары Fc (например, мультимер Fc).

[00227] Конъюгирование с другими молекулами: Дополнительные подходящие для конъюгации компоненты и молекулы включают, например, тиреоглобулин; анатоксин

столбняка; дифтерийный анатоксин; полиаминокислоты, такие как поли(D-лизин:D-глутаминовая кислота); полипептиды VP6 ротавирусов; гемагглютинин вируса гриппа, нуклеопротеид вируса гриппа; Гемоцианин Лимфы Улитки (ГЛУ); и белок ядра вируса гепатита В и поверхностный антиген; или любую комбинацию вышеперечисленного.

5 **[00228]** Таким образом, в настоящем изобретении рассматривается конъюгирование одного или более из дополнительных компонентов или молекул по N- и/или C-концу полипептидной последовательности, например, еще одного белка (например, белка, содержащего аминокислотную последовательность, гетерологичную по отношению к белку субъекта) или молекулы-носителя. Таким образом, примерная полипептидная
10 последовательность может быть представлена в виде конъюгата с другим компонентом или молекулой.

[00229] Конъюгатная модификация может привести к получению полипептидной последовательности, сохраняющей активность дополнительной или комплементарной функции или активности второй молекулы. Например, полипептидную
15 последовательность можно конъюгировать с молекулой, например, для облегчения растворимости, хранения, периода полужизни или стабильности *in vivo* или при хранении, снижения иммуногенности, замедленного или контролируемого высвобождения *in vivo* и т.д. Другие функции или активности включают конъюгат с пониженной токсичностью по сравнению к неконъюгированной полипептидной последовательностью, конъюгат,
20 адресно воздействующий на клетки определенного типа или орган с большей эффективностью, чем неконъюгированная полипептидная последовательность, или лекарственное вещество для последующего противодействия причинам или эффектам, ассоциированным с расстройством или заболеванием, изложенными в настоящем документе (например, диабетом).

25 **[00230]** Полипептид можно также конъюгировать с крупными, медленно метаболизируемыми макромолекулами, например, белками; полисахаридами, например, сефарозой, агарозой, целлюлозой, гранулами целлюлозы; полимерными аминокислотами, например, полиглутаминовой кислотой, полилизином; сополимерами аминокислот; инаktivированными вирусными частицами; инаktivированными бактериальными
30 токсинами, например, анатоксинами дифтерии, столбняка, холеры, молекулами лейкотоксинов; инаktivированными бактериями; и дендритными клетками. Такие конъюгированные формы при желании можно использовать для получения антител против полипептида согласно настоящему изобретению.

[00231] Дополнительные кандидаты-компоненты и молекулы для конъюгирования
35 включают молекулы, подходящие для выделения или очистки. Конкретные

неограничивающие примеры включают связывающие молекулы, например, биотин (специфическая связывающая пара биотин-авидин), антитело, рецептор, лиганд, лектин или молекулы, содержащие твердый носитель, в том числе, например, пластиковые или полистироловые гранулы, планшеты или гранулы, магнитные гранулы, тест-полоски и мембраны.

[00232] Для разделения конъюгатов по разности заряда можно использовать такие способы очистки, как катионообменную хроматографию, которая эффективно разделяет конъюгаты различной молекулярной массы. Например, можно загрузить катионообменную колонку, промыть ее ~ 20 mM ацетатом натрия, pH ~ 4, а затем элюировать линейным (0 - 0,5 M) градиентом NaCl, забуференного при pH от 3 до 5,5, например, при pH ~ 4,5. Содержимое фракций, полученных при катионообменной хроматографии, можно идентифицировать по молекулярной массе с использованием обычных способов, например, масс-спектропии, электрофореза в ДСН-ПААГ или других известных способов разделения молекулярных структур по молекулярной массе.

[00233] Другие Модификации: В настоящем изобретении рассматривается применение других модификаций полипептидов, известных в настоящее время или разрабатываемых в будущем, с целью улучшения одного или более свойств. Одним из таких способов увеличения периода полужизни в кровотоке, повышения стабильности, снижения клиренса или изменения иммуногенности или аллергенности полипептида согласно настоящему изобретению включает модификацию полипептидных последовательностей с помощью ГЭК, при которой используют производные гидроксиэтилкрахмала, связаны с другими молекулами, для изменения характеристик молекулы. Различные аспекты модификации с помощью ГЭК описаны, например, в патентных заявках США № 2007/0134197 и 2006/0258607.

[00234] В настоящем изобретении также рассматриваются гибридные молекулы, содержащие SUMO в качестве маркера объединения (LifeSensors, Inc.; Малверн, штат Пенсильвания, США). Объединение полипептида, описанного в настоящем документе, с SUMO может придать полипептиду ряд выгодных свойств, включая усиление экспрессии, улучшение растворимости и/или содействие при разработке способов очистки. SUMO-протеазы распознают третичную структуру SUMO и расщепляют гибридный белок по С-концу SUMO, тем самым высвобождая полипептид, описанный в настоящем документе, содержащий желательную N-концевую аминокислоту.

[00235] Линкеры: Любой из вышеуказанных компонентов и молекул, используемых для изменения полипептидных последовательностей согласно настоящему изобретению, при необходимости можно конъюгировать посредством линкера. Подходящие линкеры

включают «гибкие линкеры», которые, как правило, обладают достаточной длиной, обеспечивающей некоторое движение модифицированных полипептидных последовательностей и связанных компонентов и молекул. Длина линкерных молекул может составлять приблизительно 6-50 атомов. Линкерные молекулы могут также представлять собой, например, арилацетилен, олигомеры этиленгликоля, содержащие 2-10 мономерных единиц, диамины, дикислоты, аминокислоты или их комбинации. Подходящие линкеры легко выбрать; они могут обладать любой подходящей длиной, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 аминокислот.

[00236] Типичные гибкие линкеры включают полимеры глицина ($(G)_n$), полимеры глицина-аланина, полимеры аланина-серина, полимеры глицина-серина (например, $(G_mS_o)_n$, $(GSGGS)_n$, $(G_mS_oG_m)_n$, $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$, $(GSGGS_m)_n$, $(GSGS_mG)_n$ и $(GGGS_m)_n$, и их комбинации, где каждый из коэффициентов m , n и o независимо выбраны из целых чисел от 1 до 20, например, 1-18, 2-16, 3-14, 4-12, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) и другие гибкие линкеры. Полимеры глицина и глицин-серина являются относительно неструктурированными, и, следовательно, могут служить в качестве нейтрального троса между компонентами. Типичные гибкие линкеры включают GGSG, GGSGG, GSGSG, GSGGG, GGGSG и GSSSG, но не ограничиваются ими.

[00237] Дополнительные гибкие линкеры включают полимеры глицина ($(G)_n$ или полимеры глицина-серина (например, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$, $(GGGS)_n$ и $(GGGGS)_n$, где n = от 1 до 50, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50). Типичные гибкие линкеры включают GGGS (SEQ ID NO: 40), GGGGS (SEQ ID NO: 41), GGSG (SEQ ID NO: 42), GGSGG (SEQ ID NO: 43), GSGSG (SEQ ID NO: 44), GSGGG (SEQ ID NO: 45), GGGSG (SEQ ID NO: 46) и GSSSG (SEQ ID NO: 47). Мультимер (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 или 30-50) указанных линкерных последовательностей можно связать друг с другом, получая гибкие линкеры, которые можно применять для конъюгирования гетерологичной аминокислотной последовательности с полипептидами, описанными в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, гетерологичная аминокислотная последовательность может представлять собой сигнальную последовательность и/или партнер по объединению, например, альбумин, Fc-последовательность и т.п.

[00238] Примеры линкеров включают, например, $(GGGGS)_n$, где n — целое число от 1 до 10 (например, $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ или 10); GGGSGGGSIIEGR (SEQ ID NO: 48); GGGGG (SEQ ID NO: 49); EGGGS (SEQ ID NO: 50).

[00239] В некоторых случаях линкер может представлять собой расщепляемый линкер, например, ферментативно расщепляемый линкер. В других случаях линкер может

представлять собой нерасщепляемый линкер, например, линкер, не поддающийся ферментативному расщеплению при нормальных физиологических условиях *in vivo*.

[00240] Например, протеолитически расщепляемый линкер может включать сайт расщепления металлопротеиназы матрикса (MMP), например, сайт расщепления MMP, выбранной из коллагеназы-1, -2 и -3 (MMP-1, -8 и -13), желатиназы А и В (MMP-2 и 9), стромелизина 1, 2 и 3 (MMP-3, -10 и -11), матрилизина (MMP-7) и мембранных металлопротеиназ (MT1-MMP и MT2-MMP). Последовательность расщепления MMP-9 представляет собой Pro-X-X-Hy (где X представляет собой произвольный остаток; Hy - гидрофобный остаток) (SEQ ID NO: 51), например, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO: 52), например, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 53) или Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 54). Еще один пример сайта расщепления протеазы представляет собой сайт расщепления активатора плазминогена, например, активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) или сайт расщепления тканевого активатора плазминогена (tPA). Конкретные примеры последовательностей расщепления uPA и tPA включают последовательности, содержащие Val-Gly-Arg. Еще одним примером является сайт расщепления тромбина, например, CGLVPAGSGP (SEQ ID NO: 55). Дополнительные подходящие линкеры, содержащие сайты расщепления протеаз, включают линкеры, содержащие одну или более из следующих аминокислотных последовательностей: 1) SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO: 56) или SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO: 57), расщепляемые катепсином В; SKLVQASASGVN (SEQ ID NO: 58) или SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO: 59), расщепляемые протеазой вируса Эпштейна-Барр; RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO: 60), расщепляемый MMP-3 (стромелизином); SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO: 61), расщепляемый MMP-7 (матрилизином); SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO: 62), расщепляемый MMP-9; DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO: 63), расщепляемый термолизин-подобной MMP; SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO: 64), расщепляемый металлопротеиназой матрикса 2(MMP-2); SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO: 65), расщепляемый катепсином L; SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO: 66), расщепляемый катепсином D; SLGPQGIWGQFN (SEQ ID NO: 67), расщепляемый металлопротеиназой матрикса 1(MMP-1); KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO: 68), расщепляемый активатором плазминогена урокиназного типа; PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO: 69), расщепляемый металлопротеиназой матрикса 1 мембранного типа (MT-MMP); HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT (SEQ ID NO: 70), расщепляемый стромелизином 3 (или MMP-11), термолизин, коллагеназой фибробластов и стромелизином-1; GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO: 71), расщепляемый металлопротеиназой матрикса 13 (коллагеназой-3); GGSGQRGRKALE (SEQ ID NO: 72),

расщепляемый активатором плазминогена тканевого типа (tPA); SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO: 73), расщепляемый простатоспецифическим антигеном человека; SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO: 74), расщепляемый калликреином (hK3); SLLGIAVPGNFN (SEQ ID NO: 75), расщепляемый эластазой нейтрофилов; и FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO: 76), расщепляемый калпаином (кальций-активируемой нейтральной протеазой).

[00241] На фигуре 3 изображена аминокислотная последовательность двух гибридных белков M1 (SEQ ID NO: 77) и M2 (SEQ ID NO: 78), рассматриваемых в настоящем документе. Гибридный белок M1 содержит от N-конца к C-концу: сигнальную последовательность IgK (нижний регистр), объединенную с аминокислотной последовательностью ЧСА, объединенной с линкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (подчеркнутый шрифт) на N-конце зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт). Гибридный белок M2 содержит от N-конца к C-концу: сигнальную последовательность IgK (нижний регистр), объединенную с аминокислотной последовательностью ЧСА, объединенной с линкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (подчеркнутый шрифт) на N-конце зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт), содержащего делецию 3 аминокислот (ΔARN).

[00242] На фигуре 5 изображена аминокислотная последовательность двух гибридных белков M3 (SEQ ID NO: 79) и M4 (SEQ ID NO: 80), рассматриваемых в настоящем документе. Гибридный белок M3 содержит от N-конца к C-концу: сигнальную последовательность IgK (нижний регистр), объединенную с аминокислотной последовательностью ЧСА, объединенной с линкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (подчеркнутый шрифт) на N-конце аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт), содержащей делецию 3 аминокислот (обозначены как ΔARN или ΔN3). Гибридный белок M4 содержит от N-конца к C-концу: сигнальную последовательность IgK (нижний регистр), объединенную с аминокислотной последовательностью ЧСА, объединенной с линкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (подчеркнутый шрифт) на N-конце аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт), укороченной на 6 аминокислот (ΔARNGDH) по сравнению с N-концом зрелого hGDF15.

[00243] В настоящем изобретении также рассматриваются рекомбинантные нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности, полипептиды и димеры, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:

1, причем указанная непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен по сравнению с соответствующими аминокислотами в последовательности SEQ ID NO: 1:

- [00244]** i) D5T и R21N или D5S и R21N;
- 5 **[00245]** ii) R16N и H18T или R16N и H18S;
- [00246]** iii) S23N и E25T или S23N и E25S;
- [00247]** iv) S50N и F52T; S50N и F52S; F52N и A54T; или F52N и A54S;
- [00248]** v) Q51N и R53T; Q51N и R53S; R53N и A55T; или R53N и A55S;
- [00249]** vi) S64N и H66T; или S64N и H66S;
- 10 **[00250]** vii) K91N и D93T; K91N и D93S; D93N и G95T; или D93N и G95S;
- [00251]** viii) T94N и V96T; T94N и V96S; V96N и L98T; или V96N и L98S;
- [00252]** ix) S97N и Q99T; или S97N и Q99S; и
- [00253]** x) A106N и D108T или A106N и D108S;

[00254] где замена создает один или более консенсусный сайт N-связанного

15 гликозилирования, содержащий последовательность NXS/T, где N представляет собой Asn; X - любая аминокислота, кроме пролина, после которой находится Ser (S) или Thr (T), и, кроме того, один или более из консенсусных сайтов N-связанного гликозилирования при экспрессии связаны с N-гликаном. В дополнительном варианте реализации рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который при
20 экспрессии образует димер. В дополнительном варианте реализации рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, укороченный по N-концу и/или C-концу по сравнению с SEQ ID NO: 1. Полипептид может быть укорочен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более аминокислот по сравнению с эталонным полипептидом, например, SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте реализации рекомбинантная нуклеиновая кислота
25 кодирует полипептид, укороченный на первые три N-концевых остатка GDF15 (Δ ARN или Δ N3). В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения рассматриваются рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17,
30 SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 5 аминокислот; причем указанный полипептид при экспрессии содержит по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения рассматриваются рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие
35 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID

NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 2 аминокислот; причем указанный полипептид при экспрессии содержит по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В конкретных вариантах реализации рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 100 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 5 аминокислот; причем указанный полипептид при экспрессии содержит по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В конкретных вариантах реализации рекомбинантная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 100 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 2 аминокислот; причем указанный полипептид при экспрессии содержит по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным. В настоящем изобретении также рассматривается способ получения модифицированного N-гликозилированного гомодимера GDF15, включающий этап экспрессии вышеописанной рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетке млекопитающего, *например*, клетке CHO. Настоящее изобретение также включает модифицированный N-гликозилированный гомодимер GDF15, полученный вышеописанным способом.

[00255] В дополнение к специфическим аминокислотным и нуклеотидным последовательностям, предложенным в настоящем документе, в изобретении также рассматриваются полипептиды и нуклеиновые кислоты, содержащие последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичные указанным аминокислотным и нуклеотидным последовательностям. Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более полинуклеотидных последовательностей или двух или более аминокислотных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или содержат определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, являющихся одинаковыми (например, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичные в пределах заданной области) при

сравнении и выравнивании с учетом максимального соответствия в заданной области. В настоящем изобретении особо рассматриваются полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичные аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 2-35 или 77-97.

Способы получения полипептидов

[00256] Полипептид согласно настоящему изобретению можно получить любым подходящим способом, в том числе с использованием рекомбинантных и нерекомбинантных способов (например, химического синтеза).

А. Химический синтез

[00257] Если полипептид является химически синтезированным, синтез может идти в жидкой или твердой фазе. Твердофазный синтез пептидов (SPPS) позволяет включать неприродные аминокислоты и/или модификации каркаса пептида/белка. Для синтеза полипептидов согласно настоящему изобретению доступны различные формы SPPS, например, Fmoc и Boc. Подробная информация о химическом синтезе известна в данной области техники (например, Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10; и Camarero J.A. et al., 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8).

[00258] Твердофазный синтез пептидов можно выполнить, как описано ниже. Альфа-функциональные группы ($N\alpha$), а также реакционноспособные боковые цепи защищают кислотно-лабильными или основно-лабильными группами. Защитные группы стабильны в условиях для связывания амидных связей, но могут легко расщепляться, не влияя на образованную пептидную цепь. Подходящие защитные группы для α -аминогрупп включают: трет-бутилоксикарбонил (Boc), бензилоксикарбонил (Z), о-хлорбензилоксикарбонил, бифенилизопропилоксикарбонил, трет-амилоксикарбонил (AMOC), α,α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, о-нитросульфенил, 2-циан-трет-бутоксикарбонил, 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc), 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)этил (Dde) и т.п., но не ограничиваются ими.

[00259] Подходящие защитные группы для боковых цепей включают: ацетил, аллил (All), аллилоксикарбонил (Alloc), бензил (Bzl), бензилоксикарбонил (Z), трет-бутилоксикарбонил (Boc), бензилоксиметил (Bom), о-бромбензилоксикарбонил, трет-бутил (tBu), трет-бутилдиметилсилил, 2-хлорбензил, 2-хлорбензилоксикарбонил (2-CIZ), 2,6-дихлорбензил, циклогексил, циклопентил, 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-

илиден)этил (Dde), изопропил, 4-метокси-2,3,6-триметилбензилсульфонил (Mtr), 2,3,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил (Pmc), пивалил, тетрагидропиран-2 -ил, тозил (Tos), 2,4,6-триметоксибензил, триметилсилил и тритил (Trt), но не ограничиваются ими.

