

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201790405 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.09.29(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2015.10.29

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

(31) 62/073,737; 62/244,604

(32) 2014.10.31; 2015.10.21

(33) US

(86) PCT/US2015/058111

(87) WO 2016/069921 2016.05.06

(71) Заявитель:

НДЖМ БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

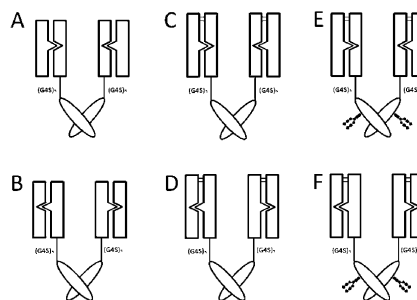
Шен Уэньян, Линдхаут Даррин,
Халданкар Радж, Матерн Хуго (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Черкас Д.А.,
Путинцев А.И., Игнатьев А.В. (RU)

(57) Описан комплекс, содержащий GDF15 полипептид. Предложены способы лечения индивидов с расстройством метаболизма, таким как расстройство метаболизма глюкозы и/или расстройство массы тела и композиции, связанные с ними.

Конструкции нагнута-во-впадину молекул (Fc/Fc)-GDF15



201790405

A1

A1

201790405

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0001] В настоящей заявке представлен список последовательностей в виде текстового файла размером 188 кб “NGMB-142_SeqList.txt”, созданного 28 октября 2015 года. Содержание указанного текстового файла полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] В данной заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США с серийным номером 62/073737, поданной 31 октября 2014 года, и предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/244604, поданной 21 октября 2015 года, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Данное изобретение относится, в том числе, к полипептидному комплексу и его композициям, которые можно применять для лечения состояний, связанных с метаболизмом.

ВВЕДЕНИЕ

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

[0005] Современные методы медикаментозного лечения включают подаватели аппетита, которые ориентированны на классы рецепторов (например, CB1, 5-HT_{2c}, и NPY); регуляторы цепей аппетита в гипоталамусе и молекулярного действия грелина; и ингибиторы поглощения питательных веществ, направленные на липазу. К сожалению, ни один из

существующих 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 значительного и возрастающего процента человеческой популяции.

[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 V.W., et al., PLoS One 2013; 8 (2): e55174; US 8,192,735).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Представлены модифицированные GDF15 полипептиды для лечения метаболических расстройств. Модифицированные GDF15 полипептиды могут быть представлены в комплексе. Комплекс данного описания может содержать два GDF15 полипептида.

[0011] В некоторых случаях, комплекс по данному изобретению содержит первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит СН3 последовательность, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-

последовательность IgG содержит СНЗ последовательность, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину, причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, при этом либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования.

[0012] В некоторых случаях, комплекс по данному изобретению содержит первый гетеродимер и второй гетеродимер, каждый из первого и второго гетеродимеров, содержат первый полипептид и второй полипептид, первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, и причем либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования и, причем мутеин GDF15 в первом гетеродимере димеризуется с мутеином GDF15 во втором гетеродимере, тем самым формируя комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер.

[0013] В иллюстративных вариантах реализации изобретения, С-конец первого полипептида может быть конъюгирован с N-концом мутеина GDF15. В других случаях, С-конец второго полипептида может быть конъюгирован с N-концом мутеина GDF15.

[0014] Также в данном документе рассмотрен первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание, причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом, содержащем Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; и мутеин GDF15, содержащий по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, причем С-конец первого полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15. Первый полипептид может быть представлен в комплексе, который может также содержать второй полипептид.

[0015] Также в данном документе описан первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину, причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом, содержащим Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит СНЗ последовательность, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и мутеин GDF15, содержащий по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, причем С-конец первого полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15. Первый полипептид может быть представлен в комплексе, который может также содержать второй полипептид.

[0016] В определенных случаях, мутеин GDF15 в комплексе может содержать непрерывную аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности дикого типа GDF15 (SEQ ID NO:1). Например, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в SEQ ID NO:1, которая создает консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, например, замена может быть D5T или D5S. В других случаях, замена может быть R21N.

[0017] В иллюстративных случаях, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1, которая создает консенсусный сайт N-связанного гликозилирования: R16N и H18T/S; S23N и E25T/S; L24N и D26T/S; S50N и F52T/S; F52N и A54T/S; Q51N и R53T/S; R53N и A55T/S; S64N и H66T/S; L65N и R67T/S; S82N и N84T/S; K91N и D93T/S; D93N и G95T/S; T94N и V96T/S; V96N и L98T/S; S97N и Q99T/S; и A106N и D108T/S.

[0018] В иллюстративных случаях, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1, которая создает консенсусный сайт N-связанного гликозилирования: R16N и H18T; S23N и E25T; L24N и D26T; S50N и F52T; F52N и A54T; Q51N и R53T; R53N и A55T; S64N и H66T; L65N и R67T; S82N и N84T; K91N и D93T; D93N и G95T; T94N и V96T; V96N и L98T; S97N и Q99T; и A106N и D108T.

[0019] В некоторых случаях, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1, которая создает консенсусный сайт N-связанного гликозилирования: R16N и H18S; S23N и E25S; L24N и D26S; S50N и F52S; F52N и A54S; Q51N и R53S; R53N и A55S; S64N и H66S; L65N и R67S;

S82N и N84S; K91N и D93S; D93N и G95S; T94N и V96S; V96N и L98S; S97N и Q99S; и A106N и D108S.

[0020] В некоторых вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1: 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.

[0021] В некоторых вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1: S23N и E25T; R53N и A55T; S64N и H66T; K91N и D93T; D93N и G95T; S97N и Q99T; и A106N и D108S.

[0022] В некоторых вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1: S23N и E25S; R53N и A55S; S64N и H66S; K91N и D93S; D93N и G95S; S97N и Q99S; и A106N и D108S.

[0023] В некоторых вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1: S64N и H66T/S; K91N и D93T/S; D93N и G95T/S; и S97N и Q99T/S. Например, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1: S64N и H66T; K91N и D93T; D93N и G95T; и S97N и Q99T; или S64N и H66S; K91N и D93S; D93N и G95S; и S97N и Q99S.

[0024] В других вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 может содержать по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1: K91N и D93T или D93S; и D93N и G95T или G95S.

[0025] В других вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 в комплексе может содержать непрерывную аминокислотную последовательность, которая может быть длиной по меньшей мере 98 аминокислот и может быть по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, где С-концевая аминокислота мутеина GDF15 соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0026] В других вариантах реализации изобретения, непрерывная аминокислотная последовательность может быть длиной по меньшей мере 98 аминокислот и может быть по меньшей мере на 95 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, где С-

концевая аминокислота мутеина GDF15 соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0027] Иллюстративный мутеин GDF15 представлен в комплексе, описанном в данном документе, содержит непрерывную аминокислотную последовательность, длина которой составляет по меньшей мере 98 аминокислот, по меньшей мере на 90 % идентичную 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. Укорочение по N-концу может быть 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, 2-14 аминокислот, 3-14 аминокислот, 2-3 аминокислот, 3-5 аминокислот или 4-6 аминокислот.

[0028] Иллюстративные комплексы, описанные в данном документе, содержат мутеин GDF15, который содержит непрерывную аминокислотную последовательность по меньшей мере 98 аминокислот длиной и по меньшей мере на 95 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота полипептида соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0029] В некоторых случаях, длина непрерывной аминокислотной последовательности у мутеина GDF15 составляет по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первую аминокислоту, которая соответствует первой аминокислоте, присутствующей на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0030] В некоторых случаях, длина непрерывной аминокислотной последовательности у мутеина GDF15 составляет по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые две аминокислоты, которые соответствуют первым двум аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0031] В некоторых случаях, длина непрерывной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые три аминокислоты, которые соответствуют первым трем аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0032] В некоторых случаях, длина непрерывной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые шесть аминокислот, которые соответствуют первым шести аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1, причем C-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

[0033] В некоторых случаях, длина непрерывной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые четырнадцать аминокислот, которые соответствуют первым четырнадцати аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1.

[0034] В некоторых случаях, C-конец либо первого полипептида (например, Fc-выступ), либо второго полипептида (например, Fc-впадина) конъюгирован с N-концом мутеина GDF15 через линкер. Иллюстративные линкеры содержат последовательность $(G_4S)_n$, при этом $n=1-10$, например, 1-5 или 2-5, для примеров 2, 3, 4, или 5.

[0035] В определенных случаях, Fc IgG содержит непрерывную аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 (Fc-последовательность человеческого IgG1). Сконструированное выпячивание может включать в себя по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в Fc-последовательности человеческого IgG1, причем замена происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 347, 366 и 394, в соответствии с нумерацией ЕС. Например, по меньшей мере одна замена является выбранной из группы, состоящей из Q347W/Y, T366W/Y и T394W/Y в соответствии с нумерацией ЕС.

[0036] В определенных случаях, сконструированная впадина содержит по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в Fc-последовательности человеческого IgG1, причем замена происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 366, 368, 394, 405 и 407, в соответствии с нумерацией ЕС. Например, по меньшей мере одна замена является выбранной из группы, состоящей из T366S, L368A, T394S, F405T/V/A и Y407T/V/A в соответствии с нумерацией ЕС.

[0037] В определенных случаях, выпячивание может содержать замену T366W/Y и впадина может содержать замены T366S, L368A и Y407T/V/A, в соответствии с нумерацией ЕС.

[0038] Например, выпячивание может содержать замену T366W/Y и впадина может содержать замену Y407T/V/A в соответствии с нумерацией ЕС. В других случаях, выпячивание может содержать замену T366Y и впадина может содержать замену Y407T в соответствии с нумерацией ЕС. В других примерах, выпячивание может содержать замену T366W и впадина может содержать замену Y407A в соответствии с нумерацией ЕС. В дальнейших примерах, выпячивание может содержать замену T394Y и впадина может содержать замену Y407T в соответствии с нумерацией ЕС.

[0039] В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-последовательности IgG первого и второго полипептидов могут каждый содержать шарнирный участок, который формирует по меньшей мере одну дисульфидную связь между первым и вторым полипептидами. В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-последовательности IgG первого и второго полипептидов могут каждый содержать шарнирный участок, CH2 участок и CH3 участок, где шарнирный участок формирует по меньшей мере одну дисульфидную связь между первым и вторым полипептидами.

[0040] Также в данном документе описана молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая описанные выше первый и второй полипептиды. Молекула нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с элементом, контролирующим экспрессию, который обеспечивает экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды *in vitro* или *in vivo*. Кроме того, рассматривается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты. Вектор может являться вирусным вектором. В определенных случаях представлены первая нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид, и вторая нуклеиновая кислота, кодирующая второй полипептид. Каждая нуклеиновая кислота функционально связана с элементом, контролирующим экспрессию, который обеспечивает экспрессию первого и второго полипептидов из первой и второй нуклеиновых кислот соответственно. Также описаны первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту и второй вектор, содержащий вторую нуклеиновую кислоту. Как уже отмечалось здесь, вектор может являться вирусным вектором.

[0041] Некоторые варианты реализации включают трансформированные клетки-хозяева, экспрессирующие один или более из вышеупомянутых полипептидов. Например, представлена клетка-хозяин, которая содержит первую и вторую нуклеиновые кислоты. Клетка-хозяин экспрессирует первый полипептид и второй полипептид.

[0042] В конкретных вариантах реализации данного описания, один или более из вышеупомянутых комплексов разработан для получения фармацевтической композиции, причем 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.

[0043] Также раскрыта композиция (например, фармацевтическая композиция) из одного или более вышеуказанных комплексов для лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта; для лечения или профилактики расстройства метаболизма глюкозы у субъекта. Композиция может содержать количество комплекса, которое является эффективным для лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта. Композиция может содержать количество комплекса, которое является эффективным для лечения или профилактики расстройства метаболизма глюкозы у субъекта.

[0044] Дальнейшие варианты реализации настоящего изобретения содержат антитело, которое специфически связывается с одним из вышеупомянутых первым или вторым полипептидами.

[0045] Кроме того, в данном описании 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.

[0046] Некоторые варианты реализации данного изобретения предусматривают стерильный контейнер, который содержит одну из указанных выше фармацевтических композиций и опционально один или несколько дополнительных компонентов. В качестве примера, но не ограничиваясь им, 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.

[0047] Кроме того, в данном документе описан способ изготовления вышеупомянутых полипептидов и комплексов. Способ может включать культивирование клетки-хозяина, экспрессирующей полипептиды; и выделение комплекса, который содержит экспрессированные полипептиды.

[0048] В данном изобретении также рассматривается способ лечения или профилактики расстройства метаболизма глюкозы у субъекта (например, человека) путем введения субъекту терапевтически эффективного количества вышеупомянутого комплекса. 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 расстройство метаболизма глюкозы представляет собой сахарный диабет.

[0049] Кроме того, описан способ лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта. Способ может включать введение субъекту комплекса по данному описанию, причем комплекс 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.

[0050] В некоторых вариантах реализации субъект страдает ожирением и/или расстройством массы тела.

[0051] 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 ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0052] На Фиг. 1 продемонстрирован схематический рисунок гомодимерного комплекса гетеродимеров молекул (Fc/Fc)-GDF15, где Fc/Fc полипептиды имеют выступ-во-впадину Fc пары (A-F) и включение N-связанных гликанов в молекулу GDF15 (E, F) для усиления экспрессии и сборки гомодимерного комплекса гетеродимеров.

[0053] На Фиг. 2A продемонстрировано восстановление из Expi 293F транзientной экспрессии сконструированных (Fc/Fc)-GDF15 комплексов. Восстановление происходит следующим образом: (0 = агрегаты/без экспрессии, <25 мг/л, 25 мг/л - 49,9 мг/л, 50 мг/л - 74,9 мг/л, 75 мг/л - 99,0 мг/л, >100 мг/л). Добавление N-связанных гликанов в последовательность GDF15 в (Fc/Fc)-GDF15 обеспечивает значительное повышение общего восстановления после очистки. На Фиг. 2B предоставлено восстановление из Expi 293F транзientной экспрессии дикого типа GDF15 и GDF15-гликозилированных мутантов (гликомутеинов), которые не конъюгированы с Fc.