[00260] При твердофазном синтезе С-концевая аминокислота присоединена к

- 5 подходящему материалу носителя. Подходящими материалами носителя являются материалы, инертные по отношению к реагентам и условиям реакций ступенчатой конденсации и расщепления в процессе синтеза и нерастворимые в используемой реакционной среде. Примеры доступных для приобретения материалов носителя включают сополимеры стирол/дивинилбензола, модифицированные реакционноспособными
- 10 группами и/или полиэтиленгликолем; хлорметилированные сополимеры стирола/дивинилбензола; гидроксиметилированные или аминометилированные сополимеры стирола/дивинилбензола и т.п. Можно использовать полистирол (1%)-дивинилбензол или TentaGel®, модифицированные 4-бензилоксибензиловым спиртом (смола Ванга) или 2-хлортритилхлоридом, если необходимо получить пептидную кислоту.
- 15 В случае пептидного амида можно использовать полистирол (1%)-дивинилбензол или TentaGel®, модифицированные 5-(4'-аминометил)-3',5'-диметоксифенокси)валериановой кислотой (смола PAL) или р-(2,4-диметоксифениламинметил)-феноксигруппой (амидная смола Ринка).

[00261] Связь с полимерным носителем можно получить с помощью реакции С-

- 20 концевой Fmoc-защищенной аминокислоты с материалом носителя с добавлением активирующего реагента в этаноле, ацетонитриле, N,N-диметилформамиде (ДМФ), дихлорметане, тетрагидрофуране, N-метилпирролидоне или аналогичных растворителях при комнатной температуре или повышенных температурах (например, между 40 и 60 °C) и при времени реакции, например, от 2 до 72 часов.

[00262] Присоединение Nα-защищенной аминокислоты (например, Fmoc-

- 25 аминокислоты) к смоле PAL, Ванка или Ринка можно, например, осуществить с использованием присоединяющих реагентов, например, N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC), N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIC), или других карбодиимидов, тетрафторбората 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (TBTU) или других солей урония, о-ацилмочевины, гексафторфосфата бензотриазол-1-ил-
- 30 трис-пирролидинфосфония (PyBOP) или других солей фосфония, N-гидроксисукцинимидов, других N-гидроксиимидов или оксимов в присутствии или в отсутствие 1-гидроксибензотриазола или 1-гидрокси-7-азабензотриазола, например, с использованием TBTU с добавлением гидроксibenзотриазола (HOBT), с добавлением или
- 35 без добавления основания, например, диизопропилэтиламина (DIEA), триэтиламина или

- 5 N-метилморфолина, например, диизопропилэтиламина, с временем реакции от 2 до 72 часов (например, 3 часа при 1,5-3-кратном избытке аминокислоты и присоединяющих реагентов, например, при 2-кратном избытке и при температуре между приблизительно 10 и 50 °С, например, 25 °С в растворителе, например, диметилформамиде, N-метилпирролидоне или дихлорметане, например, диметилформамиде).
- [00263] Вместо присоединяющих реагентов также можно использовать активные сложные эфиры (например, пентафторфениловый, п-нитрофениловый и т.п.), симметричный ангидрид Nα-Fmoc-аминокислоты, его кислый хлорид или кислый фторид при условиях, описанных выше.
- 10 [00264] Nα-защищенные аминокислоты (например, Fmoc-аминокислоты) можно присоединить к 2-хлортритильной смоле в дихлорметане с добавлением DIEA при времени реакции от 10 до 120 мин, например, 20 минут, но не ограничиваясь использованием этого растворителя и этого основания.
- [00265] Последовательное связывание защищенных аминокислот может быть
- 15 осуществлено в соответствии с стандартными методами синтеза пептидов, как правило, в автоматическом синтезаторе пептидов. После отщепления Nα-Fmoc-защитной группы присоединенной аминокислоты на твердой фазе путем обработки, например, пиперидином (10-50%) в диметилформамиде в течение от 5 до 20 минут, например, 2 x 2 минут с использованием 50% пиперидина в ДМФ и 1 x 15 мин с использованием 20%
- 20 пиперидина в ДМФ, следующую защищенную аминокислоту при 3-10-кратном избытке, например, при 10-кратном избытке, присоединяют к предыдущей аминокислоте в инертном неводном полярном растворителе, например, дихлорметане, ДМФ или их смеси и при температуре между приблизительно 10 и 50 °С, например, при 25 °С. Ранее упомянутые реагенты для присоединения первой Nα-Fmoc аминокислоты к смоле PAL,
- 25 Ванга или Ринка, подходят для использования в качестве присоединяющих реагентов. Кроме того, в качестве альтернативы можно использовать активные сложные эфиры или хлориды или фториды или симметричные ангидриды защищенной аминокислоты.
- [00266] В конце твердофазного синтеза пептид отщепляют от материала носителя, одновременно отщепляя защитные группы боковых цепей. Отщепление можно
- 30 осуществить с использованием трифторуксусной кислоты или другой сильно кислой среды с добавлением 5-20 об.% акцепторов, например, диметилсульфида, этилметилсульфида, тианизолола, тиокрезолола, м-крезола, анизолола, этандитиолола, фенола или воды, например, 15 об.% диметилсульфида/этандитиолола/м-крезола (1:1:1), в течение от 0,5 до 3 часов, например, 2 часов. Пептиды с полностью защищенными боковыми цепями
- 35 получают отщеплением 2-хлортритильной смолы ледяной уксусной

кислотой/трифторэтанолом/дихлорметаном (2:2:6). Защищенный пептид можно очистить хроматографией на силикагеле. Если пептид связан с твердой фазой посредством смолы Ванга и если требуется получить пептид с С-концевым алкиламидированием, отщепление можно осуществить путем аминолиза алкиламином или фторалкиламином. Аминолиз

5 выполняют при температуре от приблизительно -10 °С до 50 °С (например, приблизительно 25 °С), и при времени реакции между приблизительно 12 и 24 часами (например, приблизительно 18 часов). Кроме того, пептид можно отщепить от носителя путем переэтерификации, например, с метанолом.

[00267] Получаемый кислый раствор можно смешать с 3-20-кратным количеством

10 холодного эфира или н-гексана, например, 10-кратным избытком диэтилового эфира для осаждения пептида и, следовательно, отделения акцепторов и отщепленных защитных групп, оставшихся в эфире. Дальнейшую очистку можно осуществить путем многократного повторного осаждения пептида из ледяной уксусной кислоты. Полученный осадок можно ресуспендировать в воде или трет-бутаноле или смеси этих двух

15 растворителей, например, 1:1 смеси трет-бутанол/вода, и подвергать сублимационной сушке.

[00268] Полученный пептид можно очистить с помощью различных хроматографических методик, в том числе ионообменной хроматографии со слабоосновной смолой в форме ацетата; гидрофобной адсорбционной хроматографии на

20 немодифицированных сополимерах полистирола/дивинилбензола (например, Amberlite® XAD); адсорбционной хроматографии на силикагеле; ионообменной хроматографии, например, на карбоксиметилцеллюлозе; распределительной хроматографии, например, на Sephadex® G-25; противоточной распределительной хроматографии; или жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД), например, обращенно-фазной ВЭЖХ на

25 октиловой или октадецилсилилкремнеземной (ODS) фазах.

В. Рекомбинантная продукция

[00269] При получении полипептида с использованием рекомбинантных методик полипептид можно получить в виде внутриклеточного белка или секретируемого белка с

30 использованием любого подходящего конструктора и любой подходящей клетки-хозяина, которая может являться прокариотической или эукариотической клеткой, например, бактериальной (например, E.coli) или дрожжевой клетки-хозяина, соответственно. Другие примеры эукариотических клеток, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, включают клетки насекомых, клетки млекопитающих и/или клетки растений. При

35 использовании клеток-хозяев млекопитающих они могут включать клетки человека

(например, клетки HeLa, 293, H9 и Jurkat); клетки мыши (например, NIH3T3, L-клетки и клетки C127); клетки приматов (например, Cos 1, Cos 7 и CV1) и клетки хомяка (например, клетки яичника китайского хомяка (CHO)). В конкретных вариантах реализации полипептид продуцируют в клетках CHO. В других вариантах реализации полипептид продуцируют в клетках дрожжей, и в конкретных вариантах реализации с помощью генной инженерии можно получить клетки дрожжей, продуцирующие гликопротеины с N-гликанами, аналогичными N-гликанам млекопитающих.

[00270] Различные системы хозяин-вектор, пригодные для экспрессии полипептида, можно использовать в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. См., например, Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; и Ausubel et al. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons. Способы введения генетического материала в клетки-хозяева включают в себя, например, трансформацию, электропорацию, конъюгацию, методы с использованием фосфата кальция и другие. Можно выбрать способ переноса, обеспечивающий стабильную экспрессию введенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, можно представить в виде наследуемого эписомального элемента (например, плазмиды), или можно интегрировать в геном. Доступны для приобретения различные векторы, подходящие для использования при продукции исследуемого полипептида.

[00271] Векторы могут обеспечить экстрахромосомное поддержание в клетке-хозяине или интеграцию в геном клетки-хозяина. Экспрессирующий вектор содержит регуляторные последовательности транскрипции и трансляции и может обеспечить индуцибельную или конститутивную экспрессию, причем кодирующая область функционально связана с ними и находится под транскрипционным контролем области инициации транскрипции, а также области терминации транскрипции и трансляции. В целом, регуляторные последовательности транскрипции и трансляции могут включать последовательности промоторов, сайты связывания рибосом, последовательности инициации и прекращения транскрипции, последовательности инициации и прекращения трансляции и последовательности энхансеров или активаторов. Промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными, и могут представлять собой сильный конститутивный промотор (например, T7).

[00272] Экспрессирующие конструкторы обычно содержат удобные сайты рестрикции, расположенные вблизи последовательности промотора с целью обеспечить инсерцию нуклеотидных последовательностей, кодирующих исследуемые белки. Селективный маркер, работающий в экспрессирующей клетке-хозяине, может присутствовать с целью

облегчения селекции клеток, содержащих вектор. Кроме того, экспрессирующий конструкт может содержать дополнительные элементы. Например, экспрессирующий вектор может содержать одну или две системы репликации, что позволяет ему поддерживаться в организмах, например, в клетках млекопитающих или насекомых для экспрессии и в прокариотической клетке-хозяине для клонирования и амплификации. Кроме того, экспрессирующий конструкт может содержать селективный маркерный ген, обеспечивающий селекцию трансформированных клеток-хозяев. Селективные гены хорошо известны в данной области техники и зависят от используемых клеток-хозяев.

[00273] Выделение и очистку белка можно выполнить в соответствии со способами, известными в данной области техники. Например, белок можно выделить из лизата генетически модифицированных клеток, осуществляющих экспрессию белка конститутивно и/или при индукции, или из синтетической реакционной смеси путем иммуноаффинной очистки, которая обычно включает контакт образца с антителом против белка, промывание для удаления неспецифически связанного материала, и элюирование специфически связанного белка. Выделенный белок можно дополнительно очистить с помощью диализа и других способов, обычно используемых при способах очистки белка. В одном варианте реализации белок можно выделить с использованием способов металлохелатной хроматографии. Белки могут содержать модификации, облегчающие выделение.

[00274] Полипептиды можно получить практически в чистом виде или в выделенной форме (например, не содержащей других полипептидов). Полипептиды могут присутствовать в композиции, обогащенной указанным полипептидом по отношению к другим компонентам, которые могут присутствовать в ней (например, другим полипептидам или другим компонентам клетки-хозяина). Например, очищенный полипептид можно получить таким образом, что полипептид присутствует в композиции, практически не содержащей других экспрессированных белков, например, менее 90%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% композиции состоит из других экспрессированных белков.

Антитела

[00275] В настоящем изобретении предложены антитела, в том числе выделенные антитела, специфически связывающиеся с полипептидом или гибридным белком согласно настоящему изобретению. Термин "антитело" включает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и

связывающие фрагменты антител, включая Fab и F(ab')₂, при условии, что они специфически связываются с полипептидом или гибридным белком согласно настоящему изобретению. Простейшая структурная единица целого антитела содержит тетрамер, и каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-концевая область каждой цепи содержит переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. Напротив, C-концевой фрагмент каждой цепи определяет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Легкие цепи человека подразделяются на каппа- и лямбда-, в то время как тяжелые цепи человека подразделяются на гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эпсилон-, и определяют изотип антитела IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Связывающие фрагменты получают с помощью методик рекомбинантных ДНК, или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Связывающие фрагменты включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-фрагменты и одноцепочечные антитела.

[00276] На одном конце каждой тяжелой цепи находится переменный домен (VH), а затем - ряд константных доменов. На одном конце каждой легкой цепи находится переменный домен (VL), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. В пределах легкой и тяжелой цепи переменные и константные области соединяются "J"-областью из приблизительно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит "D"-область из приблизительно 10 или более аминокислот. Все цепи антитела обладают аналогичной общей структурой сравнительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выравниваются по каркасным областям, обеспечивая связывание со специфическим эпитопом. От N-конца к C-концу как тяжелые, так и легкие цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[00277] Интактное антитело содержит два сайта связывания и, за исключением бифункциональных или биспецифических антител, указанные два сайта связывания являются идентичными. Биспецифическое или бифункциональное антитело является искусственным гибридным антителом, содержащим две пары различных тяжелых/легких цепей и два различных сайта связывания. Биспецифические антитела можно получить с

помощью различных способов, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов.

[00278] Как указано выше, связывающие фрагменты можно получить путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Гидролиз антител ферментом папаином приводит к получению двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, также известных как "Fab"-фрагменты, и "Fc"-фрагмента, не обладающего антигенсвязывающей активностью. Гидролиз антител ферментом пепсином приводит к получению $F(ab')_2$ -фрагмента, в котором оба плеча молекулы антитела остаются связанными и содержат два антигенсвязывающих сайта. $F(ab')_2$ -фрагмент обладает способностью перекрестно связывать антиген.

[00279] В настоящем документе термин "Fab" относится к фрагменту антитела, содержащему VH- и VL-области, а также константный домен легкой цепи и CH1-домен тяжелой цепи.

[00280] В настоящем документе термин "Fv" относится к минимальному фрагменту антитела, сохраняющему как антигенраспознающий, так и антигенсвязывающий сайты. В двуцепочечных разновидностях Fv эта область содержит димер одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи, соединенных нековалентной связью. В одноцепочечных разновидностях Fv один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером таким образом, что легкая и тяжелая цепи могут образовывать «димерную» структуру, аналогичную структуре двуцепочечных разновидностей Fv. Именно в этой конфигурации три CDR каждого вариабельного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего домена на поверхности димера VH-VL. Хотя шесть CDR совместно придают антителу антигенсвязывающую специфичность, даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген.

[00281] В настоящем документе термин "гипервариабельные области" или "CDR" относится к фрагменту иммунологических рецепторов, контактирующему со специфическим лигандом и определяющему его специфичность.

[00282] Термин "гипервариабельная" область относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из CDR и/или остатки из «гипервариабельной петли».

[00283] В настоящем документе термин «эпитоп» относится к антитело-связывающим сайтам белковых антигенов. Эпитопные детерминанты обычно содержат химически

активные поверхностные группы молекул, например, аминокислоты или углеводные боковые цепи, а также обладают специфическими трехмерными структурными и зарядовыми характеристиками. Говорят, что антитело связывается с антигеном, если константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ. Увеличенная константа равновесия (" K_D ") означает меньшее сродство между эпитопом и антителом, в то время как уменьшенная константа равновесия означает большее сродство между эпитопом и антителом. Антитело с K_D "не более" определенного значения означает, что антитело должно связываться с эпитопом с заданной K_D или более сильное связывание. В то время как K_D описывает характеристики связывания эпитопа и антитела, "специфическая активность" характеризует эффективность самого антитела по отношению к функции антитела. Корреляция между константой равновесия и специфической активностью не является обязательной; так, например, относительно низкая K_D не обязательно подразумевает высокую специфическую активность.

[00284] Термин "селективно связывается" по отношению к антителу означает не то, что антитело связывается только с одним веществом, а то, что K_D антитела по отношению к первому веществу меньше, чем K_D антитела по отношению ко второму веществу. Антитело, исключительно связывающееся с эпитопом, связывается только с указанным единственным эпитопом.

[00285] При введении в организм человека антитела, содержащие переменные и/или константные области, характерные для грызунов (т.е. мыши или крысы), иногда ассоциируются с, например, быстрым выведением из организма или формированием иммунного ответа организма против антитела. Чтобы избежать использования антител, происходящих от грызунов, можно получить полностью человеческие антитела путем введения функции человеческого антитела в организм грызуна таким образом, чтобы грызун продуцировал полностью человеческие антитела. Если это специально не указано в настоящем документе, термины антитела "человека" и "полностью человеческие" антитела можно использовать как взаимозаменяемые. Термин "полностью человеческое" можно использовать при различении антител, являющихся лишь частично человеческими, от полностью человеческих антител. Опытному специалисту известно о различных способах получения полностью человеческих антител.

[00286] Чтобы не допустить возможного гуморального ответа организма человека на антитела мыши, можно использовать химерные или иным образом гуманизированные антитела. Химерные антитела содержат константную область, характерную для человека, и переменную область, характерную для мыши, и поэтому у некоторых пациентов может наблюдаться гуморальный ответ на химерные антитела. Таким образом,

предпочтительно получить полностью человеческие антитела против мультимерных ферментов во избежание возможного гуморального ответа организма человека на антитела мыши или химерные антитела.

[00287] Полностью человеческие моноклональные антитела можно получить,

5 например, путем образования линий гибридомных клеток с помощью способов, известных специалисту в данной области техники. Другие способы получения включают использование последовательностей, кодирующих специфические антитела? для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего, например, клетки СНО. Трансформацию можно осуществить любым известным способом введения
10 полинуклеотидов в клетку-хозяина, в том числе, например, путем упаковки полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукции клетки-хозяина вирусом (или вектором), или с помощью процедур трансфекции, известных в данной области техники. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают декстран-опосредованную
15 трансфекцию, преципитацию с фосфатом кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают клетки СНО, клетки HeLa и клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека,
20 но не ограничиваются ими.

[00288] Антитела можно использовать для обнаружения полипептида согласно настоящему изобретению. Например, антитела можно использовать в качестве
25 диагностического средства посредством обнаружения уровня одного или более из полипептидов согласно настоящему изобретению в организме субъекта, и сравнения обнаруженного уровня со стандартным контрольным уровнем или с исходным уровнем в организме субъекта, определенным ранее (например, до заболевания).

[00289] Еще один вариант реализации настоящего изобретения предполагает использование одного или более доменных антител человека (дАт). дАт представляют собой наименьшие функциональные связывающие единицы человеческих антител (IgG) и
30 обладают выгодными характеристиками стабильности и растворимости. Эта технология подразумевает использование дАт, конъюгированных с ЧСА (с образованием "AlbudAb"; см, например, EP1517921B, WO2005/118642 и WO2006/051288) и исследуемой молекулой (например, полипептидной последовательностью согласно настоящему изобретению). AlbudAb часто характеризуются меньшим размером и проще продуцируются в микробных
35 экспрессирующих системах, например, бактериях или дрожжах, чем современные

технологии, используемые для продления времени полужизни полипептидов в сыворотке. Поскольку период полужизни ЧСА составляет приблизительно три недели, полученные конъюгированные молекулы увеличивают период полужизни исследуемой молекулы. Использование технологии дАт также может повысить эффективность исследуемой молекулы.

Терапевтическое и профилактическое применение

[00290] В настоящем изобретении предложены способы лечения или профилактики метаболических и ассоциированных с метаболизмом заболеваний, например, ожирения и других расстройств, связанных с массой тела, гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушения переносимости глюкозы, а также расстройств метаболизма глюкозы, путем введения полипептидов или их композиций, описанных в настоящем документе. Такие способы также могут оказывать благоприятное воздействие на один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или состоянием, например, снижая тяжесть или частоту симптома. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы лечения расстройства метаболизма глюкозы или массы тела путем введения полипептидов, их N-гликозилированных димеров или композиций. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы снижения потребления пищи или уменьшения массы тела путем введения полипептидов, их N-гликозилированных димеров или композиций. В настоящем изобретении также предложено применение вышеуказанных последовательностей, полипептидов, их N-гликозилированных димеров или композиций при производстве лекарственного средства для лечения состояния, выбранного из метаболических и ассоциированных с метаболизмом заболеваний, например, ожирения и других расстройств массы тела, гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушения переносимости глюкозы, а также расстройств метаболизма глюкозы. В настоящем изобретении также предложено применение вышеуказанных последовательностей, полипептидов, их N-гликозилированных димеров или композиций при производстве лекарственного средства для лечения расстройства метаболизма глюкозы или массы тела. В настоящем изобретении также предложено применение вышеуказанных последовательностей, полипептидов, их N-гликозилированных димеров или композиций при производстве лекарственного средства для снижения потребления пищи или массы тела.

[00291] Чтобы определить, может ли субъект являться кандидатом для лечения или профилактики расстройства массы тела (например, ожирения) с помощью способов, представленных в настоящем документе, следует выполнить оценку таких параметров,

как этиология и степень состояния субъекта (например, насколько избыточна масса тела субъекта по сравнению со здоровым индивидом), но не ограничиваясь ими. Например, можно считать, что взрослый субъект с ИМТ между ~ 25 и $\sim 29,9$ кг/м² страдает избыточным весом (предожирением), в то время как взрослый субъект с ИМТ ~ 30 кг/м² или выше страдает ожирением. Как обсуждалось в настоящем документе, полипептиды согласно настоящему изобретению могут подавлять аппетит, например, снижать аппетит, приводя к снижению массы тела.

[00292] Чтобы определить, может ли субъект являться кандидатом для лечения или профилактики гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушения переносимости глюкозы и/или расстройств метаболизма глюкозы с помощью предложенных в настоящем документе способов, можно использовать различные диагностические способы, известные в данной области техники. Такие способы включают способы, описанные в других разделах настоящего документа (например, оценку уровня глюкозы в плазме натощак (FPG) и пероральный тест переносимости глюкозы (oGTT)).

[00293] Полипептиды и гибридные белки, предложенные в настоящем документе, при введении субъекту для лечения или профилактики метаболических и ассоциированных с метаболизмом заболеваний, например, ожирения и других расстройств, связанных с массой тела, гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушения переносимости глюкозы, расстройств метаболизма глюкозы могут привести к снижению уровня глюкозы в крови, снижению массы тела и/или снижению потребления пищи.

[00294] В некоторых вариантах реализации полипептиды и гибридные белки, рассматриваемые в настоящем документе, могут снижать уровень глюкозы в крови, массу тела и/или потребление пищи по меньшей мере на 5% по сравнению с указанными показателями в отсутствие введения полипептидов или гибридных белков. Например, полипептиды и гибридные белки, рассматриваемые в настоящем документе, могут снижать уровень глюкозы в крови, массу тела и/или потребление пищи по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с состоянием до начала лечения или профилактики.

Фармацевтические композиции

[00295] Полипептиды согласно настоящему изобретению могут находиться в виде композиции, пригодной для введения субъекту. В целом, такие композиции представляют собой «фармацевтические композиции», содержащие один или более из полипептидов и один или более из фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых разбавителей, носителей или вспомогательных веществ. В некоторых вариантах

реализации полипептиды присутствуют в терапевтически эффективном количестве. Фармацевтические композиции можно использовать в способах согласно настоящему изобретению; так, например, фармацевтические композиции можно вводить *ex vivo* или *in vivo* в организм субъекта с целью осуществления терапевтических и профилактических способов и вариантов применения, описанных в настоящем документе.

[00296] Можно составить фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, совместимые с предполагаемым способом или путем введения; типичные пути введения изложены в настоящем документе. Кроме того, фармацевтические композиции можно использовать в комбинации с другими терапевтически активными агентами или соединениями (например, агентами, снижающими уровень глюкозы), описанными в настоящем документе, с целью лечения или профилактики заболеваний, расстройств и состояний, рассматриваемых в настоящем изобретении.

[00297] Фармацевтические композиции обычно содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из полипептидов, рассматриваемых в настоящем изобретении, и один или более из фармацевтически и физиологически приемлемых агентов для получения состава. Подходящие фармацевтически приемлемые или физиологически приемлемые разбавители, носители или вспомогательные вещества включают антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и бисульфат натрия), консерванты (например, бензиловый спирт, метил-, этил- или *n*-пропилпарабены, *p*-гидроксibenзоат), эмульгаторы, суспендирующие агенты, диспергирующие агенты, растворители, наполнители, объемообразующие агенты, детергенты, буферы, среды-носители, разбавители и/или адъюванты, но не ограничиваются ими. Например, подходящая среда-носитель может представлять собой физиологический раствор или физиологический раствор с цитрантым буфером, возможно, с добавлением других материалов, часто встречающихся в фармацевтических композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные типичные среды-носители. Специалисты в данной области техники могут легко назвать различные буферы, которые можно использовать в фармацевтических композициях и лекарственных формах. Типичные буферы включают фармацевтически приемлемые слабые кислоты, слабые основания или их смеси, но не ограничиваются ими. Например, компоненты буфера могут представлять собой водорастворимые материалы, например, фосфорную кислоту, винную кислоту, молочную кислоту, янтарную кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту и их соли. Приемлемые буферные агенты включают, например,

трис-буфер, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолин)этансульфоновую кислоту (MES), натриевую соль 2-(N-морфолин)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолин)пропансульфоновую кислоту (MOPS) и N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (TAPS).

5 **[00298]** После составления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого тела или обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить в виде готовой к использованию формы, лиофилизированной формы, требующей восстановления перед использованием, жидкой формы, требующей разбавления перед использованием,
10 или другой приемлемой формы. В некоторых вариантах реализации предложена фармацевтическая композиция в одноразовом контейнере (например, одноразовом флаконе, ампуле, шприце или автоматическом инжекторе (например, EpiPen®)), в то время как в других вариантах реализации предложен многоразовый контейнер (например, многоразовый флакон). Для доставки полипептидов можно использовать любой аппарат
15 для доставки лекарств, в том числе имплантаты (например, имплантируемые насосы) и катетерные системы, которые хорошо известны специалистам. Инъекции веществ замедленного всасывания, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, можно также использовать для высвобождения полипептидов, описанных в настоящем документе, в течение определенного времени. Инъекции веществ замедленного
20 всасывания, как правило, составлены на твердой или масляной основе и в общем случае содержат по меньшей мере один из компонентов состава, изложенных в настоящем документе. Специалист в данной области техники должен быть знаком с возможными составами и вариантами применения инъекций веществ замедленного всасывания.

[00299] Фармацевтические композиции могут находиться в форме стерильной водной
25 или масляной суспензии для инъекции. Эту суспензию можно составить в соответствии со способами, известными в данной области техники, используя подходящие диспергирующие агенты или увлажнители и суспендирующие агенты, упомянутые в настоящем документе. Стерильный препарат для инъекции также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекции в нетоксичном приемлемом для
30 парентерального применения разбавителе или растворителе, например, раствор в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и диспергирующие среды, которые можно использовать, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, Stenophor EL™ (BASF, Парсипанни, штат Нью-Джерси, США) или физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS), этанол, полиол (например,
35 глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Кроме

того, стерильные нелетучие масла традиционно применяют в качестве растворителя или среды для суспендирования. С этой целью можно использовать любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при получении растворов для инъекции находят применение жирные кислоты, например, олеиновая кислота. Пролонгированное всасывание конкретных инъекционных композиций можно обеспечить путем включения агента, замедляющего всасывание (например, моностеарата алюминия или желатина).

[00300] Фармацевтические композиции, содержащие активный ингредиент (например, полипептиды согласно настоящему изобретению), могут находиться в форме, пригодной для перорального применения, например, таблеток, капсул, пастилок, леденцов, водный или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, твердых или мягких капсул или сиропов, растворов, микрогранул или эликсиров. Фармацевтические композиции для перорального применения получают в соответствии с любым способом, известным в данной области техники для получения фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или более из таких агентов, как подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты, с целью получения фармацевтически изысканных и приятных на вкус препаратов. Таблетки, капсулы и т.п. содержат активный ингредиент в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, подходящими для изготовления таблеток. Такие вспомогательные вещества могут представлять собой, например, разбавители, например, карбонат кальция, карбонат натрия, лактозу, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующие агенты и разрыхлители, например, кукурузный крахмал или альгиновую кислоту; связующие агенты, например, крахмал, желатин или гуммиарабик; и скользящие агенты, например стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк.

[00301] Таблетки, капсулы и т.п., пригодные для перорального введения, могут не содержать покрытия или быть покрыты известными способами для замедления распада и всасывания в желудочно-кишечном тракте, тем самым обеспечивая пролонгированное действие. Например, можно применять материал с отсроченным высвобождением, например, глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат. На них также можно нанести покрытие согласно методикам, известным в данной области техники, с целью формирования осмотических терапевтических таблеток с контролируемым высвобождением. Дополнительные агенты включают биоразлагаемые или биосовместимые частицы или полимерные вещества, например, полиэферы, полиаминокислоты, гидрогель, поливинилпирролидон, полиангидриды, полигликолевую кислоту, этиленвинилацетат, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, сульфат

протамина или лактид/гликолидные сополимеры, полилактид/гликолидные сополимеры или сополимеры этиленвинилацетата, для контроля доставки введенной композиции. Например, агент для перорального применения можно включить в микрокапсулы, полученные с помощью методик коацервации или межфазной полимеризации, с использованием гидроксиметилцеллюлозных или желатиновых микрокапсул или микрокапсул поли(метилметакрилата), соответственно, или в коллоидную систему доставки лекарственных средств. Коллоидные дисперсионные системы включают макромолекулярные комплексы, микрокапсулы, микросферы, микрогранулы и системы на основе липидов, в том числе эмульсии типа «масло в воде», мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Способы получения липосом описаны, например, в патентах США № 4235871, 4501728 и 4837028. Способы получения вышеупомянутых составов очевидны для специалистов в данной области техники.

[00302] Составы для перорального применения могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином или микрокристаллической целлюлозой, или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с водной или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

[00303] Водные суспензии содержат активные материалы в смеси со вспомогательными веществами, пригодными для их производства. Такие вспомогательные вещества могут представлять собой суспендирующие агенты, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и гуммиарабик; диспергирующие агенты или увлажнители, например, природные фосфатиды (например, лецитин), или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами (например, полиоксиэтиленстеарат), или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами (например, гептадекаэтиленоксицетанол), или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами - производными жирных кислот и гексита (например, полиоксиэтиленсорбитмоноолеат) или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами - производными жирных кислот и ангидридов гексита (например, полиэтиленсорбитанмоноолеат). Водные суспензии могут также содержать один или более из консервантов.

[00304] Масляные суспензии можно составить путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например, арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, например, жидком

парафине. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители, например, представленные выше, и ароматизаторы можно добавлять для получения приятного на вкус препарата для перорального применения.

5 **[00305]** Диспергируемые порошки и гранулы для получения водной суспензии путем добавления воды содержат активный ингредиент в смеси с диспергирующим агентом или увлажнителем, суспендирующим агентом и одним или более из консервантов. Подходящие диспергирующие агенты или увлажнители и суспендирующие агенты приведены в настоящем документе.

10 **[00306]** Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут также находиться в виде эмульсий «масло-в-воде». Масляная фаза может представлять собой растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например, жидкий парафин, или их смеси. Подходящие эмульгаторы могут представлять собой природные камеди, например, гуммиарабик или трагакантовую
15 камедь; природные фосфатиды, например, фосфатиды сои, лецитин и эфиры или неполные эфиры - производные жирных кислот; ангидриды гексита, например, сорбитанмоноолеат; и продукты конденсации неполных эфиров с этиленоксидом, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

[00307] Составы также могут содержать носители для защиты композиции от быстрого
20 разложения или выведения из организма, например, составы с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты, липосомы, гидрогели, пролекарства или микрокапсулированные системы доставки. Например, можно применять материал с отсроченным высвобождением, например, глицерилмоностеарат или глицерилстеарат отдельно или в комбинации с воском.

25 **[00308]** В настоящем изобретении рассматривается введение полипептидов в виде суппозитория для ректального введения лекарственного вещества. Суппозитории можно получить путем смешивания лекарственного вещества с подходящим нераздражающим вспомогательным веществом, твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре, которое, таким образом, будет плавиться в прямой кишке,
30 высвобождая лекарственное вещество. Такие материалы включают масло какао и полиэтиленгликоли, но не ограничиваются ими.

[00309] Полипептиды, рассматриваемые в настоящем изобретении, могут находиться в форме любой другой подходящей фармацевтической композиции (например, спреев для назального или ингаляционного применения), известной в настоящее время или
35 разработанной в будущем.

[00310] Концентрация полипептида или его фрагмента в составе может варьироваться в широких пределах (например, от менее чем приблизительно 0,1 масс.%, как правило, 2 масс.% или по меньшей мере приблизительно 2 масс.% до 20-50 масс. % или более); ее выбирают, как правило, главным образом с учетом объема жидкости, вязкости и факторов, зависящих от субъекта, в соответствии с, например, конкретным выбранным способом введения.

[00311] В настоящем документе рассматривается применение технологии доставки веществ с замедленным всасыванием компании Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Эмервилл, штат Калифорния, США). Эта технология использует мембраны на основе нанотрубок из диоксида титана, обеспечивающие скорости высвобождения нулевого порядка для макромолекул, например, белковых и пептидных терапевтических средств. Биосовместимую мембрану располагают в небольшом подкожном имплантате, что обеспечивает долгосрочную (например, до одного года) доставку терапевтических макромолекул с постоянной скоростью. В настоящее время проходит оценку технология доставки агонистов GLP-1 для лечения диабета II типа. В некоторых вариантах реализации полипептид(ы), описанный(е) в настоящем документе, может (могут) представлять собой состав с мембраной. Например, можно пропитать мембрану полипептидом или окружить полипептид мембраной. Мембрана может иметь форму диска, трубки или шара. В некоторых вариантах реализации трубка может представлять собой нанотрубку, или шар может представлять собой наносферу.

[00312] В некоторых вариантах реализации полипептиды, описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту с помощью носимой системы доставки, которую можно закрепить на теле пациента и которая может доставлять заранее заданную дозу полипептида пациенту. Типичные носимые системы доставки включают пластыри или насосы. В некоторых случаях носимые системы доставки, например, носимые инъекторы, используемые для доставки Neulasta®, можно применять для введения полипептидов, описанных в настоящем документе. В других вариантах реализации для доставки полипептида, описанного в настоящем документе, в организм пациента можно использовать осмотические насосы, например, имплантируемые осмотические насосы (например, насос DUROS® или осмотический насос ALZET®).

Пути введения

[00313] В настоящем изобретении рассматривается введение описанных полипептидов и их композиций любым подходящим способом. Подходящие пути введения включают парентеральный (например, внутримышечный, внутривенный, подкожный (например,

впрыскивание или использование имплантата), внутрибрюшинный, интрацистернальный, внутрисуставной, внутрибрюшинный, внутрицеребральный (интрапаренхиматозный) и интрацеребровентрикулярный), оральный, назальный, вагинальный, сублингвальный, внутриглазный, ректальный, местный (например, трансдермальный), сублингвальный и ингаляционный.

[00314] Инъекции веществ замедленного всасывания, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, можно также использовать для высвобождения полипептидов, описанных в настоящем документе, в течение определенного времени. Инъекции веществ замедленного всасывания, как правило, составлены на твердой или масляной основе и в общем случае содержат по меньшей мере один из компонентов состава, изложенных в настоящем документе. Специалист в данной области техники должен быть знаком с возможными составами и вариантами применения инъекций веществ замедленного всасывания.

[00315] Что касается антител, в типичном варианте реализации антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению хранили при концентрации 10 мг/мл в стерильном изотоническом водном растворе хлорида натрия для инъекций при 4 °C и разбавляли 100 мл или 200 мл 0,9% хлорида натрия для инъекций до введения пациенту. Антитело вводили путем внутривенного вливания в течение 1 часа в дозе от 0,2 до 10 мг/кг. В других вариантах реализации антитело вводят путем внутривенного вливания в течение от 15 минут до 2 часов. В других вариантах реализации процедуру введения осуществляют путем подкожной болюсной инъекции.

[00316] В настоящем изобретении рассматриваются способы, в которых полипептид или антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению вводят субъекту по меньшей мере два раза в день, по меньшей мере раз в день, по меньшей мере каждые 48 часов, по меньшей мере каждые 72 часа, по меньшей мере раз в неделю, по меньшей мере раз в 2 недели, по меньшей мере раз в месяц, по меньшей мере раз в 2 месяца или по меньшей мере раз в 3 месяца или реже.