[0054] На Фиг. 3 продемонстрировано снижение массы тела в мышиной модели с ожирением, индуцированным диетой (DIO), при подкожной доставке 0,4 нмоль/кг (Fc/Fc)-GDF15 комплексов один раз в неделю в течение 4 недель, а затем 14-дневного периода восстановления. B13a/B13b вариант имеет значительно улучшенную эффективность по сравнению с B9a/B9b и B11a/B11b вариантами.

[0055] На Фиг. 4 продемонстрирован процент снижения массы тела в мышиной модели DIO при подкожной доставке 0,4 нмоль/кг (Fc/Fc)-GDF15 комплекса один раз в неделю в течение 4 недель, а затем 14-дневного периода восстановления. B13a/B13b вариант имеет % изменения массы тела без учета несущей среды более чем на 20 % после 14 дней восстановления после дозирования.

[0056] На Фиг. 5 продемонстрировано снижение массы тела в мышиной модели DIO при подкожной доставке 0,4 нмоль/кг (Fc/Fc)-GDF15 комплексов один раз в неделю в течение 4 недель, а затем 14-дневного периода восстановления.

[0057] На Фиг. 6 продемонстрирован процент снижения массы тела в мышиной модели DIO при подкожной доставке 0,4 нмоль/кг (Fc/Fc)-GDF15 комплексов один раз в неделю в течение 4 недель, а затем 14-дневного периода восстановления.

[0058] На Фиг. 7 и 8 обобщено наблюдаемое снижение массы тела (включая СОС и р-значение) для каждой группы DIO мышей (n=6) для 0,4 нмоль/кг и 4,0 нмоль/кг групп доз, изображенных на Фиг. 3 и 5. Для всех групп, (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ и *** = $p < 0,001$) посредством непараметрического t-теста.

[0059] На Фиг. 9 обобщен процент снижения массы тела (включая СОС и р-значение) для каждой группы DIO мышей (n=6) для 0,4 нмоль/кг и 4,0 нмоль/кг групп доз, изображенных на Фиг. 4 и 6. Для всех групп, (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ и *** = $p < 0,001$) посредством непараметрического t-теста.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0060] Перед дальнейшим описанием способов и композиций согласно данному изобретению следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе, а также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения.

[0061] 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 понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[0062] Следует отметить, что при использовании в данном документе и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста, очевидно, не следует иное. Так, например, упоминание "комплекс" включает упоминание одного или более комплексов, и так далее. Дополнительно следует отметить, что может быть составлен план формулы изобретения, исключаящий 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 для использования "отрицательных" ограничений.

[0063] Публикации, обсуждаемые в данной заявке, приведены исключительно для их описания до даты подачи данной заявки. Никакую информацию в данной заявке не следует толковать как признание того, что данное изобретение не имеет права датировать подобную публикацию более ранним числом в силу действия предыдущего изобретения. Более того, данные представленных публикаций могут отличаться от фактически опубликованных данных, что может потребовать независимого подтверждения.

Определения

[0064] Термины "полипептид", "пептид" и "белок", используемые в данном 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. Термины включают гибридные белки, включая, но не ограничиваясь ими, 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 тому подобное. В конкретных вариантах реализации изобретения, термины относятся к аминокислотной полимерной форме любой длины, которая содержит генетически кодируемые аминокислоты. В конкретных вариантах реализации изобретения, термины относятся к аминокислотной полимерной форме любой длины, содержащей генетически кодируемые аминокислоты, слитые с гетерологичной аминокислотной последовательностью. В конкретных вариантах реализации изобретения, термины относятся к аминокислоте длиной 98-112 аминокислот, необязательно слитой с гетерологичной последовательностью. В конкретных вариантах реализации изобретения, по мере необходимости при упоминании белков и молекул, описанных в данном документе, термины «полипептид», «пептид» и «белок» относятся к Полипептидам, как определено в данном документе.

[0065] Термин “комплекс”, используемый в данном документе, относится к белковому комплексу, который содержит по меньшей мере два полипептида, каждый из полипептидов содержит N-конец и С-конец. По меньшей мере два полипептида могут быть связаны друг с другом через один или оба ковалентных и нековалентных взаимодействий (например, электростатическое, π -эффекты, Ван-дер-ваальсовы силы и гидрофобные эффекты). По меньшей мере два полипептида могут быть одинаковыми, т. е. имеют идентичную аминокислотную последовательность, или могут быть разными, т. е. не имеют идентичные аминокислотные последовательности. Комплекс, имеющий два полипептида, при том, что оба полипептида идентичны, называют гомодимер. Комплекс, имеющий два полипептида, при том, что полипептиды отличаются, называют гетеродимер. Комплекс, имеющий три полипептида, при том, что три полипептида идентичны, называют гомотример. Комплекс, имеющий три полипептида, при том, что по меньшей мере один из трех полипептидов отличается от другого полипептида(ов), называют гетеротример. Комплекс, имеющий четыре полипептида, при том, что четыре полипептида идентичны, называют гомотетрамер. Комплекс, имеющий четыре полипептида, при том, что по меньшей мере один из четырех полипептидов отличается от другого полипептида(ов), называют гетеротетрамер. Иллюстративный комплекс из четырех полипептидов - двух молекул первого полипептида и

двух молекул второго полипептида, где первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом, формируя гетеродимер, и где два таких гетеродимера димеризуются, формируя комплекс, который может называться гомодимерный комплекс из двух гетеродимеров.

[0066] Данное описание предусматривает комплексы как определено выше, включая, не ограничиваясь указанным далее, гетеродимер, имеющий первый полипептид, связанный со вторым полипептидом, где первый полипептид представляет собой 'выступ' Fc и второй полипептид представляет собой 'впадину' Fc, и где, либо первый полипептид, либо второй полипептид слиты с аминокислотной последовательностью GDF15 (или мутеином GDF15, таким как, мутеин GDF15, описанный в данном документе). Первый и второй полипептиды могут быть физически связаны друг с другом с помощью нековалентных взаимодействий (например, гидрофобных эффектов, таких как, гидрофобные взаимодействия между участками выступа и впадины Fc), ковалентной связи (например, дисульфидной связи, такой как, одна или две дисульфидные связи между участком шарнира Fc в первом и втором полипептиде), или и того и другого.

[0067] Данное описание предусматривает комплекс, который содержит два гетеродимера, связанных друг с другом, каждый гетеродимер, имеющий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид представляет собой 'выступ' Fc и второй полипептид представляет собой 'впадину' Fc, и где, либо первый полипептид, либо второй полипептид слиты с аминокислотной последовательностью GDF15 (или мутеином GDF15). Внутри комплекса, два гетеродимера могут быть физически связаны с помощью нековалентных взаимодействий (например, гидрофобных эффектов), ковалентной связи (например, дисульфидной связи), или и того и другого. Первый и второй полипептиды в каждом из гетеродимеров в комплексе могут быть физически связаны друг с другом с помощью нековалентных взаимодействий (например, гидрофобных эффектов), ковалентной связи (например, дисульфидной связи), или и того и другого.

[0068] Данное описание предусматривает комплекс, который содержит два гетеродимера, связанных друг с другом, каждый гетеродимер, имеющий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид представляет собой 'выступ' Fc и второй полипептид представляет собой 'впадину' Fc, и где, либо первый полипептид, либо второй полипептид слиты с аминокислотной последовательностью GDF15 (или мутеином GDF15). Внутри комплекса, два гетеродимера могут быть физически связаны с помощью нековалентных

взаимодействий (например, гидрофобных эффектов) или ковалентных взаимодействий (например, дисульфидной связи(ей)) между GDF15 полипептидами и первый и второй полипептиды в каждом из гетеродимеров могут быть физически связаны друг с другом с помощью нековалентных взаимодействий (например, выступ во впадину), ковалентной связи (например, дисульфидной связи), или и того и другого.

[0069] Термины "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо для обозначения человека или животного, которое не является человеком (например, млекопитающего).

[0070] Термины "лечить", "лечение" и т.п. относятся к порядку действий (например, введению агента, например, полипептида, комплекса, или фармацевтической композиции, содержащей полипептид, комплекс) 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, 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, снижением массы тела, задержки увеличения массы тела).

[0071] 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.

[0072] Термины «предотвращать», «предотвращение», «профилактика» и т. п. относятся к порядку действий (такого как введение агента, например, полипептида, комплекса или фармацевтической композиции, содержащей полипептид, комплекс), 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 прогрессирования вредного или иного нежелательного состояния.

[0073] 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 решение принимается на основе целого ряда факторов, которые находятся в сфере компетенции врача или лица, ухаживающего за пациентом.

[0074] 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 обнаруживаемое 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 чем 200 мг/дл до менее чем 200 мг/дл, причем указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с 175-200 мг/дл до менее чем исходный уровень, причем указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с 150-175 мг/дл до менее чем исходный уровень, причем указанное количество достаточно для снижения уровня FPG с 125-150 мг/дл до менее чем исходный уровень и т.д. (например, снижения уровня до менее чем 125 мг/дл, менее чем 120 мг/дл, менее чем 115 мг/дл, менее чем 110 мг/дл и т.д.). В случае уровня HbA1c эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения или уменьшения уровня на более чем около 10 % до 9 %, на более чем около 9

% до 8 %, на более чем около 8 % до 7 %, на более чем около 7 % до 6 %, на более чем около 6 % до 5 % и т. д. В частности, снижение или уменьшение уровней HbA1c на около 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 данном описании. Терапевтически эффективное количество можно скорректировать в зависимости от схемы введения, диагностического анализа состояния субъекта и т. п.

[0075] Фраза "в количестве, достаточном, чтобы вызвать изменение" означает, что существует детектируемая разница между уровнем показателя, измеренного перед (например, базовый уровень) и после приема определенной терапии. Показатели включают любой объективный параметр (например, уровень глюкозы или инсулина, или потребления пищи, или массы тела) или субъективный параметр (например, хорошее самочувствие или аппетит субъекта).

[0076] Фраза «переносимость глюкозы», используемая в данном документе, относится к способности субъекта контролировать уровень глюкозы в плазме и/или инсулина в плазме при колебаниях потребления глюкозы. Например, переносимость глюкозы охватывает способность снижать в течение около 120 минут уровень глюкозы в плазме у субъекта обратно до уровня, определенного до потребления глюкозы.

[0077] Термины «диабет» и «диабетический» относятся к прогрессирующему заболеванию, связанному с метаболизмом углеводов, включающему недостаточную продукцию или утилизацию инсулина, часто характеризующемуся гипергликемией и глюкозурией. Термины «преддиабет» и «преддиабетический» относятся к состоянию, при 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 около 90 до около 100 мг/дл, у субъекта с «преддиабетом», как правило, концентрация FPG составляет от около 100 до около 125 мг/дл, и у субъекта с «диабетом», как правило, уровень FPG превышает около 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 чем около 140 мг/дл, концентрация глюкозы в крови субъекта с преддиабетом, как правило, составляет от около 140 до около 199 мг/дл, а концентрация глюкозы в крови субъекта с диабетом, как правило, составляет около 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 около 100 до около 150 мг/дл, у субъекта-мыши с «преддиабетом», как правило, концентрация FPG составляет от около 175 до около 250 мг/дл, и у субъекта-мыши с «диабетом», как правило, концентрация FPG выше около 250 мг/дл.

[0078] Термин «инсулинрезистентность», используемый в данном 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 экзогенно, может полностью или частично преодолеть инсулинрезистентность и запустить биологический ответ.

[0079] Термин «метаболический синдром» относится к взаимосвязанному кластеру признаков, который включает, но не ограничиваясь ими, гиперинсулинемию, аномальную толерантность к глюкозе, ожирение, перераспределение жира в брюшную полость или верхнюю часть тела, гипертензию, дисфибринолиз и дислипидемию, характеризующуюся высоким уровнем триглицеридов, низким уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)-холестерина и высоким уровнем частиц липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Субъекты с метаболическим синдромом подвержены риску развития диабета 2 типа и/или других расстройств (например, атеросклероза).

[0080] 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. Повышенные уровни глюкозы и/или инсулина могут проявляться при следующих заболеваниях, расстройствах и состояниях:

гипергликемии, сахарном диабете II типа, гестационном диабете, сахарном диабете I типа, инсулинрезистентности, нарушении переносимости глюкозы, гиперинсулинемии, нарушении метаболизма глюкозы, преддиабете, других метаболических расстройствах (например, метаболическом синдроме, который также называют синдромом X) и ожирении в частности. Комплексы согласно данному описанию и 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.

[0081] Термин «гипергликемия», как используется в данном документе, относится к состоянию, при котором в плазме крови субъекта циркулирует повышенное количество глюкозы по сравнению со здоровым индивидом. Гипергликемию можно диагностировать, используя способы, известные в данной области техники, включая измерение уровней глюкозы в крови натощак, как описано в данном документе.

[0082] Термин «гиперинсулинемия», как используется в данном документе, относится к состоянию, при котором повышены уровни циркулирующего инсулина при сопутствующих повышенных или нормальных уровнях глюкозы в крови. Гиперинсулинемия может быть вызвана инсулинрезистентностью, которая ассоциирована с дислипидемией, такой как высокий уровень триглицеридов, высокий уровень холестерина, высокий уровень липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП); высоким уровнем мочевой кислоты; синдромом поликистозных яичников; диабетом II типа и ожирением. Гиперинсулинемию можно диагностировать как уровень инсулина в плазмы выше, чем около 2 мкЕд/мл.

[0083] Как используется в данном документе, фраза «расстройство массы тела» относится к состояниям, ассоциированным с избыточной массой тела и/или повышенным аппетитом. Для определения наличия у субъекта избыточной массы тела по сравнению с эталонным 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 по оценке индекса массы тела (ИМТ) субъекта, который рассчитывают путем деления массы тела субъекта в килограммах на квадрат роста субъекта в метрах. Считается, что у взрослого с ИМТ в диапазоне от ~18,5 до ~24,9 кг/м² нормальный вес; у взрослого с ИМТ между ~25 и ~29,9 кг/м² избыточный вес (предожирение); и можно считать, что взрослый с ИМТ ~30 кг/м² 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 часто ассоциирующийся с бессонницей, которая может быть связана с травмой гипоталамуса.

[0084] Термин «активаторы» относится к агентам, которые, например, стимулируют, повышают, активируют, облегчают, усиливают активацию, сенсibiliзируют или индуцируют функцию или активность одного или более агентов, например, полипептидов или комплекса, используемых для лечения или профилактики метаболического расстройства. Кроме того, активаторы включают агенты, действующие по тому же механизму действия, как и полипептиды данного изобретения (т. е. агенты, которые модулируют тот же сигнальный путь, что и полипептиды, по способу, аналогичному указанным полипептидам) и способные вызывать биологический ответ, сопоставимый с (или превышающий) таковым полипептидов. Примеры активаторов включают агонисты, такие как низкомолекулярные соединения.

[0085] Термин «Модуляторы» совместно относится к полипептидам данного изобретения и Активаторам.

[0086] 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 полипептидов.

[0087] Следует принимать во внимание, что на всем протяжении данного описания ссылка предоставляется на аминокислоты в соответствии с однобуквенным или трехбуквенным кодом. Для удобства читателя, однобуквенные и трехбуквенные коды аминокислот приведены ниже:

G	Глицин	Gly		P	Пролин	Pro
A	Аланин	Ala		V	Валин	Val
L	Лейцин	Leu		I	Изолейцин	Ile
M	Метионин	Met		C	Цистеин	Cys
F	Фенилаланин	Phe		Y	Тирозин	Tyr
W	Триптофан	Trp		H	Гистидин	His

K	Лизин	Lys		R	Аргинин	Arg
Q	Глутамин	Gln		N	Аспарагин	Asn
E	Глутаминовая кислота	Glu		D	Аспарагиновая кислота	Asp
S	Серин	Ser		T	Треонин	Thr

[0088] Как используется в данном документе, термин «вариант» охватывает варианты естественного происхождения (например, гомологи и аллельные варианты) и варианты не естественного происхождения (например, рекомбинантно-модифицированные). Варианты естественного происхождения включают гомологи, т. е., нуклеиновые кислоты и полипептиды, которые отличаются по нуклеотидной или аминокислотной последовательности, соответственно, от одного вида к другому. Варианты естественного происхождения включают аллельные варианты, т. е., нуклеиновые кислоты и полипептиды, которые отличаются по нуклеотидной или аминокислотной последовательности, соответственно, от одного индивидуума к другому в пределах одного вида. Варианты не естественного происхождения включают нуклеиновые кислоты и полипептиды, которые содержат изменения в нуклеотидной или аминокислотной последовательности, соответственно, где изменение в последовательности внесено искусственно, например, изменение получено в лаборатории или другом учреждении за счет человеческого вмешательства («человеческими руками»).

[0089] 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).

[0090] Термин «мутеины», как используется в данном 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 обычно несут одну или несколько аминокислотных замен или делеций и часто получены от клонированных генов, которые были подвергнуты сайт-направленному или случайному мутагенезу или из полностью синтетических генов. «Мутеины GDF15» данного описания,

таким образом, охватывают, например, аминокислотные замены и/или аминокислотные делеции (например, укорачивание по N-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 природным/диким типом зрелым GDF15 человека (SEQ ID NO:1).

[0091] Как используется в данном документе, термины «модифицированный», «модификация» и т. д. по отношению нативному GDF15 человека или мутеину GDF15 относятся к одному или более изменениям, которые меняют свойства GDF15 человека, варианта GDF15 естественного происхождения или мутеина GDF15, где изменения не меняют саму первичную аминокислотную последовательность полипептида GDF15 (нативного или мутеина). Такое свойство включает, например, растворимость, период полужизни в кровотоке, стабильность, клиренс, иммуногенность или аллергенность и технологичность (например, стоимость и эффективность). «Модификация» включает ковалентную химическую модификацию, которая не влияет на саму первичную аминокислотную последовательность полипептида GDF15 (нативного или мутеина). Изменения GDF15 человека, варианта GDF15 естественного происхождения или мутеина GDF15 которые могут быть выполнены, включают, но не ограничиваясь указанным далее, пегилирование (ковалентное присоединение одной или более молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) или их производных); гликозилирование (например, N-гликозилирование), полисиалирование и присоединение ГЭК; слияние с мальтоза-связывающим белком; слияние с альбумином (например, слияние с ЧСА); связывание с альбумином через, например, конъюгированную цепь жирной кислоты (ацилирование); Fc-слияние; и слияние с миметиком ПЭГ. Некоторые конкретные варианты реализации изобретения приводят к модификациям, включающим в себя слияние с Fc, а другие конкретные модификации приводят к модификациям, включающим в себя гликозилирование или их комбинации.

[0092] Термины "ДНК", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "полинуклеотид" и т. п. используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, либо их аналогов. Не ограничивающие примеры включают линейные и циклические нуклеиновые кислоты, матричную РНК (мРНК), комплементарную ДНК (кДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, векторы, зонды, праймеры и тому подобное.

[0093] Термин «зонд» относится к фрагменту ДНК или РНК, соответствующему гену или представляющей интерес последовательности, причем фрагмент помечен радиоактивной

меткой (например, путем включения ^{32}P или ^{35}S) или некоторой другой обнаруживаемой молекулой, такой как биотин, дигоксигенин или флуоресцеин. Поскольку участки ДНК или РНК с комплементарными последовательностями должны гибридизироваться, зонд можно применять, например, для мечения вирусных бляшек, бактериальных колоний или полос на геле, который содержит представляющий интерес 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.

[0094] Термин «гетерологичный» относится к двум компонентам, которые определяются структурами, полученными из различных источников. Например, в контексте полипептида, «гетерологичный» полипептид может содержать функционально связанные аминокислотные последовательности, полученные от различных полипептидов (например, первый компонент, содержащий рекомбинантный полипептид, и второй компонент, полученный от нативного полипептида GDF15). Аналогичным образом, в контексте полинуклеотида, кодирующего химерный полипептид, «гетерологичный» полинуклеотид может содержать функционально связанные нуклеотидные последовательности, полученные от различных генов (например, первый компонент из нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный полипептид согласно варианту реализации изобретения, описанному в данном документе, и второй компонент из нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид-носитель). Другие типичные «гетерологичные» нуклеиновые кислоты включают экспрессирующие конструкции, 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.

[0095] Термин «функционально связанный» относится к связи между молекулами, обеспечивающей желаемую функцию. Например, «функционально связанные» в контексте нуклеиновых кислот относятся к функциональной связи между нуклеотидными последовательностями. Например, последовательность, контролирующая экспрессию нуклеиновой кислоты (например, промотор, сигнальная последовательность или совокупность 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.

[0096] Как используется в данном документе, в контексте структуры полипептида, "N-конец" (или "амино-конец") и "С-конец" (или "карбоксильный конец") относятся к крайним амино- и карбоксильным 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.

[0097] Термин «происходящий от» в контексте аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности (например, аминокислотная последовательность, «происходящая от» полипептида GDF15), предназначен для обозначения того, что полипептид или нуклеиновая кислота содержат последовательность, основанную на последовательности эталонного полипептида или нуклеиновой кислоты (например, полипептида GDF15 природного происхождения 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.

[0098] В контексте полипептида термин «выделенный» относится к полипептиду, представляющему интерес, который, если он встречается в природе, находится в среде, отличающейся от среды, в которой он может встречаться в естественных условиях. "Выделенный" подразумевает полипептиды, которые находятся в образцах, которые существенно обогащены представляющим интерес полипептидом и/или в которых представляющий интерес полипептид является частично или значительно очищенным. Если полипептид не встречается в естественных условиях, «выделенный» означает, что полипептид отделили от среды, в которой он был получен с использованием синтетических или рекомбинантных средств.

[0099] «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).

[00100] "В основном чистый" означает, что компонент (например, полипептид, димер, тетрамер, комплекс) 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 более от общей композиции составляет представляющий интерес компонент. В некоторых случаях, компонент будет составлять более чем около 90 %, или более чем около 95 % от общего содержания композиции.

[00101] Термины «антитела» (At) 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 данном документе.

[00102] 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.

[00103] 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.

[00104] 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 путем замены аминокислоты (аминокислот) в белке на аминокислоту с боковой цепью аналогичной кислотности, основности, заряда, полярности или размеру боковой цепи. Руководство по замене, inserции или делеции может быть основано на выравнивании аминокислотных последовательностей различных вариантов белков или белков из разных видов.

Фактор дифференциации роста 15 (GDF15)

[00105] GDF15, также известный как MIC-1 (ингибиторный цитокин макрофагов-1), PDF (фактор дифференциации 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 внутриклеточного белка-предшественника весом 62 кДа, впоследствии расщепляемого фурин-подобной протеазой, секретируется в виде дисульфид-связанного белка весом 25 кДа.

(См., например, Fairlie et al., J. Leukoc. Biol. 65:2-5 (1999)). мРНК GDF15 встречается в нескольких тканях, включая печень, почки, поджелудочную железу, толстую кишку и плаценту, а экспрессия GDF15 в печени может в значительной степени усиливаться при повреждении таких органов, как печень, почки, сердце и легкие.

[00106] Предшественником GDF15 является 308-аминокислотный полипептид (NCBI Ref.Seq.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., 110, 112 и 115 аминокислот), 112-аминокислотная зрелая последовательность принята за правильный вариант.

[00107] Объем данного описания включает ортологи GDF15 и их модифицированные формы, полученные из других видов млекопитающих, включая мышь (NP_035949), шимпанзе (XP_524157), орангутанга (XP_002828972), макаку-резус (EHH29815), гигантскую панду (XP_002912774), гиббона (XP_003275874), морскую свинку (XP_003465238), хорька (AER98997), корову (NP_001193227), свинью (NP_001167527), собаку (XP_541938) и утку (Ornithorhynchus anatinus; AFV61279). Зрелая форма GDF15 человека имеет около 67 % идентичности аминокислотной последовательности с ортологом мыши.

[00108] Ради удобства, модифицированные молекулы GDF15 человека, варианты GDF15 (например, мутеины) и модифицированные GDF15 мутеины, описанные в дальнейшем, совместно упоминаются далее как «Полипептид(ы)». Следует отметить, что любое упоминание «человека» в связи с Полипептидами и молекулами нуклеиновых кислот согласно данному 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 изобретения, молекулы модифицированного GDF15 человека представляют собой N-гликозилированные димеры. Кроме полипептидов человека и молекул нуклеиновых кислот, кодирующих их, в данном описании рассматриваются GDF15-родственные полипептиды и соответствующие молекулы нуклеиновых кислот из других видов.

А. Полипептиды с желаемыми физическими свойствами

[00109] Данное описание, в частности, предусматривает полипептиды, которые содержат непрерывную аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1 (зрелый 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 изобретения, кроме аминокислотных замен, полипептиды данного описания могут также содержать делеции аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах реализации изобретения, полипептиды данного описания могут содержать делеции аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

[00110] Для удобства и ясности, аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 используют в качестве эталонной последовательности для полипептидов, представленных в данном документе. Таким образом, положения аминокислот в данном документе пронумерованы по отношению к SEQ ID NO:1. Последовательность SEQ ID NO:1 представлена ниже:

[00111] ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR
AANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

[00112] В некоторых вариантах реализации изобретения, полипептиды данного описания могут включать одну, две, три или более аминокислотные замены, добавления или делеции, которые вводят 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

представляет собой аминокислоту, отличную от пролина, после которой находится Ser (S) или Thr (T).

[00113] Примеры полипептидов данного описания включают полипептиды, которые имеют 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.

[00114] В определенных 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, которые обеспечивают один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования в положении замещения (например, последовательность KTD в SEQ ID NO:1 можно заменить на NTT/S путем двух замен; положения замещения подчеркнуты). В некоторых вариантах реализации изобретения, полипептид может содержать три аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO:1 которые обеспечивают один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования в положении замещения (например, последовательность GPG в SEQ ID NO:1 можно заменить на NTT/S путем трех замен; положение замещения подчеркнуто).

[00115] В некоторых вариантах реализации изобретения, полипептид может содержать одну или более аминокислотную делецию по сравнению с SEQ ID NO:1, которая обеспечивает образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положении делеции. Например, последовательность NGDHCPLGPGRCCRLHT (SEQ ID NO:119) в SEQ ID NO:1 можно изменить путем делеции аминокислот D через H (подчеркнуты)), тем самым обеспечивая консенсусный сайт N-связанного гликозилирования: NGT.

[00116] В некоторых вариантах реализации изобретения, полипептид может содержать добавление одной или более аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:1, которые обеспечивают образование одного консенсусного сайта N-связанного гликозилирования в положении(ях) добавления(й). Пример внедрения консенсусного сайта N-связанного гликозилирования путем добавления одной аминокислоты включает добавление N к

последовательности LHT в SEQ ID NO:1, тем самым создавая последовательность LNHT, где NHT представляет собой консенсусный сайт N-связанного гликозилирования.

[00117] Как отмечено выше, полипептид может содержать одну или более аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:1, и замены могут быть пронумерованы, как положение соответствующей аминокислоты в SEQ ID NO:1.

[00118] В некоторых вариантах реализации изобретения, 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, где непрерывная аминокислотная последовательность содержит замену D5T/S или R21N.