Комбинированная терапия

[00317] В настоящем изобретении рассматривается применение полипептидов в комбинации с одним или более из активных терапевтических агентов или другими профилактическими или терапевтическими процедурами. При такой комбинированной терапии различные активные агенты часто обладают различными механизмами действия. Такая комбинированная терапия может быть особенно выгодной за счет снижения дозы одного или более из агентов, за счет чего ослабляются или устраняются нежелательные

эффекты, ассоциированные с одним или более из агентов; кроме того, такая комбинированная терапия может оказывать синергетическое терапевтическое или профилактическое действие на основное заболевание, расстройство или состояние.

[00318] В настоящем документе термин «комбинация» подразумевает включение терапевтических средств, которые можно вводить по отдельности, например, в разных составах для раздельного введения (например, как они могут быть представлены в комплекте) и терапевтических средств, которые можно вводить совместно в одном составе (например, «совместном составе»).

[00319] В некоторых вариантах реализации полипептиды вводят или применяют последовательно, например, когда один агент вводят до одного или более других агентов. В других вариантах реализации полипептиды вводят одновременно, например, когда два или более из агентов вводят в одно или приблизительно одно и то же время; указанные два или более из агентов могут находиться в двух или более отдельных составах или быть объединены в одном составе (например, совместном составе). Независимо от последовательного или одновременного введения двух или более агентов, считается, что их вводят в комбинации для целей настоящего изобретения.

[00320] Полипептиды согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими агентами, полезными для лечения, профилактики, подавления или облегчения заболеваний, расстройств или состояний, изложенных в настоящем документе, включая вещества, которые обычно вводят субъектам, страдающим от ожирения, расстройства пищевого поведения, гипергликемии, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы и других расстройств метаболизма глюкозы.

[00321] В настоящем изобретении рассматривается комбинированная терапия с использованием многочисленных агентов (и их классов), включая 1) инсулин, имитаторы инсулина и агенты, стимулирующие секрецию инсулина, в том числе производные сульфонилмочевины (например, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, толбутамид, глибенкламид, глимепирид, глипизид) и меглитиниды (например, митиглинид, репаглинид (PRANDIN) и натеглинид (STARLIX)); 2) бигуаниды (например, метформин (GLUCOPHAGE) и его фармацевтически приемлемые соли, в частности, метформина гидрохлорид и его составы с пролонгированным высвобождением, например, Glumetza™, Fortamet™ и GlucophageXR™) и другие агенты, действующие за счет стимуляции утилизации глюкозы, снижения продукции глюкозы в печени и/или снижения выхода глюкозы в кишечнике; 3) ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбозу, воглибозу и миглитол) и другие агенты, которые замедляют переваривание углеводов и, следовательно, их поглощение в кишечнике и снижают постпрандиальную

гипергликемию; 4) тиазолидиндионы (например, росиглитазон (AVANDIA), троглитазон (REZULIN), пиоглитазон (ACTOS), глипизид, балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, AMG 131, MBX2044, митоглитазон, лобеглитазон, IDR-105, троглитазон, энглитазон, сиглитазон, адаглитазон, дарглитазон, которые усиливают действие инсулина (например, 5 путем сенсibilизации инсулина), включая инсулин и имитаторы инсулина (например, инсулин деглудек, инсулин гларгин, инсулин лиспро, инсулин детемир, инсулин глулизин и ингаляционные составы каждого из них), тем самым стимулируя утилизацию глюкозы в периферических тканях; 5) глюкагон-подобные пептиды, включая ингибиторы DPP-IV (например, алоглиптин, омариглиптин, линаглиптин, вилдаглиптин (GALVUS) и 10 ситаглиптин (JANUVIA)) и глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) и агонисты и аналоги GLP-1 (например, эксенатид (BYETTA и ITCA 650 (осмотический насос, имплантированный под кожу, который осуществляет доставку аналога эксенатида в течение 12 месяцев; Intarcia, Бостон, штат Массачусетс, США)) и агонисты рецептора GLP-1 (например, дулаглутид, семаглутид, альбиглутид, эксенатид, лираглутид, 15 ликсисенатид, таспоглутид, CJC-1131 и BIM-51077, включая их составы для интраназального, трансдермального применения и применения раз в неделю); 6) и DPP-IV-устойчивые аналоги (имитаторы инкретина), агонисты PPAR-гамма, агонисты PPAR-альфа, например, производные фенофибровой кислоты (например, гемфиброзил, клофибрат, ципрофибрат, фенофибрат, безафибрат), агонисты PPAR двойного действия 20 (например, ZYH2, ZYH1, GFT505, чиглитазар, мураглитазар, алеглитезар, соделглитазар и наведглитазар), агонисты PPAR общего действия, ингибиторы PTP1B (например, ISIS-113715 и TTP814), ингибиторы SGLT (например, ASP1941, SGLT-3, эмпаглифлозин, дапаглифлозин, санаглифлозин, BI-10773, PF-04971729, ремоглифлозин, TS-071, тофоглифлозин, ипраглифлозин и LX-4211), стимуляторы секреции инсулина, 25 ингибиторы ангиотензин-преобразующего фермента (например, алацеприл, беназеприл, каптоприл, церонаприл, цилазаприл, делаприл, эналаприл, эналаприлат, фозиноприл, имидаприл, лизиноприл, мовелтиприл, периндоприл, хинаприл, рамиприл, спираприл, темокаприл или трандолаприл), антагонисты рецептора ангиотензина II (например, лозартан, COZAAR®, валсартан, кандесартан, олмесартан, телмисартан и любое из этих 30 лекарственных средств, используемых в комбинации с гидрохлортиазидом, например, HYZAAR®) или другие антигипертензивные препараты, например, LCZ 696, агонисты RXR, ингибиторы киназы-3 гликогенсинтазы, иммуномодуляторы, симпатолитики, бета-адреноблокаторы (например, пропранолол, атенолол, бисопролол, карведилол, метопролол или метопролола тартрат), альфа-адреноблокаторы (например, доксазозин, 35 празозин или альфа-метилдофа), центральные агонисты альфа-адренергических

рецепторов, периферические вазодилататоры (например, гидралазин); агонисты бета-3-адренергических рецепторов, ингибиторы 11-бета-HSD1, ингибиторы нейтральной эндопептидазы (например, тиюфан и фосфорамидон), антагонисты альдостерона, ингибиторы альдостеронсинтазы, ингибиторы ренина (например, производные мочевины и ди- и трипептидов (см. патент США № 5116835), аминокислоты и их производные (патенты США 5095119 и 5104869), цепи аминокислот, связанных непептидными связями (патент США 5114937), производные ди- и трипептидов (патент США 5106835), пептидиламинодиолы (патенты США 5063208 и 4845079) и пептидил-бета-аминоациламинодиолкарбаматы (патент США 5089471); кроме того, ряд других пептидных аналогов, описанных в следующих патентах США: 5071837; 5064965; 5063207; 5036054; 5036053; 5034512 и 4894437, и низкомолекулярные ингибиторы ренина (включая диолсульфаниламиды и сульфинилы (патент США 5098924), N-морфолино-производные (патент США 5055466), N-гетероциклические спирты (патент США 4885292) и пирролимидазолы (патент США 5075451); кроме того, производные пепстатина (патент США 4980283) и фтор- и хлорпроизводные статон-содержащих пептидов (патент США 5066643), эналкирен, RO 42-5892, A 65317, CP 80794, ES 1005, ES 8891, SQ 34017, алискирен (2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(2-карбамоил-2-метилпропил)-5-амино-4-гидрокси-2,7-дизопропил-8-[4-метокси-3-(3-метоксипропокси)-фенил]-октанамида гемифумарат) SPP600, SPP630 и SPP635), антагонисты рецептора эндотелина, ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (например, силденафил, тадалафил и варденафил), вазодилататоры, блокаторы кальциевых каналов (например, амлодипин, нифедипин, верапамил, дилтиазем, галлопамил, нилудипин, нимодипин, никардипин), активаторы калиевых каналов (например, никорандил, пинацидил, кромакалим, миноксидил, априлкалим, лопразолам), агенты, снижающие уровень липидов, например, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, например, симвастатин и ловастатин, доступные в продаже как ZOCOR® и MEVACOR® в форме лактона-пролекарства и действующие как ингибиторы после введения, и фармацевтически приемлемые соли ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы на основе дигидроксикислот с разорванным кольцом, например, аторвастатина (особенно кальциевую соль, доступную в продаже как LIPITOR®), розувастатина (особенно кальциевую соль, доступную в продаже как CRESTOR®), правастатина (особенно натриевую соль, доступную в продаже как PRAVACHOL®), церивастатина и флувастатина (особенно натриевую соль, доступную в продаже как LESCOL®); ингибиторы всасывания холестерина, например, эзетимиб (ZETIA®) и эзетимиб в комбинации с другими агентами, снижающими уровень липидов, например, ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы, указанными выше, и особенно с симвастатином

(VYTORIN®) или с аторвастатин-кальцием; лекарственные средства, повышающие уровень ЛПВП (например, ниацин и агонисты рецептора никотиновой кислоты и их варианты с замедленным или контролируемым высвобождением, и/или в комбинации с ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы; агонисты рецептора ниацина, например, аципимокс и ацифран, а также частичные агонисты рецептора ниацина; антагонисты рецептора глюкагона (например, МК-3577, МК-0893, LY-2409021 и КТ6-971); агенты, поглощающие желчные кислоты (например, колестилан, колестимид, колесевелама гидрохлорид, колестипол, холестирамин и диалкиламиноалкильные производные перекрестно сшитого декстрана), ингибиторы ацил-КоА:холестеринацилтрансферазы, (например, авазимиб); агенты для применения при воспалительных состояниях, например, аспирин, нестероидные противовоспалительные препараты, или НПВП, глюкокортикоиды и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2, или COX-2; активаторы глюкокиназы (GKA) (например, AZD6370); ингибиторы 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы 1 типа, (например, описанные в патенте США № 6730690 и LY-2523199); ингибиторы CETP (например, анацетрапиб, эвацетрапиб и торцетрапиб); ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы, (например, описанные в патентах США № 6054587; 6110903; 6284748; 6399782; и 6489476); ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы-1 или 2 (ACC1 или ACC2); ингибиторы PCSK9; частичные агонисты GPR-40; модуляторы SCD; ингибиторы синтазы жирных кислот; амилин и аналоги амилина (например, прамлинтид); включая фармацевтически приемлемые соли вышеуказанных активных агентов, если это возможно с химической точки зрения.

[00322] Кроме того, в настоящем изобретении рассматривается комбинированная терапия с использованием агентов и способов для стимуляции потери веса, например, агентов, стимулирующих обмен веществ или снижающих аппетит, и изменением диеты и/или схем физической нагрузки, способствующим потере веса.

[00323] Полипептиды согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации с одним или более из других агентов любым образом, соответствующим обстоятельствам. В одном варианте реализации лечение с применением по меньшей мере одного активного агента и по меньшей мере одного полипептида согласно настоящему изобретению поддерживают в течение определенного времени. В еще одном варианте реализации лечение с применением по меньшей мере одного активного агента снижают или прекращают (например, при стабильном состоянии субъекта), в то время как лечение с применением полипептида(ов) согласно настоящему изобретению поддерживают без изменения схемы приема. В дополнительном варианте реализации лечение с применением по меньшей мере одного активного агента снижают или прекращают (например, при

стабильном состоянии субъекта), в то время как лечение с применением полипептида(ов) согласно настоящему изобретению снижают (например, снижая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема). В еще одном варианте реализации лечение с применением по меньшей мере одного активного агента снижают или прекращают (например, при стабильном состоянии субъекта), а лечение с применением по меньшей мере полипептида(ов) согласно настоящему изобретению усиливают (например, повышая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема). В еще одном варианте реализации лечение с применением по меньшей мере одного активного агента поддерживают, а лечение с применением полипептида(ов) согласно настоящему изобретению снижают или прекращают (например, снижая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема). В еще одном варианте реализации лечение с применением по меньшей мере одного активного агента и лечение с применением полипептида(ов) согласно настоящему изобретению снижают или прекращают (например, снижая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема).

Схема приема

[00324] Полипептиды согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту в количестве, зависящем, например, от цели введения (например, желательной степени нормализации состояния); возраста, веса, пола, состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению; природы вводимого полипептида и/или состава; пути введения; и характера заболевания, расстройства, состояния или их симптомов (например, тяжести нарушения регуляции глюкозы/инсулина и стадии расстройства). Схему приема можно также разрабатывать с учетом наличия, характера и степени нежелательных эффектов, связанных с вводимым(и) агентом(ами). Эффективные дозы и схемы приема легко определить, например, на основании исследований безопасности и исследований с увеличением дозы, исследований *in vivo* (например, на животных моделях) и других способов, известных специалисту в данной области техники.

[00325] В общем случае, параметры режима приема определяют, что доза в количественном отношении должна быть меньше количества, которое может быть необратимо токсичным для субъекта (т.е. максимально переносимой дозы, MTD) и не меньше количества, необходимого для измеримого влияния на субъекта. Такие количества определяются, например, фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, связанными с поглощением, распределением, метаболизмом и выведением («ADME»), с учетом пути введения и других факторов.

[00326] 2Эффективная доза (ЭД) является дозой или количеством препарата, дающим терапевтический ответ или желаемый эффект у некоторой доли пациентов, принимающих его. «Медианная эффективная доза» или ЭД50 агента представляет собой дозу или количество агента, позволяющее получить терапевтический ответ или желательный эффект у 50% популяции субъектов, которым вводят данный агент. Хотя ЭД50 обычно используют в качестве показателя обоснованной вероятности эффекта агента, она не обязательно представляет собой дозу, которую клиницист может считать целесообразной с учетом всех соответствующих факторов. Так, в некоторых ситуациях эффективное количество превышает расчетное значение ЭД50, в других ситуациях эффективное количество составляет менее расчетного значения ЭД50, а в прочих ситуациях эффективное количество аналогично расчетному значению ЭД50.

[00327] Кроме того, эффективная доза полипептида(ов) согласно настоящему изобретению может представлять собой количество, которое при введении субъекту в виде одной или нескольких доз позволяет получить желательный результат по сравнению со здоровым субъектом. Например, эффективная доза может представлять собой дозу, которая при введении субъекту с повышенным уровнем глюкозы и/или инсулина в плазме позволяет достичь желательного снижения по сравнению с уровнем у здорового субъекта, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80% или более чем на 80%.

[00328] Целесообразный уровень дозировки обычно составляет от приблизительно 0,001 до 100 мг/кг массы тела пациента в день, которые можно вводить в виде одной или нескольких доз. В некоторых вариантах реализации уровень дозировки составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 25 мг/кг в день, а в других вариантах реализации - от приблизительно 0,05 до приблизительно 10 мг/кг в день. Подходящий уровень дозировки может составлять от приблизительно 0,01 до 25 мг/кг в день, от приблизительно 0,05 до 10 мг/кг в день, или от приблизительно 0,1 до 5 мг/кг в день. В пределах этого диапазона дозировка может составлять от 0,005 до 0,05, от 0,05 до 0,5 или от 0,5 до 5,0 мг/кг в день.

[00329] Для перорального введения агента композицию можно представить в форме таблеток, капсул и т.п., содержащих от 1,0 до 1000 мг активного ингредиента, в частности, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0,

600,0, 750,0, 800,0, 900,0 и 1000,0 мг активного ингредиента. Полипептид(ы) можно вводить по схеме, например, от 1 до 4 раз в день, и часто один или два раза в день.

[00330] Прием полипептида(ов) согласно настоящему изобретению можно повторять с соответствующей частотой, которая может находиться в пределах от одного раза в день до одного раза в три месяца, в зависимости от фармакокинетики полипептида(ов) (например, времени полужизни) и фармакодинамического ответа (например, продолжительности терапевтического эффекта полипептида(ов)). В некоторых вариантах реализации прием часто повторяют от одного раза в неделю до одного раза каждые 3 месяца. В других вариантах реализации полипептид(ы) вводят приблизительно один раз в месяц.

[00331] В некоторых вариантах реализации дозировка описанного(ых) полипептида(ов) содержится в "дозированной лекарственной форме". Фраза "дозированная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, причем каждая единица содержит заранее определенное количество полипептида(ов) согласно настоящему изобретению отдельно либо в комбинации с одним или более дополнительными агентами, достаточное для получения желательного эффекта. Следует принимать во внимание, что параметры дозированной лекарственной формы зависят от конкретного агента и планируемого эффекта.

Наборы

[00332] В настоящем изобретении также рассматриваются наборы, содержащие описанный(е) полипептид(ы) и их фармацевтические композиции. Наборы, как правило, представлены в виде физической структуры, в которой размещены различные компоненты, описанные ниже, которую можно использовать, например, при практической реализации способов, описанных выше (например, введении полипептида(ов) субъекту, нуждающемуся в снижении массы тела).

[00333] Набор может содержать один или более из полипептида(ов), описанного(ых) в настоящем документе (например, в стерильном контейнере), который может присутствовать в форме фармацевтической композиции, пригодной для введения субъекту. Полипептид(ы) могут присутствовать в форме, готовой к применению, или в форме, требующей, например, восстановления или разбавления перед введением. Если полипептид(ы) находятся в форме, которая требует восстановления пользователем, набор может также содержать буферы, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и т.п., упакованные с полипептидом(ами) или отдельно. Если рассматривается комбинированная терапия, набор может содержать несколько агентов по отдельности, или они уже могут быть объединены в составе набора. Каждый компонент набора можно

поместить в отдельный контейнер, и все контейнеры могут находиться в одной упаковке. Набор согласно настоящему изобретению может предусматривать условия, необходимые для надлежащего поддержания компонентов, размещенных в нем (например, охлаждение или замораживание).