[00119] В некоторых вариантах реализации изобретения, 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, где непрерывная аминокислотная последовательность содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен по сравнению с соответствующими аминокислотами в SEQ ID NO:1:

- i. R16N и H18T или R16N и H18S;
- ii. S23N и E25T или S23N и E25S;
- iii. L24N и D26T или L24N и D26S;
- iv. S50N и F52T или S50N и F52S;
- v. F52N и A54T или F52N и A54S;
- vi. Q51N и R53T или Q51N и R53S;
- vii. R53N и A55T или R53N и A55S;
- viii. S64N и H66T или S64N и H66S;
- ix. L65N и R67T или L65N и R67S;
- x. S82N и N84T или S82N и N84S;
- xi. K91N и D93T или K91N и D93S;
- xii. D93N и G95T или D93N и G95S;
- xiii. T94N и V96T или T94N и V96S;
- xiv. V96N и L98T или V96N и L98S;
- xv. S97N и Q99T или S97N и Q99S; и
- xvi. A106N и D108T или A106N и D108S

[00120] Например, замены, представленные выше в i), означают, что полипептид содержит треонин (T) или серин (S) в аминокислотном положении, которое соответствует аминокислотному положению 18 в SEQ ID NO:1, причем в SEQ ID NO:1 гистидин (H) присутствует в аминокислотном положении 18. Аналогичным образом, 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 определенных вариантах реализации изобретения, полипептид может содержать две аминокислотные замены (пару замен), которые обеспечивают одну консенсусную последовательность 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, перечисленные выше. R16N и H18T/S означает, что полипептид содержит N в положении, которое соответствует положению 16 в SEQ ID NO:1, где в SEQ ID NO:1 присутствует R и полипептид содержит либо T, либо S в положении, которое соответствует 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, пара замен приводит к внедрению консенсусной последовательности N-связанного гликозилирования.

[00122] В альтернативных вариантах реализации изобретения, одиночной аминокислотной замены может быть достаточно для обеспечения 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 изобретения, полипептид может содержать 112-аминокислотную непрерывную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90 % идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, где 112 смежных аминокислот содержат одну, две, три, четыре или более консенсусных

последовательности N-гликозилирования, таких как, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, 1-3 или 1-2 консенсусные последовательности N-гликозилирования.

[00124] В некоторых вариантах реализации изобретения, полипептид может содержать 112-аминокислотную непрерывную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90 % идентичность аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, где 112 смежных аминокислот содержат одну, две, три, четыре или более из пар замен, изложенных в данном документе.

[00125] Данное описание также предусматривает 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.

[00126] Полипептиды обладают определенной идентичностью последовательности по сравнению с эталонной последовательностью на определенной длине смежных аминокислот (например, “окно 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), с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Madison, Wis.), или выравниванием вручную с визуальным осмотром (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995, приложение)).

[00127] Например, подходящий полипептид может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 75 %, по меньшей мере около 80 %, по меньшей мере около 85 %, по меньшей мере около 90 %, по меньшей мере около 95 %, по меньшей мере около 98 %, или по меньшей мере около 99 % идентичности аминокислотной последовательности непрерывному участку из 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или до 112 аминокислот SEQ ID NO:1.

[00128] Иллюстративные фрагменты полипептидов, описанных в данном документе, включают полипептиды, которые имеют аминокислотные делеции по сравнению с SEQ ID

NO:1. Например, полипептиды могут иметь укорочения по N-концу и/или укорочения по C-концу по сравнению с SEQ ID NO:1. Укорочения могут быть 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 изобретения, представляющий интерес полипептид может содержать одну или более замен, позволяющих внедрить консенсусную последовательность N-связанного гликозилирования, такую как, описанную в данном документе, и укорочения по N-концу и/или укорочения по C-концу по сравнению с SEQ ID NO:1.

[00129] В определенных вариантах реализации изобретения, длина полипептида может составлять по меньшей мере 98 аминокислот, и может иметь аминокислотную последовательность идентичную по меньшей мере на 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % соответствующему участку из 98 аминокислот в SEQ ID NO:1. Полипептид может не содержать от первых двух до первых четырнадцати аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 аминокислот) присутствующих на N-конце SEQ ID NO:1, при сохранении аминокислот, присутствующих на C-конце SEQ ID NO:1. Другими словами, удаленная(ые) аминокислота(ы) соответствуют N-концевым аминокислотам SEQ ID NO:1.

[00130] В определенных вариантах реализации изобретения, мутеин GDF15 может быть длиной по меньшей мере 106 аминокислот и иметь аминокислотную последовательность идентичную по меньшей мере на 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % соответствующему участку из 106 аминокислот в SEQ ID NO:1. Мутеин GDF15 может не содержать первые шесть аминокислот, присутствующие на N-конце SEQ ID NO:1.

[00131] В определенных вариантах реализации изобретения, длина полипептида может составлять по меньшей мере 109 аминокислот, и имеет аминокислотную последовательность идентичную по меньшей мере на 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % соответствующему участку из 109 аминокислот в SEQ ID NO:1. Мутеин GDF15 может не содержать первые три аминокислоты, присутствующие на N-конце SEQ ID NO:1.

[00132] Иллюстративные полипептиды данного описания могут содержать делецию двух N-концевых аминокислот ($\Delta N2$) по отношению к ДТ hGDF15 и могут быть слиты с Fc-последовательностью на N-конце. Однако при упоминании положения аминокислотных замен, указанный номер остатка представляет собой остаток, который соответствует положению в зрелом hGDF15 ДТ (ДТ; SEQ ID NO:1). Таким образом, аминокислота N на N-конце полипептида, теряющая первые две аминокислоты на N-конце, может упоминаться как

остаток 3, хотя это первая аминокислота в аминокислотной последовательности полипептида мутеина GDF15 и предшествует гетерологичной аминокислотной последовательности (например, Fc).

[00133] 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 данном документе.

[00134] Как указано выше и подробно описано ниже, полипептиды данного описания можно модифицировать посредством, например, пегилирования (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 (ацилирование); Fc-слияния; и слияния с миметиком ПЭГ. В некоторых вариантах реализации изобретения, модификации вводят сайт-специфическим образом. В других вариантах реализации изобретения, модификации включают линкер. Линкер может конъюгировать модифицирующую группу с полипептидом.

[00135] В конкретных вариантах реализации изобретения, данное описание предусматривает модификацию зрелого GDF15 человека и мутеинов GDF15 (таких как полипептидов, описанных выше) путем конъюгации с альбумином. В других вариантах реализации изобретения, данное описание предусматривает модификацию полипептидов посредством N-гликозилирования или O-гликозилирования. Характеристики конъюгатов альбуминов и полипептида (например, слитых белков) и гликозилированных полипептидов описаны далее.

Fc-GDF15 слитые полипептиды и их комплексы

[00136] В иллюстративных вариантах реализации изобретения, полипептиды GDF15, описанные в данном документе, могут присутствовать как слитый полипептид, содержащий Fc-полипептид или его фрагмент, слитый с аминокислотной последовательностью одного или более из полипептидов, описанных в данном документе (например, молекулой GDF15 человека, модифицированными молекулами GDF15 человека, мутеинами GDF15 и

модифицированными мутеинами GDF15). Как предусмотрено в данном документе, полипептид GDF15 может быть полипептидом дикого типа или мутеином, например, гликозилированным мутеином. Как используется в данном документе, “гликозилированный мутеин” или “гликомутеин” или “гликозилированный вариант” или “гликовариант” в контексте полипептида, например, полипептида GDF15 относится к полипептиду, который содержит один или более сайт гликозилирования консенсуса в положении в аминокислотной последовательности в этом положении указанный полипептид (дикий тип) не содержит сайт гликозилирования консенсуса. В некоторых случаях, слитый полипептид может содержать Fc-последовательность, слитую с N-концом гликомутеина GDF15, описанную в данном документе.

[00137] Любая последовательность Fc-полипептида, описанная в данном документе или известных в данной области техники, может являться одним из компонентов гибридных белков данного описания. Компоненты гибридных белков можно при необходимости ковалентно связать посредством линкера, например, линкеров, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации данного описания, гибридные белки содержат последовательность Fc-полипептида в виде N-концевой части и полипептиды, описанные в данном документе, в виде C-концевой части.

[00138] В некоторых случаях, Fc-партнер Fc-GDF15 слитых полипептидов, описанных в данном документе, может быть Fc, имеющим Fc последовательность IgG человека (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) или ее вариант. Аминокислотная последовательность Fc IgG1 человека представлена как SEQ ID NO:2:

[00139] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:2)

[00140] Шарнирный участок выделен курсивом, домен CH2 подчеркнут и домен CH3 выделен двойным подчеркиванием. Нумерация положений в аминокислотной последовательности Fc соответствует системе нумерации, принятой в EC (Edelman G. M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)). Таким образом, остаток глутаминовой кислоты “E” в положении 1 в SEQ ID NO:2 нумеруется как 216; домен CH2 начинается с аланина (A),

который имеет номер 231; домен CH3 начинается с глицина (G), который имеет номер 341, в соответствии с нумерацией ЕС.

[00141] Fc-партнер Fc-GDF15 слитых полипептидов, описанных в данном документе, может быть Fc, имеющим непрерывную аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична SEQ ID NO:2, например, на по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или более идентична SEQ ID NO:2. В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-партнер может быть фрагментом Fc, содержащим домен CH3 или непрерывную аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична домену CH3 в SEQ ID NO:2. В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-партнер может быть фрагментом Fc, содержащим домен CH2 и домен CH3 или непрерывную аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична доменам CH2 и CH3 в SEQ ID NO:2. В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-партнер может быть фрагментом Fc, содержащим частичный участок шарнира, домен CH2 и домен CH3 или непрерывную аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична участку шарнира, домену CH2 и домену CH3 в SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах реализации изобретения, Fc-партнер может иметь аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO:2.

[00142] В некоторых случаях, Fc-партнер Fc-GDF15 слитых полипептидов может содержать сконструированное выпячивание, это выпячивание может связать другой Fc-полипептид, который содержит сконструированную впадину. В других случаях, Fc-партнер Fc-GDF15 слитых полипептидов может содержать сконструированную впадину, эта впадина может связать другой Fc-полипептид, который содержит сконструированное выпячивание. Иллюстративные Fc-последовательности со сконструированным выпячиванием и/или впадиной описаны в патенте США 8216805. В определенных случаях, выпячивание и впадина могут быть сконструированы в домене CH3 Fc-полипептида. В определенных случаях, Fc-партнер, который связан с Fc-GDF15 слитыми полипептидами данного описания, не является конъюгированным с полипептидом GDF15. Соответственно, Fc-партнер

димеризуется с Fc-GDF15 слитым полипептидом, формируя гетеродимер с одной GDF15 молекулой на гетеродимер.

[00143] “Выпячивания” или “выступы” могут быть сконструированы с помощью замены небольших аминокислотных боковых цепей в домене СН3 первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). Компенсационные “впадины” или “дыры” идентичного или сходного выпячиванию размера могут быть созданы по желанию в домене СН3 второго полипептида с помощью замены крупных аминокислотных боковых цепей меньшими (например, аланином или треонином).

[00144] “Первым полипептидом” может быть любой полипептид, который должен быть связан со вторым полипептидом. Первый и второй полипептид встречаются в “поверхности контакта” (определено ниже). В дополнение к поверхности контакта, первый полипептид может содержать один или более дополнительных доменов, таких как домен СН2 или участок шарнира. В определенных случаях, первый полипептид содержит домен СН3, который может формировать поверхность контакта с первым полипептидом.

[00145] “Второй полипептид” может быть любым полипептидом, который должен быть связан с первым полипептидом через “поверхность контакта”. В дополнение к поверхности контакта, второй полипептид может содержать один или более дополнительных доменов, таких как домен СН2 или участок шарнира. В определенных случаях, второй полипептид содержит домен СН3, который может формировать поверхность контакта со вторым полипептидом.

[00146] “Поверхность контакта” содержит те “контактные” аминокислотные остатки (или другие не аминокислотные группы, такие как углеводные группы, НАДН, биотин, ФАД или гем-группу) в первом полипептиде, которые взаимодействуют с одним или более “контактными” аминокислотными остатками (или другими не аминокислотными группами) на поверхности контакта второго полипептида. В определенных случаях, поверхность контакта может быть доменом иммуноглобулина, таким как константный домен (или его фрагменты). В определенных случаях, поверхность контакта содержит домен СН3 иммуноглобулина, который является производным от IgG антител, например, антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[00147] “Выпячивание” относится к по меньшей мере одной боковой цепи аминокислоты, которая выступает из поверхности контакта первого полипептида и, следовательно, позиционируется в компенсационную впадину в смежной поверхности контакта (т. е.

поверхность контакта второго полипептида) с тем, чтобы стабилизировать гетеродимер, и тем самым способствуют предпочтительному образованию гетеродимера, а не гомодимера, например. Впадина может существовать в исходной поверхности контакта или может быть введена искусственно (например, путем изменения нуклеиновых кислот, кодирующих поверхность контакта). Выпячивание может быть введено искусственно (например, путем изменения нуклеиновых кислот, кодирующих поверхность контакта) например, рекомбинантными способами.

[00148] “Впадина” относится к по меньшей мере одной боковой цепи аминокислоты, которая углублена в поверхность контакта второго полипептида и, следовательно, вмещает соответствующее выпячивание на соседней поверхности контакта первого полипептида. Впадина может существовать в исходной поверхности контакта или может быть введена искусственно (например, путем изменения нуклеиновых кислот, кодирующих поверхность контакта). Например, нуклеиновая кислота, кодирующая поверхность контакта второго полипептида изменяется для кодирования впадины.

[00149] Выпячивание также упоминается как ‘выступ’ и впадина также упоминается как ‘впадина’. Иллюстративные выпячивания и полости представлены в патенте США 8216805 и содержат замены следующих аминокислотных положений: 347, 366, 368, 394, 405 и 407. Нумерация положений в аминокислоте соответствует системе нумерации, принятой в ЕС. Сконструированное выпячивание может включать в себя по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в Fc-последовательности человеческого IgG1, причем замена происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 347, 366 и 394. Например, по меньшей мере одна замена является выбранной из группы, состоящей из Q347W/Y, T366W/Y и T394W/Y. В определенных случаях, сконструированная впадина содержит по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в Fc-последовательности IgG1 человека, причем замена происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 366, 368, 394, 405 и 407. Например, по меньшей мере одна замена является выбранной из группы, состоящей из T366S, L368A, T394S, F405T/V/A и Y407T/V/A.

[00150] В определенных случаях, выпячивание может содержать замену T366W/Y и впадина может содержать замены T366S, L368A и Y407T/V/A.