- 5 **[00334]** Набор может содержать этикетку или вкладыш в упаковку, содержащие идентифицирующую информацию о компонентах, входящих в его состав, а также инструкции по их применению (например, параметры приема, клиническую фармакологию активного(ых) ингредиента(ов), в том числе механизм действия, фармакокинетику и фармакодинамику, побочные эффекты, противопоказания и т.д.).
- 10 Этикетки или вкладыши могут содержать информацию о производителе, например, номера партий и даты истечения срока годности. Этикетку или вкладыш в упаковку можно, например, интегрировать в физическую структуру, в которой размещены компоненты, отдельно поместить в указанную физическую структуру, или прикрепить к компоненту набора (например, ампуле, пробирке или флакону). Типичные инструкции
- 15 включают инструкции по уменьшению или снижению уровня глюкозы в крови, лечению гипергликемии, лечению сахарного диабета и т.д. с применением описанных модуляторов и фармацевтических композиций на их основе

- [00335]** Этикетки или вкладыши могут дополнительно содержать или содержаться на машиночитаемом носителе, например, диске (например, жестком диске, карте, носителе памяти), оптическом диске, например, CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3,
- 20 магнитной ленте или электрическом носителе информации, например, ОЗУ и ПЗУ или их гибридах, например, магнитные/оптических носителях, флэш-носителях или картах памяти. В некоторых вариантах реализации инструкции фактически отсутствуют в наборе, однако предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника,
- 25 например, сети Интернет.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

- [00336]** Следующие примеры представлены с целью обеспечить специалистов в данной области техники полным описанием способов реализации и применения настоящего
- 30 изобретения и не предназначены для ограничения рамок того, что авторы изобретения считают своим изобретением; кроме того, авторы изобретения не намереваются сказать, что эксперименты, описанные ниже, представляют собой все выполненные эксперименты или единственные выполненные эксперименты. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых численных значений (например, количеств,

температуры и т.д.), однако следует учитывать возможность некоторых экспериментальных ошибок и отклонений.

[00337] Если не указано иное, доли являются массовыми долями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура приведена в градусах Цельсия (°C), а давление равно или близко к атмосферному. Используются стандартные сокращения, в том числе: п.о. = пар оснований; т.п.о. = тысяч пар оснований; пл = пиколитр(ы); с или сек = секунда(ы); мин = минута(ы); ч = час(ы); АК = аминокислота(ы); т.п.о. = тысяч пар оснований; нт = нуклеотид(ы); нг = нанogramм; мкг = микрограмм; мг = миллиграмм; г = грамм; кг = килограмм; дл = децилитр; мкл = микролитр; мл = миллилитр; л = литр; мкМ = микромолярный; mM = миллимолярный; М = молярный; кДа = килодальтон; в/м = внутримышечно(ый); в/б = внутрибрюшинно(ый); п/к = подкожно(ый); 2 р/сут = два раза в день; ВЭЖХ = высокоэффективная жидкостная хроматография; МТ = масса тела; Ед = единица; нз = не является статистически значимым; РG = уровень глюкозы в плазме натошак; FPI = уровень инсулина в плазме натошак; ITT = тест переносимости инсулина; PTT = тест переносимости пирувата; oGTT = пероральный тест переносимости глюкозы; GSIS = секреция инсулина под действием глюкозы; PBS = физиологический раствор с фосфатным буфером; ПЦР = полимеразная цепная реакция; NHS = N-гидроксисукцинимид; DMEM = среда Игла, модифицированная по Дульбекко; GC = копия генома; ЭДТА = этилендиаминтетрауксусная кислота.

Материалы и способы

[00338] Следующие способы и материалы использованы в примерах, описанных ниже.

[00339] Животные. Самцов мышей C57BL/6J с алиментарным ожирением (The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэйн) содержали на корме с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diets, Inc., Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США), содержащем 60 ккал% жира, 20 ккал% белка и 20 ккал% углеводов в течение 12-20 недель. Все исследования на животных были одобрены комитетом по уходу за животными и их использованию NGM. Мыши DIO C57BL/6J представляют собой модель ожирения, аналогичную ожирению у человека, где ожирение основано на потреблении чрезмерного количества калорий. Мыши C57BL/6J склонны к ожирению, при котором наблюдается выраженное увеличение массы тела, а также гиперинсулинемия и иногда гипергликемия. Эта линия представляет собой наиболее часто используемую линию мышей для моделирования алиментарного ожирения. (Nilsson C., et al., Acta Pharmacologica Sinica (2012) 33: 173-181).

[00340] Нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Последовательность с учетным номером GenBank BC000529.2 представляет собой кДНК ОРС, кодирующую варианты GDF15 человека, а последовательность с учетным номером GenBank NP_004855.2 представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую указанной кДНК. кДНК сывороточного альбумина Homo sapiens приобрели в Origene (SC319937), учетный номер GeneBank NM_000477.3, NP_000468).

[00341] Элемент Козака и последовательность IgK-сигнальный пептид человека (5'CAACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT3') (SEQ ID NO: 98) встроили в вектор pTT5 (National Research Council, Канада) между сайтами PmeI и EcoRI. Хотя оба указанные сайта рестрикции были удалены, для дальнейшего клонирования в рамке считывания создали сайт AgeI. Для создания конструктора hIgK-GDF15 ДНК GDF15 амплифицировали с помощью ПЦР с использованием прямого праймера: 5'-CTCCGAGGTGCCAGATGTGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGG 3' (SEQ ID NO: 102) и обратного праймера: 5'-CCTCGAGCGGCCGCTAGCTCATATGCAGTGGCAGTCTTTGGCTAACA 3' (SEQ ID NO: 99) и ПЦР-смеси Sapphire (Clontech). Продукт ПЦР очищали в геле (набор для выделения из геля Qiagen Gel Extraction Kit) и клонировали в pTT5-hIgK (линеаризованную с помощью AgeI/HindIII) с использованием In-Fusion (Clontech). Для создания конструктора hIgK-ЧСА-линкер-GDF15 ЧСА-линкер и GDF15 по отдельности амплифицировали с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров. После очистки в геле собирали два ПЦР-фрагмента и линеаризованный вектор pTT5 с помощью мастер-микса для сборки Gibson Assembly Master Mix. Клетки Stellar или NEB 5α, трансформированные посредством реакций In-Fusion и Gibson, соответственно, высевали на LB-агар, содержащий карбенициллин, и инкубировали в течение ночи при 37 °C. Одиночные колонии собирали и анализировали посредством секвенирования. ДНК положительных колоний очищали (ДНК-Maxi-prep, Qiagen), подтверждали с помощью полного секвенирования и использовали для трансфекции клеток млекопитающих с целью экспрессии рекомбинантного белка.

[00342] Для создания специфических мутеинов выполняли сайт-специфический мутагенез с использованием набора QuikChange Lightning (Agilent) и соответствующих праймеров.

[00343] Временная экспрессия. Все мутеины GDF15 трансфицировали в клетки Expi 293F (Invitrogen Corporation, Карлсбад, штат Калифорния, США). Клетки в рабочем порядке пересевали в среде для экспрессии Expi (Invitrogen) и поддерживали в виде

сuspензионных культур в колбах различного размера. Как правило, клетки пересевали при плотности клеток 5×10^5 жизнеспособных клеток/мл и выращивали в течение 3-х дней до посева. Колбы поддерживали в увлажненном CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5% уровне CO_2 . Клетки поддерживали на шейкерах New Brunswick (New Brunswick Scientific Company, Эдисон, штат Нью-Джерси, США) при скорости перемешивания 120 об/мин.

[00344] Трансфекцию выполняли по достижении плотности клеток в культуре, равной $2,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл при более чем 95% жизнеспособности. Как правило, для 50-мл трансфекции инокулировали $2,5 \times 10^6$ клеток/мл $\times$ 50 мл в 250-мл встряхиваемую колбу в объеме культуры 42,5 мл. 50 мкг плазмидной ДНК, состоящей из экспрессирующего вектора, содержащего исследуемый ген, вначале разбавляли 2,5 мл восстановленной сывороточной среды OPTI-MEM (Invitrogen). В то же время реагент для трансфекции экспифектамин (Invitrogen) в 2,67-кратном объеме (по сравнению с количеством плазмидной ДНК) также разбавляли 2,5 мл восстановленной сывороточной среды OPTI-MEM. После 5 минут инкубирования при комнатной температуре разбавленный реагент для трансфекции медленно добавляли к разбавленной плазмидной ДНК для образования трансфекционных компетентных комплексов. После 20 минут инкубирования при комнатной температуре 5 мл трансфекционных комплексов добавляли к 42,5 мл клеточной культуры. Затем трансфицированные клетки помещали в увлажненный CO_2 -инкубатор на орбитальный шейкер со скоростью перемешивания 120 об/мин. Через двадцать четыре часа после трансфекции в трансфицированную культуру вносили 250 мкл энхансерного раствора 1 (Invitrogen) и 2,5 мл энхансерного раствора 2 (Invitrogen). Затем культуру вновь помещали в увлажненный CO_2 -инкубатор на орбитальный шейкер. Через 6-7 дней после трансфекции культуры собирали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин, а затем фильтровали через 0,2-мкм фильтр (Nalgene). Затем образцы анализировали на предмет экспрессии в геле с окрашиванием кумасси.

[00345] Стабильная экспрессия в клетках CHO. Мутеины GDF15 стабильно экспрессировали в системе GS XceedTM с использованием линии клеток-хозяев CHOK1SV GS-KO, основанной на хорошо изученной системе экспрессии компании Lonza для клеток CHOK1SV. Система GS Xceed обеспечивает получение линий клеток с высоким уровнем экспрессии, пригодных для продукции цГМФ. Система включает клетки-хозяева CHOK1SV GS-KO, накапливающие цГМФ, GS-экспрессирующие векторы, полные протоколы культивирования клеток, трансфекции, селекции и скрининга линий клеток и процессов продукции версии 8 (среды и реакционные смеси). При разработке линий клеток для мутеинов GDF15 соблюдали рекомендации производителя, вначале получив

неклонированные линии клеток. Затем неклонированные линии клеток подвергали клонированию с ограниченным разбавлением для выделения генетически однородных клонов клеток с высоким уровнем экспрессии.

[00346] Очистка рекомбинантного белка GDF15. Гибриды ЧСА-GDF15 очищали от

5 культуральной среды, используя аффинный захват на голубой сефарозе или ионообменный захват. В обоих случаях гибриды ЧСА-GDF15 элюировали с использованием градиента соответствующей соли/pH, подходящего для оптимального элюирования и отделения от примесей белка клетки-хозяина. Затем все гибриды ЧСА-GDF15 очищали с использованием колонки GE Healthcare Superdex 200 (26/60) и 1X PBS в
10 качестве подвижного буфера. Затем исследовали характеристики и подтверждали последовательность очищенных гибридов посредством ЖХ/МС (Agilent 6500-series Q-TOF), подтверждали монодисперсность гель-фильтрацией-ВЭЖХ (Agilent 1200-ВЭЖХ) и электрофорезом в ДСН-ПААГ (невосстанавливающем и восстанавливающем) с окрашиванием кумасси и/или серебром. Для экспериментов *in vivo* подтверждали, что
15 содержание эндотоксинов было менее 5 ЭЕ/мг при подкожной инъекции.

[00347] Гликозилированные мутеины GDF15 очищали от культуральной среды посредством ионообменного захвата. Во всех случаях мутеины GDF15 элюировали с использованием градиента соответствующей соли/pH, подходящего для оптимального элюирования и отделения от примесей белка клетки-хозяина. Затем все мутеины GDF15
20 дополнительно очищали с помощью GE HiTrap Phenyl HP при pH 8,0 с использованием понижающегося линейного градиента сульфата аммония. Фракции оценивали и объединяли на основании чистоты и параметров гликозилирования посредством сдвига геля при электрофорезе в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Затем дополнительно оценивали характеристики окончательных объединенных образцов
25 каждого мутеина GDF15 и подтверждали последовательность/присутствие гликана (+/- ПНГаза F, № в каталоге NEB P0704S) посредством ЖХ/МС (Agilent 6500-series Q-TOF), подтверждали монодисперсность гель-фильтрацией-ВЭЖХ (Agilent 1200-ВЭЖХ) и электрофорезом в ДСН-ПААГ (невосстанавливающем и восстанавливающем) с окрашиванием кумасси и/или серебром. Составы всех мутеинов GDF15 получали в 10 мМ
30 ацетате натрия pH 4,0.

[00348] Оценка растворимости мутеинов GDF15 человека. Мутеины диализовали в 0,01% (об/об) муравьиной кислоты (pH 2,0) и концентрировали с помощью центробежных фильтров Amicon Ultra Centrifugal Filters из регенерированной нитроцеллюлозы 10000 NMWL (UFC901096) в некоторых случаях до концентрации более 10 мг/мл. Начальную
35 концентрацию каждого мутеина определяли по оптической плотности при длине волны

280 нм по закону Бера (коэффициент экстинкции = 14400, молекулярная масса = 12287 Да). Затем каждый мутеин последовательно двукратно разбавляли 0,01% муравьиной кислотой, и 90 мкл каждого разведения добавляли в 96-луночный планшет. 10 мкл 10X PBS (содержащего 0,5 М трис, pH 7,0) добавляли в каждую лунку и подтверждали, что pH был равен 7. После инкубирования при комнатной температуре в течение ночи при встряхивании измеряли мутность при длине волны 370 нм. Пороговое значение, при котором возникала мутность, принимали за максимальную растворимость каждого мутеина. Мутеины относили к одной из пяти групп в зависимости от уровня их растворимости: < 0,2 мг/мл = +; ≥ 0,2 мг/мл = ++; ≥ 0,5 мг/мл = +++; ≥ 1,0 мг/мл = ++++; ≥ 5,0 мг/мл = +++++.

Пример 1: Конструирование стабилизированной гибридной молекулы ЧСА-GDF15

[00349] Экспрессия конструктора M1 выявила проблемы продукции в стабильной линии клеток CHOK1SV GSKO (фигура 4). В среде для культивирования клеток отмечали значительное укорачивание димерной гибридной молекулы ЧСА-GDF15. Укороченные разновидности выделяли с помощью ионообменной и/или гидрофобной хроматографии и/или гель-фильтрации с целью получения источника обогащенных разновидностей для дальнейшей оценки характеристик. После ЖХ/МС-анализа на приборе Agilent 6500-series Q-TOF обнаружили сайты укорачивания на С-конце ЧСА-гибрида, в линкере и на N-конце GDF15. Выявлены следующие основные разновидности конструктора M1 (линкер = подчеркнутый шрифт, GDF15 = полужирный шрифт):

[00350] Разновидность 1 (SEQ ID NO:103):

[00351] DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLV

[00352] Разновидность 2 (SEQ ID NO:104):

[00353] DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP

NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
 QAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKA
 EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
 KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
 5 VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
 RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
 ASQAALG

10 **[00354] Разновидность 3 (SEQ ID NO:105):**

[00355] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
 CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
 NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
 QAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKA
 15 EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
 KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
 VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
 20 RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
 ASQAALGLG

[00356] Отмечено, что разновидность 3 содержит аминокислотную последовательность
 зрелого человеческого сывороточного альбумина и одну (первую) аминокислоту
 последовательности линкера. В разновидностях 1 и 2 не хватает восьми последних
 25 аминокислот и одной последней аминокислоты на С-конце аминокислотной
 последовательности зрелого человеческого сывороточного альбумина.

[00357] Разновидность 4 (SEQ ID NO:106):

[00358] DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKT
 CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
 30 NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
 QAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKA
 EFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
 KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
 VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYK
 35 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL

CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSAR

[00359] Разновидность 5 (SEQ ID NO:107):

5 [00360] DANKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLNVNEVTEFAKT
CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKA
EFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLE
10 KSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYK
FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
15 ASQAALGLGGGSGGGGSGGGGSARN

[00361] Для минимизации и исправления проблем с укорачиванием вблизи линкерной области гибридной молекулы конструктор M2 сделали эквивалентным конструктору M1, хотя он был укорочен на первые три N-концевых остатка GDF15 (Δ ARN или Δ N3) (фигура 3). Полученный стабилизированный конструктор M2 при экспрессии в стабильной линии
20 клеток CHOK1SV GSKO демонстрировал минимальные проблемы с укорачиванием, наблюдавшиеся для M1, при сравнении кондиционированных сред для каждого экспрессированного конструктора. На фигуре 4 продемонстрировано значительное укорачивание, наблюдавшееся для M1, и стабильность конструктора M2.

[00362] На основании улучшенной стабильности, наблюдаемой для конструктора M2, дальнейшее проектирование позволило определить оптимальную длину линкера и
25 возможность укорачивания. Линкеры оптимизированной длины $[(G_4S)]_5$ получили и присоединили к N-концевым делециям 3 остатков (M3 – Δ ARN или Δ N3) или 6 остатков GDF15 (M4 – Δ ARNGDH или Δ N6) (см. фигуру 5).

30 **Пример 2: Влияние стабильности улучшенных гибридных молекул ЧСА–GDF15 на массу тела и прием пищи у модели DIO мыши**

[00363] Влияние подкожного введения гибридной молекулы, содержащей рекомбинантный ЧСА, объединенный с рекомбинантным GDF15 человека, на массу тела и прием пищи оценивали в течение 7 дней. Вкратце, гибридные белки M1 (фигура 3), M3
35 и M4 (фигура 5) вводили в дозах 4 нмоль/кг, 12 нмоль/кг и 40 нмоль/кг в виде

однократной подкожной болюсной инъекции (10 мл/кг) DIO-мышам массой приблизительно 38-40 г. Через 24 часа и 7 дней после введения контрольной среды-носителя или гибридных белков выполняли мониторинг массы тела и приема пищи с целью мониторинга эффективности. Результаты, полученные для DIO-мышей, получивших дозу 40 нмоль/кг, представлены на фигурах 6 и 7.

[00364] Как показано на фигуре 6, введение гибридных белков в дозе 40 нмоль/кг (4 нмоль/кг и 12 нмоль/кг не показаны) привело к значительному улучшению с точки зрения снижения потребления пищи. В каждой группе мышей ($n = 8$) значения p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, нз = не значимо) определяли с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок при сравнении потребления пищи при получении различных концентраций с контрольной группой, получавшей носитель, в каждый указанный момент времени.