[00151] Например, выпячивание может содержать замену T366W/Y и впадина может содержать замену Y407T/V/A. В других случаях, выпячивание может содержать замену

T366Y и впадина может содержать замену Y407T. В других примерах, выпячивание может содержать замену T366W и впадина может содержать замену Y407A. В дальнейших примерах, выпячивание может содержать замену T394Y и впадина может содержать замену Y407T.

[00152] В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-партнер полипептида GDF15 в слитом полипептиде может содержать дополнительные мутации, которые улучшают качество слияния полипептида. Как таковые, Fc-последовательности в первом и втором полипептидах, описанных в данном документе, могут содержать дополнительные мутации. Например, последовательность Fc-партнера может содержать мутацию(и), которая отменяет эффекторную функцию (например, уменьшает или устраняет) IgG, которая в противном случае может быть признаком Fc-партнера. В определенных случаях, последовательность Fc-партнера может содержать мутацию(и), которая отменяет эффекторные функции, такие как комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и антитело-зависимый фагоцитоз клеток (ADCP).

[00153] Четыре изоформа IgG человека связывают рецепторы активации Fcγ (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb), ингибирующий рецептор FcγRIIb, и первый компонент комплемента (C1q) с различным сродством, получая очень разные эффекторные функции. Таким образом, мутации в рамках участков связывания могут иметь существенное влияние на эффекторную функцию.

[00154] Связывание IgG с FcγRs или C1q зависит от остатков, расположенных в участке шарнира и домена CH2. Два участка домена CH2 имеют решающее значение для FcγRs и C1q связывания, и имеют уникальные последовательности в IgG2 и IgG4. Было продемонстрировано, что замены в IgG1 человека на остатки IgG2 в положениях 233-236 и остатки IgG4 в положениях 327, 330 и 331 значительно снижают активность АЗКЦ и КЗЦ (Armour K.L. et al., 1999. Eur. J. Immunol. 29 (8):2613-24; Shields R. L. et al., 2001, J. Biol. Chem. 276 (9):6591-604). Кроме того, Idusogie и др. продемонстрировали, что замена аланина в разных положениях, включая K322, значительно снижает активацию комплемента (Idusogie E. E. et al., 2000. J. Immunol. 164 (8):4178-84). Аналогично, было показано, что мутации в домене CH2 мышинового IgG2A уменьшают связывание с FcγRI и C1q (Steurer W. et al., 1995. J. Immunol. 155 (3):1165-74). В некоторых вариантах реализации изобретения, Fc-полипептид может содержать мутацию в домене CH2, который отменяет эффекторную функцию(и) IgG.

Иллюстративные мутации в участках CH2 включают: APELLGGP (SEQ ID NO:96) → APALLGGP (SEQ ID NO:98); APELGGP (SEQ ID NO:96) → APELGGP (SEQ ID NO:99); и APELLGGP (SEQ ID NO:96) → APALGGP (SEQ ID NO:97).

[00155] В некоторых вариантах реализации изобретения, Fc-полипептид конъюгирован с гликомутеинами GDF15, содержащими часть или все последовательности шарнира дикого типа (обычно на его N-конце). В некоторых вариантах реализации изобретения, Fc-полипептид не содержит функциональной последовательности или последовательности шарнира дикого типа. В определенных случаях, Fc-последовательность может содержать одну из следующих шарнирных последовательностей: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:100); KSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:101); SCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:102); CDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:103); DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:104); KTHTCPPCP (SEQ ID NO:105); THTCPPCP (SEQ ID NO:106); или CPPCP (SEQ ID NO:107); или вариант, имеющий одну или более замен (например, 1-6 замен, например, 1-5, 1-4, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 замен). В определенных случаях, Fc-последовательность может содержать участок шарнира, который формирует ковалентную связь (например, одну или более дисульфидных связей) с участком шарнира другого Fc. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения, первый и второй полипептиды в комплексе, описанном в данном документе, может быть связан через ковалентные взаимодействия между участками шарнира первого и второго полипептидов. Ковалентное взаимодействие может включать в себя одну или две межмолекулярные дисульфидные связи.

[00156] Как подробно описано в данном документе, предусматривается первый полипептид, содержащий последовательность Fc выступа или впадины, конъюгированный с гликомутеином GDF15. Такой полипептид может быть в комплексе со вторым Fc-полипептидом, с которым первый полипептид может физически связаться через размещение выступа-во-впадину на Fc-последовательности.

[00157] В определенных случаях, описан комплекс первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида. Одним из первого или второго полипептида может быть слитый полипептид из Fc и GDF15. Как отмечается в данном документе, GDF15 полипептид может содержать мутацию(и) гликозилирования, приводящую к гликозилированию GDF15 полипептида. Гликозилированный GDF15 полипептид может также упоминаться как GDF15-гликан или GDF15-гликомутеин. GDF15-гликан или GDF15-гликомутеин могут являться такими, как описанные в данном документе. В определенных случаях, GDF15-гликан или GDF15-

гликомутеин, слитые с Fc-выступом или Fc-впадиной полипептида, представленного в данном документе, могут быть Полипептидом, который содержит непрерывную аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, где непрерывная аминокислотная последовательность имеет замену D5T; D5S; или R21N по сравнению с аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1. В определенных вариантах реализации изобретения, GDF15-гликан или GDF15-гликомутеин, слитые с Fc-выступом или Fc-впадиной полипептида, могут быть Полипептидом, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, где аминокислотная последовательность содержит одну или более из следующих пар замен по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1:

- xvii. R16N и H18T или R16N и H18S;
- xviii. S23N и E25T или S23N и E25S;
- xix. S50N и F52T или S50N и F52S;
- xx. F52N и A54T или F52N и A54S;
- xxi. R53N и A55T или R53N и A55S;
- xxii. S64N и H66T или S64N и H66S;
- xxiii. K91N и D93T или K91N и D93S;
- xxiv. D93N и G95T или D93N и G95S;
- xxv. T94N и V96T или T94N и V96S;
- xxvi. V96N и L98T или V96N и L98S;
- xxvii. S97N и Q99T или S97N и Q99S; и
- xxviii. A106N и D108T или A106N и D108S

[00158] В определенных случаях, комплекс может содержать первый и второй полипептиды. Первый полипептид может содержать Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG может содержать CH3 последовательность, которая содержит по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит CH3 последовательность, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину, причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, и

причем либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования. Соответственно, комплекс содержит гетеродимер из первого полипептида и второго полипептида. Поскольку либо первый, либо второй полипептид слит с мутеинами GDF15, описанными в данном документе, присутствует одна GDF15 молекула на гетеродимер. В определенных случаях, мутеин GDF15 может быть мутеином GDF15, описанным в данном документе.

[00159] Как обсуждается в данном документе, первый и второй полипептиды могут взаимодействовать для формирования гетеродимера посредством ковалентных и/или нековалентных взаимодействий, таких как, гидрофобные взаимодействия, дисульфидные связи, или и то и другое.

[00160] В определенных вариантах реализации изобретения описан комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер. Каждый из первого и второго гетеродимеров может содержать первый полипептид и второй полипептид, причем первый полипептид может содержать Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG может содержать последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; второй полипептид может содержать Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG может содержать последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, причем либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, причем мутеин GDF15 в первом гетеродимере димеризуется с мутеином GDF15 во втором гетеродимере, тем самым формируя комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер. В объеме данного описания комплекс содержит первый гетеродимер физически связанный со вторым гетеродимером, присутствуют две молекулы GDF15 на комплекс гетеродимер-гетеродимер.

[00161] Как отмечается в данном документе, гетеродимер посредством ковалентных и/или нековалентных взаимодействий, таких как, гидрофобные взаимодействия, дисульфидные связи, или и то и другое, и первый и второй гетеродимеры димеров могут взаимодействовать для формирования димер-димерного комплекса с помощью ковалентных и/или

нековалентных взаимодействий, таких как, гидрофобные взаимодействия, дисульфидные связи, или и то и другое.

[00162] В некоторых случаях, мутеины GDF15 присутствующие в каждом из гетеродимеров, описанных в данном документе, например, в комплексе из двух гетеродимеров, могут быть идентичными по последовательности или разными. В определенных случаях, мутеин GDF15 в комплексе из двух гетеродимеров, может быть идентичен по последовательности.

[00163] В данном документе описаны иллюстративные Fc-последовательности для слияния с мутеинами GDF15 и как партнеры связывания с Fc-GDF15 слитыми белками. В определенных вариантах реализации изобретения, Fc-последовательности, присутствующие в комплексах по данному описанию, могут быть подобны или идентичны по последовательности, отличной от сконструированных последовательностей ‘выступа и ‘впадины’.

[00164] В некоторых случаях первый и второй полипептиды, которые могут взаимодействовать для формирования комплексов, описанных в данном документе, могут быть указаны ниже как Пара I по VIII. В последовательностях, изложенных ниже, Fc-последовательность иммуноглобулина G1 (hIgG1) человека следует за последовательностью линкера (подчеркнуто), следующей за последовательностью мутеина GDF15 (жирный шрифт).

ПАРА I:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₂-ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)

[00165] DKHTTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN
MHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI
(SEQ ID NO:3)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00166] DKHTTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:4)

ПАРА II:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)

[00167] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQT
 YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:5)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00168] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:6)

ПАРА III:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R21N)

[00169] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQT
 YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:7)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00170] DKHTTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:8)

ПАРА IV:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)

[00171] DKHTTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQT
 YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:9)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00172] DKHTTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:10)

ПАРА V:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)

[00173] DKHTTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQNRTANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
 TYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:11)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00174] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:12)

ПАРА VI:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)

[00175] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGSGGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQT
 YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:13)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00176] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:14)

ПАРА VII:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)

[00177] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGSGGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
 MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSQT
 YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:15)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00178] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:16)

ПАРА VIII:

Первый Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366W)- (G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(D93N/G95T)

[00179] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTNTTVSLQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:17)

Второй Полипептид: hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00180] DKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:18)

[00181] В некоторых случаях первый и второй полипептиды, которые могут взаимодействовать для формирования комплексов, описанных в данном документе, могут иметь аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80 % идентичную аминокислотной последовательности первого и второго полипептидов, соответственно, как описано выше в Парах с I по VIII. Например, идентичность последовательности может быть по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 99 % или более.

[00182] В некоторых вариантах реализации изобретения, комплекс может содержать первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90

%, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; и второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4, где первый и второй полипептиды ковалентно соединены через по меньшей мере одну межмолекулярную дисульфидную связь. Также в данном документе представлены комплексы, содержащие первый гетеродимер и второй гетеродимер, каждый из первого гетеродимера и второго гетеродимера содержат первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3; и второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4.

[00183] В некоторых вариантах реализации изобретения, комплекс может содержать первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5; и второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, где первый и второй полипептиды ковалентно соединены через по меньшей мере одну межмолекулярную дисульфидную связь. Также в данном документе представлены комплексы, содержащие первый гетеродимер и второй гетеродимер, каждый из первого гетеродимера и второго гетеродимера содержат первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:5; и второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6.

[00184] В некоторых вариантах реализации изобретения, комплекс может содержать первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7; и второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8, где первый и второй

полипептиды ковалентно соединены через по меньшей мере одну межмолекулярную дисульфидную связь. Также в данном документе представлены комплексы, содержащие первый гетеродимер и второй гетеродимер, каждый из первого гетеродимера и второго гетеродимера содержат первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7; и второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8.

[00185] В конкретных вариантах реализации изобретения, комплексы, описанные в данном документе, могут содержать два гетеродимера, каждый гетеродимер содержит:

[00186] (a) hIgG1-Fc полипептид, содержащий выступ (Fc-выступ) и имеющий последовательность:

[00187] DKHTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:127); и

[00188] (b) hIgG1-Fc полипептид, содержащий впадину (Fc-впадину) и имеющий последовательность:

[00189] DKHTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:4),

[00190] где либо Fc-выступ (a), или Fc-впадина (b) слиты на С-конце с N-концом гликомутеина GDF15. Последовательность гликомутеина GDF15 может быть следующей:

[00191] ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR
AANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI
(SEQ ID NO:128; GDF15 (A1-I112) D5T); или

[00192] NGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA
NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ
ID NO:129; ΔN2-GDF15 (N3-I112) D5T); или

[00193] GTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN
MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:130; ΔN3-GDF15 (G4-I112) D5T); или

[00194] GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN
MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:131; ΔN3-GDF15 (G4-I112) R21N); или

[00195] GDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAA
NMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:132; ΔN3-GDF15 (G4-I112) (S23N/E25T)); или

[00196] GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRTAN
MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:133; ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)); или

[00197] GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATN
MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:134; ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)); или

[00198] GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN
MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:135; ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)); или

[00199] GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN
MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTNTTVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ
ID NO:136; ΔN3-GDF15 (G4-I112)(D93N/G95T)).

[00200] В некоторых примерах, аминокислотная последовательность Fc-выступа может быть на по меньшей мере 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127. В некоторых примерах, аминокислотная последовательность Fc-выступ может быть на по меньшей мере 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4. В некоторых примерах, аминокислотная последовательность мутеина GDF15 может быть на по меньшей мере 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или более идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO:128-136.

[00201] Fc-выступ или Fc-впадина могут быть соединены с гликомутеином GDF15 через последовательность линкера (G₄S)_n, где n=1-10, например, 2, 3, 4 или 5.

[00202] В некоторых примерах, комплексы данного описания могут иметь восстановление от по меньшей мере 50 мг/л, например, по меньшей мере более чем 55 мг/л, 60 мг/л, 65 мг/л, 70 мг/л, 75 мг/л, 80 мг/л, 85 мг/л, 90 мг/л, 95 мг/л, 100 мг/л, 110 мг/л, 120 мг/л, 130 мг/л, 140 мг/л, 150 мг/л, 160 мг/л, 170 мг/л, 180 мг/л, 190 мг/л, 200 мг/л или более. В некоторых случаях комплексы данного описания могут иметь восстановление от по меньшей мере 50 мг/л-300 мг/л, например 60 мг/л-300 мг/л, 75 мг/л-300 мг/л, 75 мг/л-250 мг/л, 75 мг/л-200 мг/л, 75 мг/л-175 мг/л, 75 мг/л-150 мг/л, 100 мг/л-300 мг/л, 100 мг/л-250 мг/л, 100 мг/л-200 мг/л, 100 мг/л-150 мг/л, 100 мг/л-125 мг/л, 110 мг/л-300 мг/л или 150 мг/л-300 мг/л. Восстановление комплекса относится к количеству полностью собранного димер-димерного комплекса, полученного из культуральной среды, в которой культивируют клетку-хозяина, экспрессирующую первый и второй полипептиды, которые формируют два димера, присутствующие в каждом полностью собранном комплексе.