[00365] На фигуре 6 показано, что введение гибридных белков по сравнению с контрольной средой-носителем через 24 часа (1 день) привело к снижению потребления пищи (среда-носитель = 2,8 г $\pm$ 0,13 г): группа, получавшая 4 нмоль/кг ($M1 = 1,9$ г $\pm$ 0,25 г, **, $M3 = 1,8$ г $\pm$ 0,18 г, ***, $M4 = 1,8$ г $\pm$ 0,10 г, ***), группа, получавшая 12 нмоль/кг ($M1 = 1,5$ г $\pm$ 0,19 г, ***, $M3 = 1,9$ г $\pm$ 0,16 г, ***, $M4 = 1,7$ г $\pm$ 0,12 г, ***), и группа, получавшая 40 нмоль/кг ($M1 = 1,3$ г $\pm$ 0,11 г, ***, $M3 = 1,8$ г $\pm$ 0,06 г, ***, $M4 = 1,5$ г $\pm$ 0,15 г, ***). Введение гибридных молекул по сравнению с контрольной средой-носителем через 7 дней привело к снижению потребления пищи (среда-носитель = 2,7 г $\pm$ 0,09 г): группа, получавшая 4 нмоль/кг ($M1 = 2,0$ г $\pm$ 0,18 г, **, $M3 = 2,5$ г $\pm$ 0,08 г, нз; $M4 = 2,5$ г $\pm$ 0,09 г, нз), группа, получавшая 12 нмоль/кг ($M1 = 2,0$ г $\pm$ 0,20 г, **, $M3 = 2,2$ г $\pm$ 0,17 г, *, $M4 = 2,4$ г $\pm$ 0,28 г, нз) и группа, получавшая 40 нмоль/кг ($M1 = 1,7$ г $\pm$ 0,14 г, ***, $M3 = 2,4$ г $\pm$ 0,25 г, нз; $M4 = 2,2$ г $\pm$ 0,24 г, нз).

[00366] Как показано на фигуре 7, введение гибридных молекул в дозе 40 нмоль/кг (4 нмоль/кг и 12 нмоль/кг не показаны) привело к значительному снижению массы тела. В каждой группе мышей ($n = 8$) значения p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, нз = не значимо) определяли с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок при сравнении потребления пищи при получении различных концентраций с контрольной группой, получавшей носитель, в каждый указанный момент времени.

[00367] На фигуре 7 показано, что во время обработки (день = 0) до введения гибридных белков или контрольной среды-носителя были зарегистрированы следующие значения массы тела (среда-носитель = 39,0 г $\pm$ 0,92 г): группа, получавшая 4 нмоль/кг ($M1 = 39,2$ г $\pm$ 0,66 г; $M3 = 39,4$ г $\pm$ 0,91 г; $M4 = 39,3$ г $\pm$ 0,77 г), группа, получавшая 12 нмоль/кг ($M1 = 39,4$ г $\pm$ 0,78 г; $M3 = 39,3$ г $\pm$ 1,09 г; $M4 = 39,3$ г $\pm$ 0,81 г), и группа,

получавшая 40 нмоль/кг (M1 = 39,2 г +/- 0,64 г; M3 = 39,2 г +/- 0,68 г; M4 = 38,9 г +/- 0,60 г). Через 24 часа (день = 1) после введения гибридных молекул и контрольной среды-носителя зарегистрировали следующие значения массы тела (% снижения = дельта (разность) по сравнению с массой тела в группе до введения дозы). Среда-носитель = +0,3 г +/- 0,11 г, +0,6%), группа, получавшая 4 нмоль/кг (M1 = -0,6 г +/- 0,21 г, -1,5%, ***; M3 = -0,6 г +/- 0,17 г, -1,6%, ***; M4 = -0,9 г +/- 0,13 г, -2,4%, ***), группа, получавшая 12 нмоль/кг (M1 = -0,9 г +/- 0,11 г, -2,3%, ***; M3 = -0,7 г +/- 0,18 г, -1,6%, ***; M4 = -0,6 г +/- 0,16 г, -1,7%, ***), и группа, получавшая 40 нмоль/кг (M1 = -1,0 г +/- 0,14 г, -2,5%, ***; M3 = -0,6 г +/- 0,09 г, -1,5%, ***; M4 = -0,8 г +/- 0,22 г, -2,1%, ***). Через 7 дней после введения гибридных молекул и контрольной среды-носителя зарегистрировали следующие значения массы тела (% снижения = дельта (разность) по сравнению с массой тела в группе до введения дозы). Среда-носитель = +1,2 г +/- 0,25 г, +3,1%), группа, получавшая 4 нмоль/кг (M1 = -1,3 г +/- 0,30 г, -3,3%, ***; M3 = -1,1 г +/- 0,32 г, -2,8%, ***; M4 = -2,0 г +/- 0,29 г, -5,0%, ***), группа, получавшая 12 нмоль/кг (M1 = -1,8 г +/- 0,34 г, -4,7%, ***; M3 = -1,4 г +/- 0,43 г, -3,6%, ***; M4 = -1,5 г +/- 0,32 г, -3,7%, ***), и группа, получавшая 40 нмоль/кг (M1 = -2,6 г +/- 0,28 г, -6,7%, ***; M3 = -2,1 г +/- 0,28 г, -5,4%, ***; M4 = -2,6 г +/- 0,31 г, -6,7%, ***).

[00368] Данные на фигурах 6 и 7 показывают, что гибриды ЧСА с оптимизированным линкером и GDF15, укороченным по N-концу, являются активными, и что такие гибридные молекулы представляют собой жизнеспособный подход для повышения определенных выгодных свойств молекул GDF15.

Пример 3: Мутеины GDF15 человека с улучшенными физическими свойствами

[00369] Данные, изложенные в примере 3, направлены на устранение ограничений растворимости, связанных с гидрофобностью и гидрофильностью поверхности, присущей зрелому GDF15 человека. Кроме того, выполнена оценка влияния введения консенсусного(ых) сайта(ов) N-связанного гликозилирования в последовательность зрелого GDF15 человека на растворимость. Для облегчения оценки характеристик экспрессии, параметров гликозилирования и растворимости зрелых рекомбинантных мутеинов GDF15 человека все мутеины сконструировали в виде зрелых мутеинов, объединенных с последовательностью сигнального пептида IgK, изображенных на фигуре 8A. Получили 17 мутеинов GDF15 (обозначенные как M5-M21; SEQ ID NO: 81-97, соответственно). Для M16 получили вариант с N-концевой делецией: мутеин ΔN3-M16, и выполнили оценку его растворимости. Мутеин M5 содержал два консенсусных сайта N-связанного гликозилирования, внедренные путем замены D в положении 5 в GDF15 дт

(SEQ ID NO: 1) на Т и замены R в положении 21 GDF15 дт (SEQ ID NO: 1) на N. В мутеины M6-M21 ввели один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования (см. фигуру 8А). Следует отметить, что, хотя мутеины содержат сигнальную последовательность IgK на N-конце с целью указания положения замены, остатки нумеруют в соответствии с положением соответствующего остатка в SEQ ID NO: 1. Так, например, хотя Т присутствует в мутеине M5 в положении 27, его считают положением 5, поскольку положение соответствующего остатка D в SEQ ID NO: 1 соответствует 5.

[00370] Оценку растворимости выполняли по отношению к мутеинам (в 0,01% муравьиной кислоте), добавляя 10X PBS + 0,5 М трис pH 7,0, жесткий буфер, в котором можно выполнить оценку улучшения растворимости мутеина по сравнению со зрелым GDF15 человека.

[00371] Оценку растворимости выполняли на основании оптической плотности при длине волны 280 нм по закону Бера, рассчитывая ее с использованием коэффициента экстинкции (зрелый GDF15 человека = 14400/мономер) и молекулярной массы (зрелый GDF15 человека = 12278 Да/мономер).

[00372] Перед оценкой растворимости каждый из сконструированных N-гликозилированных мутеинов на фигуре 8А и мутеин ΔN3-M16 оценивали на предмет секреции в виде уложенного гомодимера GDF15 в среду для тканевых культур млекопитающих и на занятость сайта N-гликаном. Как указано на фигуре 9, четырнадцать из восемнадцати гликозилированных мутеинов секретировались в виде уложенных гомодимеров GDF15, в то время как M8, M10, M14 и M15 не образовывали димеров и экспрессировались в виде агрегатов. Затем все четырнадцать экспрессируемых гликозилированных мутеинов, секретировавшихся в виде гомодимеров, оценивали посредством ЖХ/МС и сдвига геля при электрофорезе в ДСН-ПААГ с целью определения присутствия N-гликановых групп в консенсусном сайте после очистки от кондиционированной среды. Во всех 14 случаях экспрессированные мутеины характеризовались высокой степенью занятости, и данный субнабор анализировали на предмет улучшения физических свойств, например, растворимости.

[00373] Сконструированные N-гликозилированные мутеины GDF15, секретировавшиеся в виде гомодимеров и обладавшие высокой степенью занятости консенсусного сайта гликаном, подвергали мониторингу на предмет улучшения растворимости по сравнению со зрелым GDF15 человека. Пороговое значение, при котором возникала мутность, принимали за максимальную растворимость каждого мутеина. Мутеины относили к одной из пяти групп в зависимости от уровня их растворимости: < 0,2 мг/мл = +; ≥ 0,2 мг/мл = ++; ≥ 0,5 мг/мл = +++; ≥ 1,0 мг/мл = ++++; ≥

5,0 мг/мл = +++++. Каждый из N-гликозилированных мутеинов GDF15, подвергавшихся оценке, демонстрировал улучшенную растворимость по сравнению со зрелым GDF15 человека: M5: +++++, M7: +++, M11: +++, M12: +++, M13: +++++, M16: +++++, ΔN3-M16: +++++, M17: +++++, M20: +++++, M21: +++.

5

Пример 4: Влияние мутеинов M16, ΔN3-M16 и M17 на потребление пищи в модели DIO мыши

[00374] Оценивали влияние подкожно вводимых гликомутеинов на потребление пищи. Гликомутеин M16 (SEQ ID NO: 92) и M17 (SEQ ID NO: 93) описаны выше в примере 3. Кроме того, выполнили оценку гликомутеина, обозначенного как ΔN3-M16. Последовательность гликомутеина ΔN3-M16 представлена ниже:

[00375] mdmrvpaqlglglwlgarcGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREV
QVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSL
QTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 100)

[00376] Следует отметить, что полипептиды, вводимые мышам, не содержали сигнальной последовательности IgK (mdmrvpaqlglglwlgarc, SEQ ID NO: 101), поскольку сигнальная последовательность IgK отщеплялась от секретируемого полипептида сигнальной пептидазой, экспрессируемой клетками (клетками 293).

[00377] На фигуре 10 показано, что подкожное введение однократной дозы 1,0 мг/кг (40 нмоль/кг) среды-носителя (PBS), зрелого GDF15 человека или N-гликозилированного мутеина осуществляли 17-недельным самцам DIO мышей (n = 9). Выполняли мониторинг потребления пищи (грамм/животное) в течение 24 часов после подкожного введения. Значения p определяли с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок по сравнению с группой, получавшей среду-носитель (PBS).

[00378] Как показано на фигуре 10, введение гликомутеинов привело к снижению потребления пищи. В каждой группе мышей значения p (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001) определяли с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок при сравнении потребления пищи с контрольной группой, получавшей среду-носитель. GDF15 дикого типа также снижал потребление пищи.

Пример 5: Влияние мутеинов M16, ΔN3-M16 и M17 на массу тела в модели DIO мыши

[00379] Оценивали влияние подкожно вводимых гликомутеинов на массу тела. Подкожное введение однократной дозы 1,0 мг/кг (40 нмоль/кг) среды-носителя (PBS), зрелого GDF15 человека или N-гликозилированного мутеина (M16, M17 и ΔN3-M16)

осуществляли 17-недельным самцам DIO мышей ($n = 9$). Выполняли мониторинг массы тела в течение 24 часов после подкожного введения. Значения P определяли с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок по сравнению с группой, получавшей среду-носитель (PBS).

- 5 **[00380]** Введение гликомутеинов привело к снижению массы тела (фигура 11). В каждой группе мышей значения p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) определяли с помощью Т-критерия Стьюдента для независимых выборок при сравнении потребления пищи с контрольной группой, получавшей среду-носитель. GDF15 дикого типа также снижал массу тела.

- 10 **[00381]** В настоящем документе описаны конкретные варианты реализации настоящего изобретения, включая наилучшие способы его осуществления, известные авторам. При чтении вышеприведенного описания для лиц, работающих в данной области техники, могут стать очевидны изменения описанных вариантов реализации, и ожидается, что
- 15 опытные специалисты могут при необходимости использовать такие изменения. Соответственно, предполагается, что на практике изобретение будет использовано иначе, чем описано в данном документе, и что настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, изложенные в формуле изобретения, приложенной к данному документу в соответствии с действующим законодательством.
- 20 Кроме того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охватывается изобретением, если иное не указано в данном документе, или иным образом явно не противоречит контексту.

- [00382]** Все публикации, патентные заявки, учетные номера и другие источники, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок
- 25 для всех целей, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и по отдельности включены посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> NGM Biopharmaceuticals, Inc.
Lindhout, Darrin A
Haldankar, Raj
Tian, Hui

<120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

<130> NGMB-139WO

<150> US 62/031 063

<151> 30.07.2014

<160> 127

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala	Arg	Asn	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg
1				5					10					15	

Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp
			20					25					30		

Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys
		35					40					45			

Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser
	50					55					60				

Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro
65					70					75					80

Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Val
			85						90					95	

Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Cys	His	Cys	Ile
		100						105					110		

<210> 2

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 2

Ala	Arg	Asn	Gly	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp	20	25	30
Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys	35	40	45
Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser	50	55	60
Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro	65	70	75
Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val	85	90	95
Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile	100	105	110

<210> 3
 <211> 112
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая полипептидная последовательность

 <400> 3

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Asn	1	5	10	15
Leu Thr Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp	20	25	30	
Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys	35	40	45	
Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser	50	55	60	
Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro	65	70	75	80
Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val	85	90	95	
Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile	100	105	110	

<210> 4
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 4

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 5
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 5

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 6

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 6

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Asn Gln Thr Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 7

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 7

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Asn Phe Thr Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 8

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 9

<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 9

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 10
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 10

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Asn
50 55 60

Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp

20

25

30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Asn Tyr Thr Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 13

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 13

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 14

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 15

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gly Thr
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 16

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 16

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Asn
85 90 95

Ser Thr Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 17

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 17

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 18

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 18

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn Lys Thr Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 19

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 19

Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 20

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 20

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Asn Leu Thr Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 21

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 21

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

Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
 35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 22

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 22

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

Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln

35

40

45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 23

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 23

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Asn Gln
 35 40 45

Thr Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 24

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 24

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Asn
35 40 45

Phe Thr Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 25

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 25

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 26

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 26

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 27

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 27

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 28

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 28

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Asn His Thr
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 29

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 29

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Asn Tyr
65 70 75 80

Thr Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 30

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 30

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile

100

105

<210> 31
 <211> 109
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 31

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
 35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 32
 <211> 109
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 32

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
 35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg

50

55

60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gly Thr Ser Leu Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 33

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 33

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

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
 20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
 35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
 50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Asn Ser Thr Gln
 85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105

<210> 34

<211> 109

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 34

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr

1		5		10		15									
Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser
			20					25					30		
Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln
		35					40					45			
Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg
	50					55					60				
Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr
65					70					75					80
Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Val	Asn	Leu	Thr
				85					90					95	
Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Cys	His	Cys	Ile			
			100					105							

<210> 35
 <211> 109
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая полипептидная последовательность

 <400> 35

Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His	Thr
1				5					10					15	
Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser
			20					25					30		
Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln
		35					40					45			
Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg
	50					55					60				
Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr
65					70					75					80
Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Leu	Gln
				85					90					95	
Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Asn	Lys	Thr	Cys	His	Cys	Ile			
			100					105							

<210> 36
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 36

Arg Gly Arg Arg
1

<210> 37
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 37

Arg Lys Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 38
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 38

Arg Lys Lys Arg
1

<210> 39
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 39

Arg Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 40
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 40

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 41

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 41

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 42

<211> 4

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 42

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 43

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 43

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 44

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 44

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 45

<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 45

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 46
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 46

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 47

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 48
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 48

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Glu Gly Arg
1 5 10

<210> 49
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 50

Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 51
<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (2) .. (3)
<223> аминокислота в этом положении может являться любой аминокислотой

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (4) .. (4)
<223> аминокислота в этом положении может являться любой гидрофобной аминокислотой

<400> 51

Pro Xaa Xaa Xaa
1

<210> 52
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (2) .. (3)
<223> аминокислота в этом положении может являться любой аминокислотой

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (4) .. (4)
<223> аминокислота в этом положении может являться любой гидрофобной аминокислотой

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (5) .. (5)
<223> аминокислота в этом положении может являться Ser или Thr

<400> 52

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 53
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (2) .. (2)
<223> аминокислота в этом положении может являться Leu или Gln

<400> 53

Pro Xaa Gly Met Thr Ser
1 5

<210> 54
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<220>
<221> ПРОЧЕЕ
<222> (2) .. (2)
<223> аминокислота в этом положении может являться Leu или Gln

<400> 54

Pro Xaa Gly Met Thr
1 5

<210> 55
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 55

Cys Gly Leu Val Pro Ala Gly Ser Gly Pro
1 5 10

<210> 56
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 56

Ser Leu Leu Lys Ser Arg Met Val Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 57
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 57

Ser Leu Leu Ile Ala Arg Arg Met Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 58

Ser Lys Leu Val Gln Ala Ser Ala Ser Gly Val Asn
1 5 10

<210> 59
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 59

Ser Ser Tyr Leu Lys Ala Ser Asp Ala Pro Asp Asn
1 5 10

<210> 60
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 60

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met Asn
1 5 10

<210> 61

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 61

Ser Leu Arg Pro Leu Ala Leu Trp Arg Ser Phe Asn
1 5 10

<210> 62

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 62

Ser Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 63

Asp Val Asp Glu Arg Asp Val Arg Gly Phe Ala Ser Phe Leu
1 5 10

<210> 64

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 64

Ser Leu Pro Leu Gly Leu Trp Ala Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 65
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 65

Ser Leu Leu Ile Phe Arg Ser Trp Ala Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 66
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 66

Ser Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr
1 5 10

<210> 67
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 67

Ser Leu Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Phe Asn
1 5 10

<210> 68
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 68

Lys Lys Ser Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Ser Val
1 5 10

<210> 69
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 69

Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly
1 5 10

<210> 70

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 70

His Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Val Met
1 5 10 15

Gly Arg Gly His Ala Arg Leu Val His Val Glu Glu Pro His Thr
20 25 30

<210> 71

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 71

Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val
1 5 10

<210> 72

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 72

Gly Gly Ser Gly Gln Arg Gly Arg Lys Ala Leu Glu
1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 73

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Phe Asn
1 5 10

<210> 74
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 74

Ser Leu Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Phe Asn
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 75

Ser Leu Leu Gly Ile Ala Val Pro Gly Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 76
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 76

Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro
1 5 10

<210> 77
<211> 734
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 77

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
180 185 190

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
195 200 205

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
210 215 220

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
225 230 235 240

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
245 250 255

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
275 280 285

Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
290 295 300

Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	305	310	315	320
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	325	330	335	
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	340	345	350	
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	355	360	365	
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	370	375	380	
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	385	390	395	400
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	405	410	415	
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	420	425	430	
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	435	440	445	
Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	450	455	460	
Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	465	470	475	480
Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	485	490	495	
Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	500	505	510	
Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	515	520	525	
Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	530	535	540	
Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	545	550	555	560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg
610 615 620

Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His
625 630 635 640

Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu
645 650 655

Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser
660 665 670

Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His
675 680 685

Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser
690 695 700

Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu
705 710 715 720

Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
725 730

<210> 78

<211> 731

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
 35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
 50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
 65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
 85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
 100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
 115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
 130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 180 185 190

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 195 200 205

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 210 215 220

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 225 230 235 240

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 245 250 255

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 260 265 270

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 275 280 285

Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	290	295	300
Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	305	310	315
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	325	330	335
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	340	345	350
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	355	360	365
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	370	375	380
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	385	390	395
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	405	410	415
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	420	425	430
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	435	440	445
Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	450	455	460
Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	465	470	475
Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	485	490	495
Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	500	505	510
Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	515	520	525
Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	530	535	540

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp
610 615 620

His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg
625 630 635 640

Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg
645 650 655

Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg
660 665 670

Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys
675 680 685

Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro
690 695 700

Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr
705 710 715 720

Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
725 730

<210> 79

<211> 741

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 79

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
180 185 190

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
195 200 205

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
210 215 220

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
225 230 235 240

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
245 250 255

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
260 265 270

Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
275 280 285

Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	290	295	300	
Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	305	310	315	320
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	325	330	335	
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	340	345	350	
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	355	360	365	
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	370	375	380	
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	385	390	395	400
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	405	410	415	
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	420	425	430	
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	435	440	445	
Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	450	455	460	
Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	465	470	475	480
Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	485	490	495	
Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	500	505	510	
Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu	Thr	515	520	525	
Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln	530	535	540	

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
625 630 635 640

Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
645 650 655

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
660 665 670

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
675 680 685

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
690 695 700

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
705 710 715 720

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
725 730 735

Asp Cys His Cys Ile
740

<210> 80

<211> 738

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 80

Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	1	5	10	15
Leu	Arg	Gly	Ala	Arg	Cys	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	20	25	30	
Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	35	40	45	
Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	50	55	60	
Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	65	70	75	80
Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	85	90	95	
Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	100	105	110	
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	115	120	125	
Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	130	135	140	
Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	145	150	155	160
Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	165	170	175	
Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	180	185	190	
Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	195	200	205	
Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	210	215	220	
Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	225	230	235	240
Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	245	250	255	

Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	260	265	270
Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	275	280	285
Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	290	295	300
Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	305	310	315
Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	325	330	335
Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	340	345	350
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	355	360	365
Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys	Ala	370	375	380
Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys	385	390	395
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	405	410	415
Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	420	425	430
Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	435	440	445
Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	450	455	460
Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	465	470	475
Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	485	490	495
Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro	Cys	Phe	Ser	Ala	500	505	510

Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
515 520 525

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
530 535 540

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys
625 630 635 640

Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
645 650 655

Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
660 665 670

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
675 680 685

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
690 695 700

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
705 710 715 720

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
725 730 735

Cys Ile

<210> 81

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 81

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 82

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 82

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Asn Leu Thr Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 83

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 83

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 84
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 84

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 85
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 85

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Asn Gln Thr Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 86

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 86

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Asn Phe Thr Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 87

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 87

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 88

<211> 134

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 88

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 89
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 89

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 90

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 90

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Asn His Thr Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 91

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 91

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Asn Tyr Thr Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 92

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 92

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 93
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 93

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 94

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 94

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Asn Gly Thr Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 95
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 95

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Asn Ser Thr Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 96
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 96

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 97

<211> 134

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 97

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn
115 120 125

Lys Thr Cys His Cys Ile
130

<210> 98
<211> 70
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полинуклеотидная последовательность

<400> 98
caccatggac atgaggggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctactct ggctccgagg 60
tgccagatgt 70

<210> 99
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полинуклеотидная последовательность

<400> 99
cctcgagcgg ccgctagctc atatgcagtg gcagtcctttg gctaaca 48

<210> 100
<211> 131
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 100

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg
20 25 30

Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp
35 40 45

Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile
50 55 60

Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile
65 70 75 80

Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys
85 90 95

Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr
100 105 110

Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys
115 120 125

His Cys Ile
130

<210> 101
<211> 22
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полипептидная последовательность

<400> 101

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
20

<210> 102
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая полинуклеотидная последовательность

<400> 102
ctccgaggtg ccagatgtgc gcgcaacggg gaccactgtc cgctcggg

48

<210> 103
<211> 577
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 103

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	35	40	45	
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	50	55	60	
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	65	70	75	80
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	85	90	95	
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	100	105	110	
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	115	120	125	
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	130	135	140	
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	145	150	155	160
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	165	170	175	
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	180	185	190	
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	195	200	205	
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	210	215	220	
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	225	230	235	240
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	245	250	255	
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	260	265	270	
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	275	280	285	

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

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

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala

<210> 104
<211> 584
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 104

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

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

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

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
580

<210> 105
<211> 586
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 105

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	50	55	60
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	65	70	75
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	85	90	95
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	100	105	110
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	115	120	125
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	130	135	140
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	145	150	155
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	165	170	175
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	180	185	190
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	195	200	205
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	210	215	220
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	225	230	235
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	245	250	255
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	260	265	270
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	275	280	285
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	290	295	300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

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

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
580 585

<210> 106
<211> 602
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 106

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

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

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg
595 600

<210> 107
<211> 603
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 107

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	50	55	60
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	65	70	75
Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	85	90	95
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	100	105	110
Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	115	120	125
Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	130	135	140
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	145	150	155
Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	165	170	175
Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	180	185	190
Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	195	200	205
Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	210	215	220
Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	225	230	235
Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	245	250	255
Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	260	265	270
Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	275	280	285
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	290	295	300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
355 360 365

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

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

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Asn
595 600

<210> 108
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 108
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggac tcactgtccg ctcgggccccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtcaacg cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgtc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 109
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 109
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccaactgtccg ctcgggccccg ggcgttgctg caatctgacc 120
acgggtccgc cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgtc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 110
<211> 405

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 110
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgaacctgac ggacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgtctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 111
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 111
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgtcgaaatga aaccctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgtctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 112
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 112
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgaaccaga cccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga cgcacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 113
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 113
atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctc gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgctgctgga agacctgggc tgggcccatt ggtgtgtgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgctc ccgagcaact tcacggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga cgcacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 114
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 114
atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctc gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgctgctgga agacctgggc tgggcccatt ggtgtgtgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgctc ccgagccaga accggacggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga cgcacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 115
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 115
atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgctg	gcaacgggga	ccactgtccg	ctcggggccc	ggcggttgctg	ccgtctgcac	120
acgggtccgcg	cgtcgctgga	agacctgggc	tggggccgatt	gggtgctgtc	gccacgggag	180
gtgcaagtga	ccatgtgcat	cggcgcgtgc	ccgagccagt	tcaacgagac	gaacatgcac	240
gcgagatca	agacgagcct	gcaccgcctg	aagcccgaca	cggtgccagc	gccctgctgc	300
gtgcccgcga	gctacaatcc	catggtgtc	attcaaaaga	ccgacaccgg	ggtgtcgctc	360
cagacctatg	atgacttggt	agccaaagac	tgccactgca	tatga		405

<210> 116
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggtcctctgc	tactctggct	ccgaggtgcc	60
agatgtgctg	gcaacgggga	ccactgtccg	ctcggggccc	ggcggttgctg	ccgtctgcac	120
acgggtccgcg	cgtcgctgga	agacctgggc	tggggccgatt	gggtgctgtc	gccacgggag	180
gtgcaagtga	ccatgtgcat	cggcgcgtgc	ccgagccagt	tccggggcggc	aaacatgcac	240
gcgagatca	agacgaacct	gacgcgcctg	aagcccgaca	cggtgccagc	gccctgctgc	300
gtgcccgcga	gctacaatcc	catggtgtc	attcaaaaga	ccgacaccgg	ggtgtcgctc	360
cagacctatg	atgacttggt	agccaaagac	tgccactgca	tatga		405

<210> 117
 <211> 402
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggtcctctgc	tactctggct	ccgaggtgcc	60
agatgtgctg	gcaacgggga	ccactgtccg	ctcggggccc	ggcggttgctg	ccgtctgcac	120
acgggtccgcg	cgtcgctgga	agacctgggc	tggggccgatt	gggtgctgtc	gccacgggag	180
gtgcaagtga	ccatgtgcat	cggcgcgtgc	ccgagccagt	tccggggcggc	aaacatgcac	240
gcgagatca	agacgagcaa	ccacaccctg	aagcccgaca	cggtgccagc	gccctgctgc	300
gtgcccgcga	gctacaatcc	catggtgtc	attcaaaaga	ccgacaccgg	ggtgtcgctc	360
cagacctatg	atgacttggt	agccaaagac	tgccactgca	ta		402

<210> 118
 <211> 405

<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 118
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga actacactcc catggtgtctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 119
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 119
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgtctc attcaaaaca ccaccaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 120
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 120
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300

gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccaacaccac ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 121
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 121
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctc gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggtgtgtgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgctc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaacgg gacgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 122
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 122
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctc gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tggggccgatt ggtgtgtgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgctc ccgagccagt tccggggcggc aaacatgcac 240
gcgagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg gaactcgacc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 123
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 123
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgctg	gcaacgggga	ccactgtccg	ctcggggccc	ggcgttgctg	ccgtctgcac	120
acgggtccgc	cgtcgctgga	agacctgggc	tggggccgatt	gggtgctgtc	gccacgggag	180
gtgcaagtga	ccatgtgcat	cggcgcgtgc	ccgagccagt	tccggggcggc	aaacatgcac	240
gcgagatca	agacgagcct	gcaccgcctg	aagcccagaca	cggtgccagc	gccctgctgc	300
gtgcccgcga	gctacaatcc	catggtgctc	attcaaaaga	ccgacaccgg	ggtgaacctc	360
acgacctatg	atgacttggt	agccaaagac	tgccactgca	tatga		405

<210> 124
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggtcctctg	tactctggct	ccgaggtgcc	60
agatgtgctg	gcaacgggga	ccactgtccg	ctcggggccc	ggcgttgctg	ccgtctgcac	120
acgggtccgc	cgtcgctgga	agacctgggc	tggggccgatt	gggtgctgtc	gccacgggag	180
gtgcaagtga	ccatgtgcat	cggcgcgtgc	ccgagccagt	tccggggcggc	aaacatgcac	240
gcgagatca	agacgagcct	gcaccgcctg	aagcccagaca	cggtgccagc	gccctgctgc	300
gtgcccgcga	gctacaatcc	catggtgctc	attcaaaaga	ccgacaccgg	ggtgtcgctc	360
cagacctatg	atgacttggt	aaacaaaacc	tgccactgca	tatga		405

<210> 125
 <211> 396
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

atggacatga	gggtccccgc	tcagctcctg	gggtcctctg	tactctggct	ccgaggtgcc	60
agatgtgggg	accactgtcc	gctcggggcc	gggcgttgct	gccgtctgca	cacgggtccgc	120
gctcgtctgg	aagacctggg	ctggggccgat	tgggtgctgt	cgccacggga	ggtgcaagtg	180
accatgtgca	tcggcgctg	cccagaccag	ttccggggcg	caaacatgca	cgcgagatc	240
aagacgagcc	tgaccgcct	gaagcccag	acggtgccag	cgccctgctg	cgtgcccggc	300
agctacaatc	ccatggtgct	cattcaaaac	accaccaccg	gggtgtcgct	ccagacctat	360
gatgacttgt	tagccaaaga	ctgccactgc	atatga			396

<210> 126
 <211> 134

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 126

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

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

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 127
<211> 405
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 127

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc	60
agatgtgctg gcaacgggga ccaactgtccg ctcgggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac	120
acgggtccgcg cgtcgctgga agacctgggc tgggccgatt gggtgctgtc gccacgggag	180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgtc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac	240
gcgagatca agacgagcct gcaccgctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc	300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgtc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc	360

cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga

405

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий непрерывную аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1,

5 причем указанный полипептид содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1:

- i) D5T/S и R21N;
- ii) R16N и H18T/S;
- iii) S23N и E25T/S;
- 10 iv) S50N и F52T/S или F52N и A54T/S;
- v) R53N и A55T/S;
- vi) S64N и H66T/S;
- vii) K91N и D93T/S или D93N и G95T/S;
- viii) T94N и V96T/S или V96N и L98T/S;
- 15 ix) S97N и Q99T/S; и
- x) A106N и D108T/S

2. Полипептид по п. 1, содержащий по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1:

- 20 D5T и R21N;
- S23N и E25T или S23N и E25S;
- R53N и A55T или R53N и A55S;
- S64N и H66T или S64N и H66S;
- K91N и D93T или K91N и D93S;
- 25 D93N и G95T или D93N и G95S;
- S97N и Q99T или S97N и Q99S; и
- A106N и D108T или A106N и D108S.

3. Полипептид по п. 1, содержащий по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1:

- 30 D5T и R21N;
- S64N и H66T;
- K91N и D93T;
- D93N и G95T; и
- 35 S97N и Q99T.

4. Полипептид по п. 1, содержащий по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в последовательности SEQ ID NO: 1:

K91N и D93T/S; и

5 D93N и G95T/S.

5. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

10

6. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота полипептида соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

15

7. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первых трех аминокислот, соответствующих первым трем аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

20

8. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первых шести аминокислот, соответствующих первым шести аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO: 1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 SEQ ID NO: 1.

25

9. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первых четырнадцати аминокислот, соответствующих первым четырнадцати аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO: 1.

30

10. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, содержащий сигнальную последовательность на N-конце.

35

11. Полипептид по п. 10, отличающийся тем, что сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность IgK.
- 5 12. Полипептид по п. 10 или 11, отличающийся тем, что сигнальная последовательность конъюгирована с полипептидом посредством линкера.
13. Полипептид по п. 12, отличающийся тем, что линкер является отщепляемым линкером.
- 10 14. Полипептид по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанный полипептид объединен с гетерологичным полипептидом.
- 15 15. Полипептид по п. 14, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид является сывороточным альбумином, белком, связывающим мальтозу, или иммуноглобулиновым Fc-полипептидом.
- 20 16. Полипептид по п. 15, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид является сывороточным альбумином, и указанный сывороточный альбумин является человеческим сывороточным альбумином, сывороточным альбумином яванского макака или бычьим сывороточным альбумином.
- 25 17. Полипептид по п. 15, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид является иммуноглобулиновым Fc-полипептидом.
18. Полипептид по любому из пп. 14-17, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид конъюгирован с N-концом указанного полипептида.
- 30 19. Полипептид по любому из пп. 14-17, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид конъюгирован с C-концом указанного полипептида.
20. Гибридный белок, содержащий непрерывную последовательность от N-конца к C-концу:
гетерологичный полипептид-[(G₄S)]₅-GDF15;
35 гетерологичный полипептид-[(G₄S)]₅-ΔN3-GDF15; или

гетерологичный полипептид-[(G₄S)]₅-ΔN6-GDF15.

21. Гибридный белок по п. 20, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид является сывороточным альбумином, белком, связывающим мальтозу, или иммуноглобулиновым Fc-полипептидом.
22. Гибридный белок по п. 21, отличающийся тем, что гетерологичный полипептид является сывороточным альбумином, и указанный сывороточный альбумин является человеческим сывороточным альбумином, сывороточным альбумином яванского макака или бычьим сывороточным альбумином.
23. Гибридный белок по любому из пп. 20-22, содержащий сигнальную последовательность на N-конце.
24. Гибридный белок по п. 23, отличающийся тем, что сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность IgK.
25. Модифицированный N-гликозилированный димер GDF15, причем указанный димер содержит два полипептида по п. 1, ковалентно присоединенные к друг другу, причем указанный димер является N-гликозилированным.
26. Модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 по п. 25, отличающийся тем, что указанные два полипептида содержат аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 30 или аминокислотной последовательности, отличающейся от них не более чем на 5 аминокислот; причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным.
27. Модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 по п. 26, отличающийся тем, что каждый из указанных двух полипептидов состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 100.

28. Модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 по любому из пп. 25-27, являющийся гомодимером, содержащим два полипептида, каждый из которых содержит одинаковую аминокислотную последовательность, причем указанные полипептиды содержат по меньшей мере один сайт N-гликозилирования, являющийся N-гликозилированным.
29. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-19, гибридный белок по любому из пп. 20-24 или модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 по любому из пп. 25-28.
30. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 29, отличающаяся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с элементом, контролирующим экспрессию, обеспечивающим экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или гибридный белок, *in vitro* или *in vivo*.
31. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 29 или п. 30.
32. Вектор по п. 31, отличающийся тем, что указанный вектор включает вирусный вектор.
33. Клетка-хозяин, экспрессирующая полипептид по любому из пп. 1-19, гибридный белок по любому из пп. 20-24 или модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 по любому из пп. 25-28.
34. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 29-30 или вектор по любому из пп. 31-32.
35. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-19, гибридный белок по любому из пп. 20-24 или модифицированный N-гликозилированный димер GDF15 по любому из пп. 25-28, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.
36. Фармацевтическая композиция по п. 35, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный профилактический или терапевтический агент.

37. Антитело, специфически связывающееся с полипептидом по любому из пп. 1-19 или гибридным белком по любому из пп. 20-24 или модифицированным N-гликозилированным димером GDF15 по любому из пп. 25-28.
- 5 38. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п. 37 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.
39. Фармацевтическая композиция по п. 38, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный профилактический или терапевтический агент.
- 10 40. Стерильный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 35, 36, 38 или 39.
41. Стерильный контейнер по п. 40, отличающийся тем, что указанный стерильный
15 контейнер представляет собой шприц.
42. Набор, содержащий стерильный контейнер по любому из пп. 40-41.
43. Способ получения полипептида по любому из пп. 1-19, гибридного белка по
20 любому из пп. 20-24 или модифицированного N-гликозилированного димера GDF15 по любому из пп. 25-28, причем указанный способ включает:
- культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей полипептид или гибридный белок; и
- очистку экспрессированного полипептида или гибридного белка.
- 25 44. Способ лечения или предотвращения расстройства массы тела у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту полипептида по любому из пп. 1-19, гибридного белка по любому из пп. 20-24 или модифицированного N-гликозилированного димера GDF15 по любому из пп. 25-28, причем указанный полипептид или гибридный
30 белок вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта.
45. Способ лечения или предотвращения расстройства метаболизма глюкозы у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту полипептида по любому
35 из пп. 1-19, гибридного белка по любому из пп. 20-24 или модифицированного N-

гликозилированного димера GDF15 по любому из пп. 25-28, причем указанный полипептид или гибридный белок вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики расстройства метаболизма глюкозы у субъекта.

5 46. Способ по любому из пп. 44-45, отличающийся тем, что указанный способ включает снижение потребления пищи у субъекта.

47. Способ по любому из пп. 44-45, отличающийся тем, что указанный способ включает снижение массы тела у субъекта.

10 48. Способ по любому из пп. 44-45, отличающийся тем, что лечение или предотвращение включает снижение массы тела у субъекта.

15 49. Способ по любому из пп. 44-45, отличающийся тем, что лечение или предотвращение включает снижение потребления пищи у субъекта.

50. Способ по любому из пп. 44-45, отличающийся тем, что лечение или предотвращение включает снижение уровня глюкозы в крови у субъекта.

20 51. Способ по п. 45, отличающийся тем, что расстройство метаболизма глюкозы является сахарным диабетом.

52. Способ по любому из пп. 44-51, отличающийся тем, что субъект является человеком.

25 53. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что субъект страдает ожирением.

30 54. Способ по любому из пп. 44-53, отличающийся тем, что введение осуществляют посредством парентеральной инъекции.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что парентеральная инъекция является подкожной.

Фигура 1

Мутанты по гликозилированию (номера 1-17; SEQ ID NO: 2 -18), выровненные с GDF15 дикого типа (SEQ ID NO: 1)

	1	10	20	30	40	50	
ДТ	ARNGDHCPLGPGGCCRLHTV	ASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
1	ARNGTHCPLGPGGCCRLHTV	NASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
2	ARNGDHCPLGPGGCCNLTT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
3	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VRANLTDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
4	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASNETLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
5	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPNQTRAANMHAQ	60			
6	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSNFTAANMHAQ	60			
7	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQNRTANMHAQ	60			
8	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFNATNMHAQ	60			
9	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
10	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
11	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
12	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
13	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
14	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
15	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
16	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
17	ARNGDHCPLGPGGCCRLHT	VASLEDLGWADWVLSPREVQVT	MCIGACPSQFRAANMHAQ	60			
	61	70	80	90	100	110	
ДТ	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:1)			
1	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:2)			
2	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:3)			
3	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:4)			
4	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:5)			
5	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:6)			
6	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:7)			
7	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:8)			
8	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:9)			
9	IKTNLTRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:10)			
10	IKTSNHTLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:11)			
11	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PANYTPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:12)			
12	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQNTTT	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:13)			
13	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKNTT	TVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:14)			
14	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	NGTSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:15)			
15	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGNSTQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:16)			
16	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVNLTQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:17)			
17	IKTSLHRLKPDTPAPCCVP	PASYNPMVLIQKTD	TGVSLQTYDDLAKDCHCI	(SEQ ID NO:18)			

Фигура 2

Мутанты $\Delta N3$ по гликозилированию (номера 18-34; SEQ ID NO: 19 -35), выровненные с GDF15 дикого типа (SEQ ID NO: 1)

	1	10	20	30	40	50	
ДТ	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
18	GTHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
19	GDHCPLGPGRCRLHTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
20	GDHCPLGPGRCRLHTVRLNLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
21	GDHCPLGPGRCRLHTVNASNETLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
22	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPNQFRAANMHAQ						60
23	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSNFTAANMHAQ						60
24	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRATANMHAQ						60
25	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHAQ						60
26	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
27	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
28	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
29	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
30	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
31	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
32	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
33	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
34	GDHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ						60
	61	70	80	90	100	110	
ДТ	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:1)
18	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:19)
19	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:20)
20	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:21)
21	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:22)
22	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:23)
23	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:24)
24	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:25)
25	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:26)
26	IKTNLTRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:27)
27	IKTSNHTLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:28)
28	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPANYTPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:29)
29	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:30)
30	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKNTTTVSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:31)
31	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:32)
32	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGNTSTQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:33)
33	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGNLTQTYDDLLAKDCHCI						(SEQ ID NO:34)
34	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLNKTCHCI						(SEQ ID NO:35)

Фигура 3

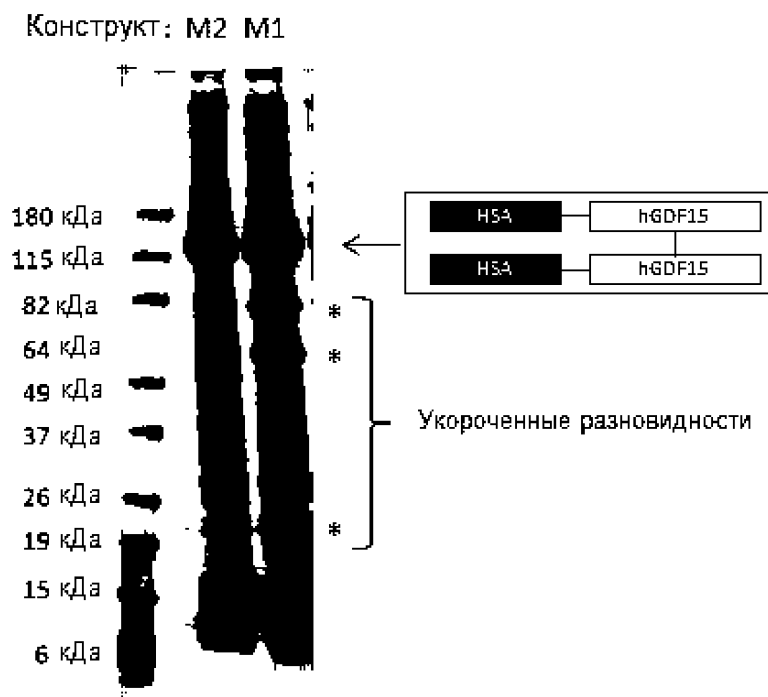
Гибридный белок M1: Сигнальная последовательность IgK (нижний регистр), объединенная с аминокислотной последовательностью ЧСА, объединенной с линкером [(Gly₄-Ser)]₃ (подчеркнутый шрифт) на N-конце зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт) (SEQ ID NO: 77)

mdmrvpqllgllllwlr garcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN
CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAE
FAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV
ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC E
LFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC
KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGS **ARNGDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT**
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

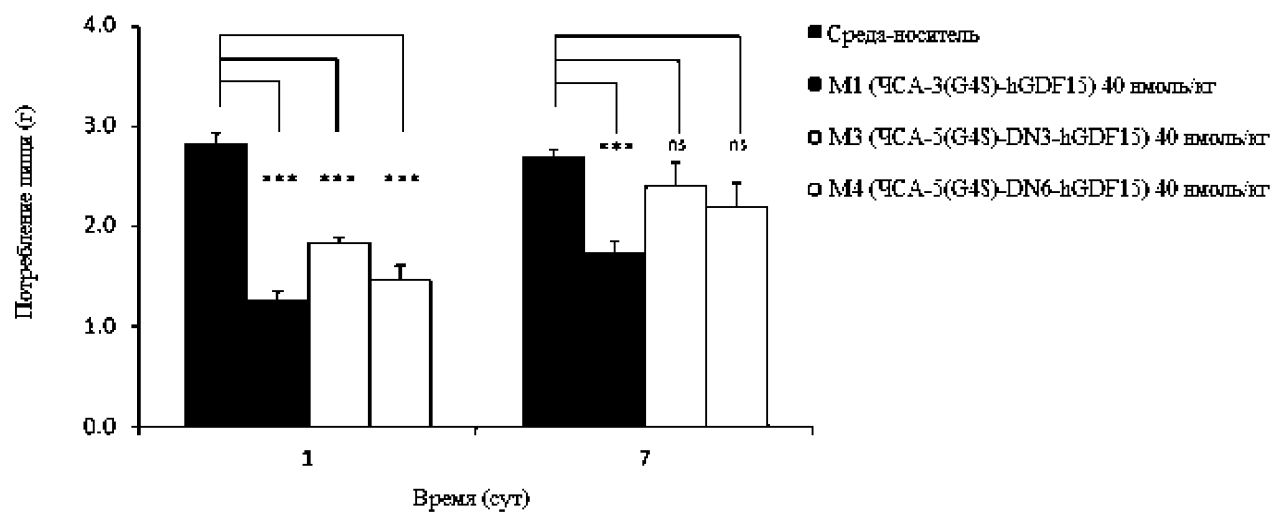
Гибридный белок M2: Сигнальная последовательность IgK (нижний регистр), объединенная с аминокислотной последовательностью ЧСА, объединенной с линкером [(Gly₄-Ser)]₃ (подчеркнутый шрифт) на N-конце зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт), содержащего делецию 3 аминокислот (ΔARN) (SEQ ID NO: 78)

mdmrvpqllgllllwlr garcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN
CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IAR
RHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAE
FAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV
ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC E
LFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC
CTESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC
KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGS **GDHCP LGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI**
GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

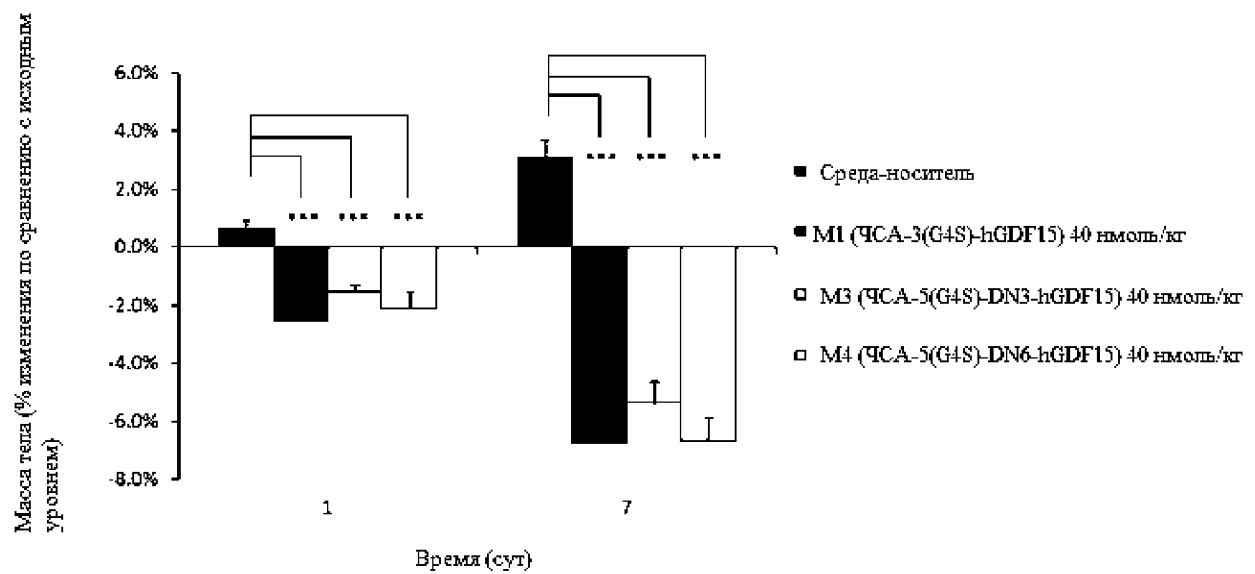
Фигура 4



Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8А

Гликозилированные мутеины hGDF15, содержащие сигнальную последовательность IgK (нижний регистр), присоединенную к N-концу аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт)

M5 - (SEQ ID NO: 81)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M6 - (SEQ ID NO: 82)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCNLTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M7 - (SEQ ID NO: 83)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M8 - (SEQ ID NO: 84)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASNETLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M9 - (SEQ ID NO: 85)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PNQTRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M10 - (SEQ ID NO: 86)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSNFT**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M11 - (SEQ ID NO: 87)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNR**
TANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M12 - (SEQ ID NO: 88)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFN**
ATNMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M13 - (SEQ ID NO: 89)

mdmrvpagllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTNLTRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Фигура 8А (продолжение)

M14 - (SEQ ID NO: 90)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSNHTLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

M15 - (SEQ ID NO: 91)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPANYTPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI

M16 - (SEQ ID NO: 92)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQN TTTGVS LQTYDDLLAKDCHCI

M17 - (SEQ ID NO: 93)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTNT TVSLQTYDDLLAKDCHCI

M18 - (SEQ ID NO: 94)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDDLLAKDCHCI

M19 - (SEQ ID NO: 95)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGNSTQTYDDLLAKDCHCI

M20 - (SEQ ID NO: 96)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVNLT TYDDLLAKDCHCI

M21 - (SEQ ID NO: 97)

mdmrvpagllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLNKTCHCI

Фигура 8В

Нуклеотидные последовательности, кодирующие гликозилированные мутеины hGDF15, содержащие сигнальную последовательность IgK, присоединенную к N-концу аминокислотной последовательности зрелого GDF15 человека (как показано на фигуре 8А).

Нуклеотидные последовательности, кодирующие М5

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGACTCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCAACGCGTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 108)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие М6

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCAATCTGACCACGGTCCGCGCGTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 109)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие М7

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGAACCTG
ACGGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 110)

Фигура 8В (продолжение)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M8

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGAAT
GAAACCCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 111)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M9

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAACCAGACCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 112)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M10

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCAACTTCACGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 113)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M11

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGAACCGGACGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 114)

Фигура 8В (продолжение)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M12

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCAACGCGACGAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 115)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M13

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAACCTGACGCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 116)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M14

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCAACCACACCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA (SEQ ID NO:
117)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M15

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAACTACACTCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 118)

Фигура 8В (продолжение)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M16

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAACACCACC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 119)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M17

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCAAC
ACCACGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 120)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M18

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
AACGGGACGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 121)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M19

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGAACCTGACCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 122)

Фигура 8В (продолжение)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M20

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGAACCTCACGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 123)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие M21

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCTGCTGGAAGAC
CTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTCTGCCGAGCCAG
TTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCC
TGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTAT
GATGACTTGTTAAACAAAACCTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 124)

Фигура 8С

Аминокислотная последовательность ΔN3-M16 (сигнальная последовательность IgK (нижний регистр), присоединенная к N-концу зрелого GDF15 человека (полужирный шрифт)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN**
MHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 100)

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ΔN3-M16

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctggctccgaggtgccagatgtGGG
GACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTTCGCTGGAAGACCTG
GGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGC
CAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTG
CCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAACACCACCACCGGGGTG
TCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 125)

Фигура 8D

Аминокислотная последовательность зрелого GDF15 человека дикого типа, присоединенная по N-концу к сигнальной последовательности IgK (IgK-дт-GDF15)

mdmrvpqllgllllwlr~~garc~~**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR**
AANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 126)

Нуклеиновая кислота, кодирующая IgK-дт-GDF15

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctggctccgaggtgccagatgtGCG
CGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTTCGCTG
GAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCG
TGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCC
GACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGAC
ACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 127)

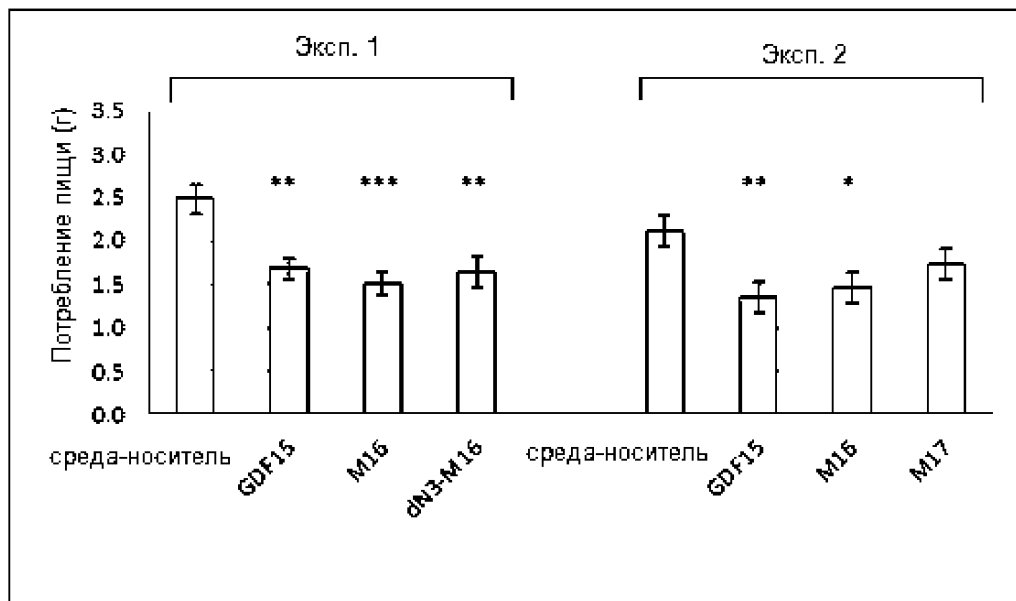
Фигура 9

Оценка образования димеров мутеинов GDF15 человека, занятости сайта N-гликаном и растворимости

<u>Идентификатор</u>			<u>Пороговое значение</u>
<u>мутеина</u>	<u>Димер</u>	<u>N-гликан</u>	<u>растворимости</u>
hGDF15	ДА	-	++
M5	ДА	ДА	++++
M6	ДА	ДА	Не выполняли
M7	ДА	ДА	+++
M8	НЕТ	НЕТ	Не выполняли
M9	ДА	ДА	Не выполняли
M10	НЕТ	НЕТ	Не выполняли
M11	ДА	ДА	+++
M12	ДА	ДА	+++
M13	ДА	ДА	++++
M14	НЕТ	НЕТ	Не выполняли
M15	НЕТ	НЕТ	Не выполняли
M16	ДА	ДА	+++++
Δ N3-M16	ДА	ДА	+++++
M17	ДА	ДА	+++++
M18	ДА	ДА	Не выполняли
M19	ДА	ДА	Не выполняли
M20	ДА	ДА	++++
M21	ДА	ДА	+++

Фигура 10

Модель DIO мышей



Фигура 11