[00203] В данном описании также рассматриваются партнеры слияния Fc-полипептида и слитые белки, содержащие такие молекулы, где партнер слияния Fc-полипептида модифицирован, чтобы быть одним из партнеров заряженной пары Fc. «Партнер заряженной пары Fc» относится к (i) «отрицательно заряженной» Fc-последовательности (с необязательно отсутствующим шарнирным участком), содержащей мутацию зарядовой пары или (ii) «положительно заряженной» Fc-последовательности (с необязательно отсутствующим шарнирным участком), содержащей мутацию зарядовой пары. «Положительно заряженный» и «отрицательно заряженный» используются в данном документе для удобства описания природы мутации зарядовой пары в Fc-последовательностях, а не для указания, что последовательность или конструктор в целом обязательно имеет положительный или отрицательный заряд. Аминокислотные последовательности заряженного Fc, пригодные для использования в конструктах полипептида (например, гликомутеин GDF15, модифицированные гликомутеины GDF15), используемые в данном описании, представлены в, например, WO 2013/113008.

[00204] 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 отсутствующим шарнирным участком. Примеры отрицательно заряженного Fc (“Fc(-)”) включают Fc, содержащий две мутации замены лизина на аспартат (K392D, K409D) в Fc-последовательности с отсутствующим шарнирным участком. С-концевой лизин (K477) также можно при необходимости удалить.

Когда на слитый белок на основе Fc(+)Полипептида (например, слитый белок мутеина Fc(+)GDF15) и слитый белок на основе Fc(-)Полипептида (например, слитый белок мутеина Fc(-)GDF15) инкубируют совместно, остатки аспартата ассоциируют с остатками лизина посредством электростатических сил, облегчая образование Fc-гетеродимеров между Fc(+) и Fc(-) последовательностями слитых белков на основе GDF15 полипептида.

[00205] Данное описание также предусматривает конструкции, называемые конструктами «геми» или «геми-Fc», содержащие две Fc-последовательности, соединенные тандемом с помощью линкера, который соединяет N-конец первой Fc-последовательности с С-концом второй Fc-последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения, мономер содержит последовательность полипептида (например, зрелого модифицированного GDF15 или гликомутеина GDF15), связанную с первой Fc-последовательностью посредством первого линкера, соединяющего N-конец последовательности GDF15 с С-концом первой Fc-последовательности, причем первая Fc-последовательность соединена со второй Fc-последовательностью посредством второго линкера, соединяющего N-конец первой Fc-последовательности с С-концом второй Fc-последовательности. Первая и вторая Fc-последовательности также связаны посредством шарнирных участков Fc. Два таких мономера ассоциируют для формирования димера, в котором мономеры связаны посредством межцепочечной дисульфидной связи между двумя последовательностями полипептида. Примеры геми-Fc-полипептидов, пригодных для использования с мутеинами GDF15 согласно данному описанию, см. в WO 2013/113008.

[00206] Данное описание также предусматривает гибридные белки, имеющие мультимер Fc-полипептидов или их фрагменты, включая партнер заряженной Fc-пары (например, Fc-мультимер).

[00207] Комплексы по данному описанию имеют улучшенные свойства, такие как увеличенную растворимость, уменьшенную агрегацию, и/или увеличенный период полужизни в сыворотке крови. В определенных случаях, растворимость комплексов в целом была улучшена по сравнению с неконъюгированным рекомбинантным GDF15 человека и Fc (выступ или впадина) конъюгированного дикого типа GDF15. В определенных вариантах реализации изобретения, комплекс имеет растворимость по меньшей мере 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) при pH 7,0. В других вариантах реализации изобретения, комплекс имеет растворимость 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 реализации

изобретения, комплекс имеет растворимость по меньшей мере 6 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (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 изобретения, комплекс имеет растворимость более чем 10 мг/мл.

[00208] Гликозилирование: Для целей данного описания 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 данным описанием, как правило, означает добавление или удаление одной или более из углеводных групп (либо путем перемещения основного сайта гликозилирования, или путем удаления гликозилирования с помощью химических и/или ферментативных способов), 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.

[00209] 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 данном документе, выгодно улучшает их физические свойства. В качестве примера, но не ограничиваясь ими, растворимость мутеинов GDF15 можно улучшить путем гликозилирования, и такое улучшение может быть значительным (см. Примеры). Улучшение растворимости, демонстрируемое такими модифицированными мутеинами GDF15, может, например, включать создание составов, более подходящих для фармацевтического введения, чем негликозилированные GDF15/мутеины GDF15. Гликозилированные GDF15/мутеиновые полипептиды GDF15 также могут демонстрировать повышенную стабильность. Кроме того, полипептиды могут улучшить одно или несколько из фармакокинетических свойств, таких как, период полужизни.

[00210] Добавление сайтов гликозилирования можно осуществить путем изменения аминокислотной последовательности, как описано выше. Изменение полипептида можно 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 сахара, обнаруживаемых при каждом типе, могут различаться. Один из сахаров, обычно присутствующий при обоих вариантах, представляет собой N-ацетилнейраминовую кислоту (далее называемую сиаловой кислотой). Сиаловая кислота обычно является концевым остатком как N-связанных, так и O-связанных олигосахаридов и, за счет своего отрицательного заряда, может придавать гликопротеину кислые свойства. Конкретный вариант реализации данного описания включает получение и применение вариантов N-гликозилирования, описанных выше.

[00211] Другим способом увеличения количества углеводных остатков в полипептиде является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду.

[00212] Клетки яичника китайского хомяка (CHO), дефицитные по 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.

[00213] В конкретных вариантах реализации изобретения, мутеины GDF15, содержащие по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, являются гликозилированными. Таким образом, в конкретных вариантах реализации изобретения, мутеины GDF15 в комплексах, описанных в данном документе, могут быть гликозилированы на консенсусном сайте N-связанного гликозилирования, введенного в мутеин GDF15. В определенных случаях, когда комплекс, описанный в данном документе, может включать в себя гликозилированный GDF15, такой как, гликозилированный GDF15, произведенный во время экспрессии из клеточной линии, комплекс может быть обработан после производства для удаления углеводного фрагмента. Удаление после производства углеводного фрагмента может привести к удалению практически всех групп углеводов, прикрепленных к мутеину GDF15 (и Fc-последовательности) во время экспрессии в эукариотической клетке-хозяине.

[00214] Таким образом, данное описание предусматривает конъюгирование одного или более 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, иллюстративная полипептидная последовательность может быть представлена в виде конъюгата с другим компонентом или молекулой.

[00215] Полипептид можно также конъюгировать с крупными, медленно метаболизируемыми макромолекулами, например, белками; полисахаридами, например, сефарозой, агарозой, целлюлозой, гранулами целлюлозы; полимерными аминокислотами, например, полиглутаминовой кислотой, полилизинном; сополимерами аминокислот; инактивированными вирусными частицами; инактивированными бактериальными токсинами, например, анатоксинами дифтерии, столбняка, холеры, молекулами лейкотоксинов; инактивированными бактериями; и дендритными клетками. Такие конъюгированные формы при желании можно использовать для получения антител против полипептида согласно данному описанию. В определенных случаях, GDF15 в комплексах, описанных в данном документе, может являться полипептидом, конъюгированным с большими, медленно метаболизируемыми молекулами.

[00216] Дополнительные кандидаты-компоненты и молекулы для конъюгирования 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.

[00217] 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.

[00218] Линкеры: Любой из вышеуказанных компонентов и молекул, используемых для изменения полипептидных последовательностей по данному описанию, 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 около 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 могут быть легко выбраны и они могут быть любой подходящей длины, такой как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 аминокислот.

[00219] Иллюстративные гибкие линкеры включают полимеры глицина (G)_n, полимеры глицин-аланина, полимеры аланин-серина, полимеры глицин-серина (например, (G_mSo)_n, ($GSGGS$)_n (SEQ ID NO:120), (G_mSoG_m)_n, ($G_mSoG_mSoG_m$)_n (SEQ ID NO:121), ($GSGGS_m$)_n (SEQ ID NO:122), ($GSGS_mG$)_n (SEQ ID NO:123) и ($GGGS_m$)_n (SEQ ID NO:124), и их комбинации, где m, n, и o каждый независимо выбраны из целого числа от по меньшей мере 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. Иллюстративные гибкие линкеры включают, но не ограничиваясь указанным далее, $GGSG$ (SEQ ID NO:21), $GGSGG$ (SEQ ID NO:22), $GSGSG$ (SEQ ID NO:23), $GSGGG$ (SEQ ID NO:24), $GGGSG$ (SEQ ID NO:25) и $GSSSG$ (SEQ ID NO:26).

[00220] Дополнительные гибкие линкеры включают полимеры глицина (G)_n или полимеры глицин-серина (например, (GS)_n, ($GSGGS$)_n (SEQ ID NO:120), ($GGGS$)_n (SEQ ID NO:125) и ($GGGGS$)_n (SEQ ID NO:126), где n может быть равным 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, но не ограничиваясь указанным далее, $GGGS$ (SEQ ID NO:19), $GGGGS$ (SEQ ID NO:20), $GGSG$ (SEQ ID NO:21), $GGSGG$ (SEQ ID NO:22), $GSGSG$ (SEQ ID NO:23), $GSGGG$ (SEQ ID NO:24), $GGGSG$ (SEQ ID NO:25), и $GSSSG$ (SEQ ID NO:26). Мультимер (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 или 30-50) этих линкерных последовательностей может быть связан вместе с целью обеспечения гибких линкеров, которые могут быть использованы для конъюгирования гетерологичной аминокислотной последовательности с полипептидами, описанными в данном документе. Как описано в данном документе, гетерологичная аминокислотная последовательность может представлять собой сигнальную последовательность и/или партнер слияния, например, альбумин, Fc-последовательность и т. п.

[00221] Примеры линкеров включают, например, (GGGGS)_n (SEQ ID NO:126), где n представляет собой целое число от 1 до около 10 (например, n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); GGGSGGGSIEGR (SEQ ID NO:48); GGGGG (SEQ ID NO:27); EGGGS (SEQ ID NO:28).

[00222] 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*.

[00223] Например, протеолитически расщепляемый линкер может содержать сайт расщепления металлопротеиназы матрикса (MMP), например, сайт расщепления MMP, выбранный 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). Расщепление последовательности MMP-9 представляет собой Pro-X-X-Hy (где X представляет собой произвольный остаток; Hy - гидрофобный остаток) (SEQ ID NO:29), например, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO:30), например, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO:31) или Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO:32). Еще один пример сайта расщепления протеазы представляет собой сайт расщепления активатора плазминогена, например, uPA или сайт расщепления тканевого активатора плазминогена (tPA). Конкретные примеры расщепления последовательностей uPA и tPA включают последовательности, содержащие Val-Gly-Arg. Еще одним примером является сайт расщепления тромбина, например, CGLVPAGSGP (SEQ ID NO:33). Дополнительные подходящие линкеры, содержащие сайты расщепления протеаз, включают линкеры, содержат одну или более из следующих аминокислотных последовательностей: 1) SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO:34) или SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO:35), расщепляемые катепсином В; SKLVQASASGVN (SEQ ID NO:36) или SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO:37), расщепляемые протеазой вируса Эпштейна-Барр; RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO:38) расщепляемую MMP-3 (стромелизином); SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO:39) расщепляемую MMP-7 (матрилизинном); SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO:40) расщепляемую MMP-9; DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO:41) расщепляемую термолизин-подобной MMP; SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO:42) расщепляемую металлопротеиназой матрикса 2(MMP-2); SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO:43) расщепляемую катепсином L; SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO:44) расщепляемую катепсином D; SLGPQGIWGQFN (SEQ ID NO:45) расщепляемую металлопротеиназой матрикса 1(MMP-1); KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO:46) расщепляемую

активатором плазминогена урокиназного типа; PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO:47) расщепляемую металлопротеиназой матрикса 1 мембранного типа (MT-MMP); HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT (SEQ ID NO:94) расщепляемую стромелизином 3 (или MMP-11), термолизином, коллагеназой фибробластов и стромелизином-1; GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO:49) расщепляемую металлопротеиназой матрикса 13 (коллагеназой-3); GGSGQRGRKALE (SEQ ID NO:50) расщепляемую активатором плазминогена тканевого типа (tPA); SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO:51) расщепляемую простатоспецифическим антигеном человека; SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO:52) расщепляемую калликреином (hK3); SLLGIAVPGNFN (SEQ ID NO:53) расщепляемую эластазой нейтрофилов; и FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO:54) расщепляемую калпаином (кальций-активируемой нейтральной протеазой).

[00224] В дополнение к специфическим аминокислотным и нуклеотидным последовательностям, представленным в данном документе, описание также предусматривает полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие последовательности, которые на по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентичны последовательности аминокислоты и нуклеиновых кислот. 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 имеют 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 заданного участка) при сравнении и выравнивании с учетом максимального соответствия на заданном участке. Раскрытие специально предусматривает первый и второй полипептид, присутствующий в комплексе, первый полипептид и второй полипептид, имеющие аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, или по меньшей мере 99 % идентичной последовательности аминокислотной последовательности первого и второго полипептида, соответственно, пар первого и второго полипептида, представленных в данном документе.

Способы получения полипептидов

[00225] Полипептид по данному описанию можно получить любым подходящим способом, в том числе с использованием рекомбинантных и нерекомбинантных способов (например, химического синтеза).

А. Химический синтез

[00226] Если полипептид является химически синтезированным, синтез может идти в жидкой или твердой фазе. Твердофазный синтез пептидов (ТФСФ) позволяет включать не природные аминокислоты и/или модификации каркаса пептида/белка. Для синтеза полипептидов согласно данному описанию доступны различные формы ТФСФ, например, Fmoc и Boc. Подробности химического синтеза известны 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).

В. Рекомбинантная продукция

[00227] Когда полипептид производят с использованием рекомбинантных методик, полипептид может быть получен в виде внутриклеточного белка или в виде секретируемого белка, с использованием любой подходящей конструкции и любой подходящей клетки-хозяина, которая может быть прокариотической или эукариотической клеткой, такой как бактериальная (например, *E. coli*) или дрожжевая клетка-хозяин, соответственно. Другие примеры эукариотических клеток, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, включают клетки насекомых, клетки млекопитающих и/или клетки растений. В случае, когда используются клетки млекопитающих, они также могут включать в себя человеческие клетки (например, клетки HeLa, 293, H9 и Jurkat); мышинные клетки (например, NIH3T3, L клетки, и клетки C127); клетки приматов (например, Cos 1, Cos 7 и CV1) и клетки китайского хомячка (например, клетки яичников китайского хомячка (СНО). В конкретных вариантах реализации изобретения, полипептид и комплексы, содержащие полипептид, продуцируют в клетках СНО. В других вариантах реализации изобретения, полипептид и комплексы, содержащие полипептид, продуцируют в клетках дрожжей, и в конкретных вариантах реализации изобретения с помощью генной инженерии можно получить клетки дрожжей, продуцирующие гликопротеины с N-гликанами, аналогичными N-гликанам млекопитающих.

[00228] Различные системы хозяин-вектор, пригодные для экспрессии полипептида, можно использовать в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. См., например, Sambrook и др., 1989 *Current Protocols in Molecular Biology* Cold Spring Harbor Press, New York; и Ausubel и др., 1995 *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Wiley and Sons. Способы введения генетического материала в клетки-хозяев включают, например, трансформацию, электропорацию, конъюгацию, способы 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.

[00229] Векторы могут существовать экстрахромосомно в клетке-хозяине или интегрироваться в геном клетки-хозяина. Экспрессирующий вектор содержит регуляторные последовательности транскрипции и трансляции и может обеспечить индуцибельную или конститутивную экспрессию, где кодирующий участок функционально связан и находится под транскрипционным контролем участка инициации транскрипции, и участка терминации транскрипции и трансляции. В целом, регуляторные последовательности транскрипции и трансляции могут включать, но не ограничиваясь указанным далее, последовательности промоторов, сайты связывания рибосом, последовательности инициации и прекращения транскрипции, последовательности инициации и прекращения трансляции и последовательности энхансеров или активаторов. Промоторы могут быть либо конститутивными, либо индуцибельными, а также могут быть сильными конститутивными промоторами (например, T7).

[00230] Экспрессирующие конструкции обычно содержат удобные сайты рестрикции, расположенные вблизи последовательности промотора для обеспечения встраивания нуклеотидных последовательностей, кодирующих исследуемые белки. Селективный маркер, работающий в экспрессирующем хозяине, может присутствовать для 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 осуществлять экспрессию в организмах, например, в клетках млекопитающих или насекомых и клонирование и амплификацию в

прокариотическом хозяине. 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.

[00231] Выделение и очистку белка можно выполнить в соответствии со способами, известными в данной области техники. Например, белок можно выделить из лизата клеток, генетически модифицированных для конститутивной и/или индуцибельной экспрессии белка; из культуральной среды, в которой клетка-хозяин была выращена; или из синтетической реакционной смеси, с помощью аффинной очистки, которая может включать в себя контактирование образца (лизата клеток, культуральной среды или реакционной смеси) с меткой, которая специфически связывается с белком, с последующим промыванием для удаления неспецифически связанного материала, и элюированием специфически связанного белка. Выделенный белок можно дополнительно очистить с помощью диализа и других способов, обычно используемых при способах очистки белка. В одном варианте реализации изобретения белок можно выделить с использованием способов металлохелатной хроматографии. Белки могут содержать модификации, облегчающие выделение. В определенных вариантах реализации изобретения, комплексы по данному описанию могут быть разделены в зависимости от размера.

[00232] В определенных вариантах реализации изобретения, комплекс, содержащий первый полипептид и второй полипептид, первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит СН3 последовательность, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит СН3 последовательность, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; где первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, где либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, может быть выделен из среды, в которой культивируется клетка-хозяин, экспрессирующая первый и второй полипептиды.

[00233] В определенных вариантах реализации изобретения, комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер, каждый из первого и второго гетеродимеров,

содержат первый полипептид и второй полипептид, первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; где первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, где либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, где мутеин GDF15 в первом гетеродимере димеризуется с мутеином GDF15 во втором гетеродимере, тем самым формируя комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер, может быть выделен из среды, в которой культивируется клетка-хозяин, экспрессирующая первый и второй полипептиды.

[00234] Как отмечается в данном документе, первая и вторая нуклеиновые кислоты могут присутствовать в одном векторе или отдельных векторах в одной клетке-хозяине или двух разных клетках-хозяевах. В определенных случаях, первый и второй полипептиды данного описания могут быть кодированы с помощью первой и второй нуклеиновых кислот, соответственно, которые могут быть экспрессированы в одной и той же клетке. В вариантах реализации изобретения, где первая и вторая нуклеиновые кислоты присутствуют в разных клетках, клетки могут быть слиты в какой-то момент времени в процессе производства.

[00235] Комплексы можно получить практически в чистом виде или в выделенной форме (например, не содержащей других полипептидов). Комплексы могут присутствовать в композиции, обогащенной комплексами по отношению к другим компонентам, которые могут присутствовать в ней (например, другими полипептидами полипептидам или другими комплексами (например, гомодимерами, гомотетрамерами) или другим компонентам клетки-хозяина). Например, очищенный комплекс (например, гетеродимер-гетеродимерный комплекс) можно получить таким образом, что комплекс присутствует в композиции, которая практически не содержит других экспрессированных белков, например, менее чем 90 %, менее чем 60 %, менее чем 50 %, менее чем 40 %, менее чем 30 %, менее чем 20 %, менее чем 10 %, менее чем 5 % или менее чем 1 % композиции состоит из других экспрессированных белков.

Антитела

[00236] В данном описании предложены антитела, в том числе выделенные антитела, которые специфически связывают полипептид или слитый белок согласно данному описанию. Термин "антитело" охватывает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные из по меньшей мере двух интактных антител, и связывающие фрагменты антител, включая Fab и F(ab')₂, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. Простейшая структурная единица целого антитела содержит тетрамер, и каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" цепь (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Амино-концевая область каждой цепи содержит вариабельный участок от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственный за распознавание антигена. Напротив, карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константный участок, главным образом ответственный за эффекторную функцию. Легкие цепи человека подразделяются на каппа и лямбда, в то время как тяжелые цепи человека подразделяются на мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD 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 и одноцепочечные антитела.

[00237] На одном конце каждой тяжелой цепи находится вариабельный домен (VH), а затем - ряд константных доменов. На одном конце каждой легкой цепи находится вариабельный домен (VL), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи. В пределах легкой и тяжелой цепи вариабельные и константные участки соединяются с помощью "J" участка из около 12 или более аминокислот, с тяжелой цепью также содержащей "D" участок из около 10 или более аминокислот. Все цепи антитела обладают аналогичной общей структурой относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, также называемыми "участками, определяющими комплементарность", или "CDR". CDR из двух цепей каждой пары выровнены с помощью каркасных участков, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к

С-концу как тяжелые, так и легкие цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[00238] Интактное антитело имеет 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 получать различными способами, в том числе посредством слияния гибридом или связывания фрагментов Fab'.

[00239] Как указано выше, связывающие фрагменты можно получить путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Расщепление антител ферментом папаином приводит к получению двух идентичных антиген-связывающих фрагментов, также известных как "Fab"-фрагменты, и "Fc"-фрагмента, не обладающего антигенсвязывающей активностью. Расщепление 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.

[00240] Используемый в данном документе, термин "Fab" относится к фрагменту антитела, содержащему VH- и VL-участки, а также константный домен легкой цепи и CH1-домен тяжелой цепи.

[00241] Используемый в данном документе, термин "Fv" относится к минимальному фрагменту антитела, которое сохраняет как антигенраспознающий, так и антигенсвязывающий сайты. В двуцепочечных разновидностях Fv этот участок 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 сайта 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.

[00242] Используемый в данном документе, термин "участки, определяющие комплементарность" или "CDR" относится к частям иммунологических рецепторов, контактирующих со специфическим лигандом и определяющих его специфичность.

[00243] Термин "гипервариабельный участок" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельный участок обычно содержит аминокислотные остатки из CDR и/или остатки из «гипервариабельной петли».

[00244] Используемый в данном документе, термин «эпитоп» относится к антителосвязывающим 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. Большая константа равновесия (" K_D ") означает меньшее сродство между эпитопом и антителом, в то время как меньшая 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 сильнее. Тогда 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.

[00245] Термин "селективно связывается" по отношению к антителу еще не означает, 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 единственным эпитопом.

[00246] При введении в организм человека антитела, которые содержат вариабельные 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. Для того 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 данном документе, антитела "человека" и "полностью человеческие" антитела можно использовать как взаимозаменяемые. Термин "полностью человеческое" можно использовать при определении антител, которые являющихся лишь частично человеческими, в отличии от полностью человеческих антител. Опытному специалисту известно о различных способах получения полностью человеческих антител.

[00247] Для того чтобы не допустить возможного ответа организма человека на антитела мыши, можно использовать химерные или иным образом гуманизированные антитела. Химерные антитела содержат константный участок, характерный для человека, и переменный участок, характерный для мыши, и поэтому у некоторых пациентов может наблюдаться ответ на химерные антитела человека. Таким образом, целесообразно получить полностью человеческие антитела против мультимерных ферментов во избежание возможного ответа организма человека на антитела мыши или химерные антитела.

[00248] Полностью человеческие моноклональные антитела можно получить, например, путем образования линий гибридомных клеток с помощью способов, известных специалисту в данной области техники. Другие способы получения предполагают использование последовательностей, кодирующих специфические антитела для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающего, например, клетки СНО. Трансформацию можно осуществить любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, включая, например, упаковку полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукции клетки-хозяина с 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 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, но не ограничиваясь указанным далее, клетки СНО, клетки HeLa и клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека.

[00249] Антитела могут быть использованы для обнаружения полипептида согласно данному описанию. Например, антитела можно использовать в качестве диагностического средства посредством обнаружения уровня одного или более из полипептидов согласно

данному описанию у субъекта, и сравнения обнаруженного уровня со стандартным контрольным уровнем или с исходным уровнем в организме субъекта, определенным ранее (например, до заболевания).

Терапевтическое и профилактическое применение

[00250] Данное изобретение обеспечивает способы лечения или профилактики метаболических и ассоциированных с метаболизмом заболеваний, например, ожирения и других расстройств массы тела, гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушения переносимости глюкозы, а также расстройств метаболизма глюкозы, путем введения комплекса данного описания или его композиций, описанных в данном документе. Такие способы также могут оказывать благоприятное воздействие на один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или состоянием, например, снижая тяжесть или частоту проявлений симптома.

[00251] Чтобы определить, является ли субъект кандидатом для лечения или профилактики расстройства массы тела (например, ожирения) с помощью способов, представленных в данном документе, следует выполнить оценку таких параметров, как, но не ограничиваясь указанным далее, этиология и степень состояния субъекта (например, насколько избыточна масса тела субъекта по сравнению со здоровым индивидом). 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 данном документе, комплекс согласно данному изобретению могут подавлять аппетит, например, снижать аппетит, приводя к снижению массы тела.

[00252] Чтобы определить, является ли субъект 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 данного документа (например, оценку уровня глюкозы в плазме натощак (FPG) и пероральный тест переносимости глюкозы (oGTT)).

[00253] Комплексы, предусмотренные в данном документе, при введении субъекту для лечения или профилактики метаболических и ассоциированных с метаболизмом

заболеваний, например, ожирения и других расстройств массы 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.

[00254] В определенных вариантах реализации изобретения, комплексы, 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 комплексов. Например, комплексы, рассматриваемые в данном 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.

[00255] В определенных вариантах реализации изобретения, комплекс по данному изобретению, который используют для лечения метаболического нарушения, может быть комплексом, который содержит две молекулы гетеродимера на комплекс, где каждый гетеродимер является одинаковым, и содержит первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид содержит Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG может содержать последовательность СН3, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СН3, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида формируя гетеродимер, причем либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида в каждом гетеродимере конъюгирован с N-концом мутеина GDF15, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, причем мутеин GDF15 в гетеродимере димеризуется с мутеином GDF15 в другом гетеродимере, тем самым формируя комплекс, содержащий два гетеродимера.

[00256] В других вариантах реализации изобретения, комплекс по данному изобретению, который используют для лечения метаболического нарушения, может быть комплексом, который содержит две молекулы гетеродимера (гетеродимер, связанный с гетеродимером) на комплекс, где каждый гетеродимер является одинаковым, и каждый гетеродимер содержит первый полипептид, имеющий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность

IgG может содержать последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание, где С-конец первого полипептида слит с N-концом гликомутеина GDF15; и второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом посредством позиционирования выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, формируя гетеродимер, причем мутеин GDF15 в гетеродимере димеризуется с мутеином GDF15 в другом гетеродимере, тем самым формируя комплекс, содержащий два гетеродимера.

Фармацевтические композиции

[00257] Комплексы по данному описанию могут находиться в виде композиций, пригодных для введения субъекту. В целом, такие композиции представляют собой «фармацевтические композиции», содержащие один или более из комплексов и один или более из фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых разбавителей, носителей или вспомогательных веществ. В определенных вариантах реализации изобретения, комплексы присутствуют в терапевтически эффективном количестве в фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции можно использовать в способах согласно данному описанию; так, например, фармацевтические композиции можно вводить *ex vivo* или *in vivo* субъекту с целью осуществления терапевтических и профилактических способов и способов, описанных в данном документе. Как отмечено в данном документе, комплексы могут быть или могут не быть гликозилированы. Например, комплексы могут быть гликозилированы, в процессе продукции эукариотической клетке-хозяине, и могут быть подвергнуты процессу удаления углеводного фрагмента до внесения в фармацевтическую композицию. Удаление углеводных фрагментов может привести к значительному снижению гликозилирования полипептидов в комплексах или полному отсутствию гликозилирования полипептидов в комплексах.

[00258] В конкретных вариантах реализации изобретения, данное описание обеспечивает способы лечения расстройства метаболизма глюкозы или массы тела путем введения комплексов, N-гликозилированных комплексов или их композиций. В конкретном варианте реализации изобретения, данное описание обеспечивает способы снижения потребления пищи или уменьшения массы тела путем введения комплексов, N-гликозилированных

комплексов или их композиций. Данное описание дополнительно обеспечивает использование вышеуказанных последовательностей, комплексов, N-гликозилированных комплексов или их композиций при производстве лекарственного средства для применения в лечении 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. Данное описание дополнительно обеспечивает использование вышеуказанных последовательностей, комплексов, N-гликозилированных комплексов или их композиций при производстве лекарственного средства для применения в лечении расстройств метаболизма глюкозы и массы тела. Данное описание дополнительно обеспечивает использование вышеуказанных последовательностей, комплексов, N-гликозилированных комплексов или их композиций при производстве лекарственного средства применимого для снижения потребления пищи или массы тела.

[00259] Также представлены в данном документе композиции, например, фармацевтические композиции последовательностей, комплексов и N-гликозилированных комплексов, описанные в данном документе, для лечения или предотвращения состояний, связанных с некоторыми метаболическими и ассоциированными с заболеваниями метаболизма заболеваний, например, ожирения и других расстройств массы тела, гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушения переносимости глюкозы и расстройств метаболизма глюкозы. Данное описание дополнительно обеспечивает композицию (например, фармацевтическую композицию) из вышеуказанных последовательностей, комплексов, N-гликозилированных комплексов для лечения расстройств метаболизма глюкозы и массы тела. Данное описание дополнительно обеспечивает композицию (например, фармацевтическую композицию) из вышеуказанных последовательностей, комплексов, N-гликозилированных комплексов для снижения потребления пищи или массы тела.

[00260] Фармацевтические композиции по данному описанию могут быть составлены с учетом совместимости с предполагаемым способом или путем введения; типичные пути введения изложены в данном документе. Кроме того, фармацевтические композиции можно использовать в комбинации с другими терапевтически активными агентами или соединениями (например, агентами, снижающими уровень глюкозы), описанными в данном

документе, с целью лечения или профилактики заболеваний, расстройств и состояний, рассматриваемых в данном описании.

[00261] Фармацевтические композиции обычно содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из комплексов, рассматриваемых в данном изобретении, и один или более из фармацевтически и физиологически приемлемых агентов для получения состава. Соответствующие фармацевтически или физиологически приемлемые разбавители, носители или наполнители включают, но не ограничиваясь указанным далее, антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и бисульфит натрия), консерванты (например, бензиловый спирт, метилпарабены, этил или n-пропил, p-гидроксibenзоат), эмульгирующие агенты, суспендирующие агенты, диспергирующие агенты, растворители, наполнители, объемообразующие агенты, детергенты, буферы, несущие среды, разбавители и/или вспомогательные вещества. Например, подходящий носитель может представлять собой физиологический солевой раствор или цитрат-солевой буфер, возможно, с добавлением других материалов, часто встречающихся в фармацевтических композициях для парентерального введения. Нейтральный солевой буферный раствор или физиологический раствор, смешанные с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные типичные носители. Специалисты в данной области техники могут легко распознавать различные буферы, которые можно использовать в фармацевтических композициях и лекарственных формах. Типичные буферы включают, но не ограничиваясь указанным далее, фармацевтически приемлемые слабые кислоты, слабые основания или их смеси. 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, буфер Трис, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), натриевую соль 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), 3-(N-морфолино) пропансульфоновую кислоту (MOPS) и N-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновую кислоту (СТА).

[00262] 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, или другой приемлемой формы. В некоторых вариантах реализации изобретения предложена фармацевтическая композиция в одноразовом контейнере (например, одноразовом флаконе, ампуле, шприце или автоматическом инжекторе (например, EpiPen®)), в то время как в других вариантах реализации изобретения предложен многоразовый контейнер (например, многоразовый флакон). Для доставки комплексов можно использовать любой аппарат 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 комплексов, описанных в данном 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 данном документе. Специалист в данной области техники должен быть знаком с возможными составами и вариантами применения инъекций веществ замедленного всасывания.

[00263] Фармацевтические композиции могут находиться в форме стерильной водной 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 парентерального применения разбавителе или растворителе, например, как раствор в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и диспергирующие среды, которые можно использовать, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, Cremophor EL™ (BASF, Парсипанни, штат Нью-Джерси, США) или фосфатный буферный солевой раствор (PBS), этанол, полиол (например, 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).

[00264] Фармацевтические композиции, содержащие активный ингредиент (например, комплексы по данному описанию), могут находиться в форме, пригодной для перорального применения, например, таблеток, капсул, пастилок, леденцов, водных 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.

[00265] 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, полиэфиры, 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 патенте США № 4235871, 4501728 и 4837028. Способы получения вышеупомянутых составов понятны для специалистов в данной области техники.

[00266] 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.

[00267] 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.

[00268] 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.

[00269] 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 данном документе.

[00270] Фармацевтические композиции по данному описанию 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 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.

[00271] Составы также могут содержать носители для защиты композиции от быстрого 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.

[00272] Данное описание предусматривает введение комплексов 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, высвобождая лекарственное вещество. Такие материалы включают, но не ограничиваясь ими, масло какао и полиэтиленгликоли.

[00273] Комплексы, рассматриваемые в данном описании, могут находиться в форме любой другой подходящей фармацевтической композиции (например, спреев для назального

или ингаляционного применения), известной в настоящее время или разработанной в будущем.

[00274] Концентрация комплекса полипептидов 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) и обычно выбирается главным образом с учетом объема жидкости, вязкости и факторов, зависящих от субъекта, в соответствии с, например, конкретным выбранным способом введения.

[00275] В данном 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 определенных вариантах реализации изобретения, комплекс(ы), описанный в данном документе, может представлять собой состав с мембраной. Например, можно пропитать мембрану комплексом или окружить мембраной. Мембрана может иметь форму диска, трубки или шара. В определенных вариантах реализации изобретения, трубка может представлять собой нанотрубку, или шар может представлять собой наносферу.

Пути введения

[00276] В данном описании рассматривается введение описанных комплексов и их композиций любым подходящим способом. Подходящие пути введения включают парентеральный (например, внутримышечный, внутривенный, подкожный (например, впрыскивание или использование имплантата), внутрибрюшинный, интрацистеральный, внутрисуставной, внутрибрюшинный, внутрицеребральный (интрапаренхиматозный и интрацеребровентрикулярный), оральный, назальный, вагинальный, сублингвальный, внутриглазный, ректальный, местный (например, трансдермальный), сублингвальный и ингаляционный.

[00277] Инъекции веществ замедленного всасывания, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, можно также использовать для высвобождения комплексов, описанных в данном 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 данном документе. Специалист в данной области техники должен быть знаком с возможными составами и вариантами применения инъекций веществ замедленного всасывания.

[00278] Что касается антител, в типичном варианте реализации антитело или фрагмент антитела согласно данному описанию 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 изобретения, антитело вводят путем внутривенного вливания в течение от 15 минут до 2 часов. В других вариантах реализации изобретения, процедуру введения осуществляют путем подкожной болюсной инъекции.

[00279] Данное описание предусматривает способы, в которых комплексы по данному описанию вводят субъекту по меньшей мере два раза в день, по меньшей мере раз в день, по меньшей мере один раз каждые 48 часов, по меньшей мере один раз каждые 72 часа, по меньшей мере раз в неделю, по меньшей мере раз в 2 недели или по меньшей мере раз в месяц.

Комбинированная терапия

[00280] Данное описание предусматривает использование комплекса, предоставленного в данном документе, 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.

[00281] Как используется в данном документе, термин «комбинация» подразумевает включение терапевтических средств, которые можно вводить по отдельности, например, в разных составах для раздельного введения (например, они могут быть представлены в комплекте) и терапевтических средств, которые можно вводить совместно в одном составе (например, «совместном составе»).

[00282] В определенных вариантах реализации изобретения, комплекс вводят или применяют последовательно, например, когда один агент вводят до одного или более других агентов. В других вариантах реализации изобретения, комплекс 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 данного описания.

[00283] Комплексы согласно данному описанию можно применять в комбинации с другими агентами, полезными для лечения, профилактики, подавления или облегчения заболеваний, расстройств или состояний, изложенных в данном документе, включая вещества, которые обычно вводят субъектам, страдающим от ожирения, расстройства пищевого поведения, гипергликемии, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы и других расстройств метаболизма глюкозы.

[00284] Данное описание предусматривает комбинированную терапию с многочисленными агентами (и их классами), включая 1) инсулин, миметики инсулина и агенты, которые влекут за собой стимуляцию секреции инсулина, включая сульфонилмочевины (например, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, толбутамид, глибурид, глимепирид, глипизид) и меглитиниды (например, репаглинид (ПРАНДИН) и натеглинид (СТАРЛИКС)); 2) например, метформин (ГЛЮКОФАЖ)) и его фармацевтически приемлемые соли, в частности, гидрохлорид метформина и его препараты с длительным высвобождением, такие как Glumetza™, Fortamet™ и GlucophageXR™, и другие агенты, которые действуют путем стимулирования утилизации глюкозы, сокращая производства глюкозы в печени и/или уменьшая выработку глюкозы в кишечнике; 3) ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, воглибоза и миглитол) и другие агенты, которые замедляют пищеварение углеводов и, следовательно, всасывание из кишечника и уменьшают постпрандиальную гипергликемию; 4) тиазолидиндионы (например, росиглитазон

(АВАНДИЯ), троглитазон (РЕЗУЛИН), пиоглитазон (АКТОС), глипизид, балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, AMG 131, MBX2044, митоглитазон, лобеглитазон, IDR-105, троглитазон, энглитазон, циглитазон, адаглитазон, дарглитазон, которые усиливают действие инсулина (например, путем сенсibilизации инсулина), включая инсулин и миметики инсулина (например, инсулин деглюдек, инсулин гларгин, инсулин лизпро, инсулин детемир, инсулин глулизин и ингаляционные составы каждого), способствуя тем самым утилизации глюкозы в периферических тканях; 5) глюкагон-подобные пептиды, включая ингибиторы DPP-IV (например, алоглиптин, омариглиптин, линаглиптин, вилдаглиптин (ГАЛВУС) и ситаглиптин (ЯНУВИЯ)) и Глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) и GLP-1 агонисты и аналоги (например, эксенатид (БАЕТА и ИТСА 650 (осмотический насос, вставляемый подкожно, которая поставляет аналог экзенатида в течение 12-месячного периода; Intarcia, Бостон, Массачусетс)) и агонисты рецептора GLP-1 (например, дулаглутид, семаглутид, албиглутид, эксенатид, лираглутид, ликсисенатид, таспоглутид, CJC-1131 и BIM-51077, включая их интраназальные, трансдермальные и применяемые раз в неделю составы); 6) и DPP-IV-устойчивые аналоги (миметики инкретина), PPAR гамма-агонисты, PPAR альфа агонисты, такие как производные фенофибриновой кислоты (например, гемфиброзил, клофибрат, ципрофибрат, фенофибрат, безафибрат), агонисты PPAR двойного действия (например, ZYH2, ZYH1, GFT505, чиглитазар, мураглитазар, алеглитазар, соделглитазар и навеглитазар), рап-действующие агонисты PPAR, ингибиторы PTP1B (например, ISIS-113715 и TTP814), ингибиторы SGLT (например, ASP1941, SGLT-3, эмпаглифлозин, дапаглифлозин, канаглифлозин, BI-10773, PF-04971729, ремоглифлозин, TS-071, тофоглифлозин, ипраглифлозин и LX-4211), стимуляторы секреции инсулина, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (например, алацеприл, беназеприл, каптоприл, церонаприл, цилазаприл, делаприл, эналаприл, эналаприлат, фосиноприл, имидаприл, лизиноприл, мовелтиприл, периндоприл, квинаприл, рамиприл, спираприл, темокаприл или трандолаприл), ангиотензин II антагонистов рецепторов (например, лосартан т. е., КОЗААР®, валсартан, кандесартан, олмесартан, телмесартан и любой из этих препаратов, используемый в комбинации с гидрохлоротиазидом, таким как ГИЗААР®) или другие антигипертензивные препараты, такие как LCZ 696, агонисты RXR, ингибиторы гликоген синтазы киназы-3, иммуномодуляторы, симпатолитики, бета-адреноблокирующие препараты (например, пропранолол, атенолол, бисопролол, карведилол, метопролол или метопролол тартат), альфа-адреноблокирующие препараты (например, доксазоцин, празоцин или альфа

метилдопа) центральные альфа-адренергические агонисты, периферические вазодилататоры (например, гидралазин); бета-3-агонисты адренергических рецепторов, ингибиторы 11бета-HSD1, ингибиторы нейтральной эндопептидазы (например, тиорфан и фосфорамидон), антагонисты альдостерона, ингибиторы синтазы альдостерона, ингибиторы ренина (например, производные мочевины из ди- и три-пептидов (см. патент США № 5116835), аминокислоты и производные (патенты США № 5095119 и 5104869), аминокислотные цепочки, связанные с помощью непептидных связей (патент США № 5114937), производные ди- и три-пептидов (патент США № 5106835), пептидил-амино-диолы (патенты США № 5063208 и 4845079) и пептидил бета-аминоацил аминокдиола карбаматы (патент США № 5089471); а также множество других пептидных аналогов, как описанные в следующих патентах США № 5071837; 5064965; 5063207; 5036054; 5036053; 5034512 и 4894437, и малые молекулы ингибиторов ренина (включая диол сульфаниламиды и сульфенилы (патент США № 5098924), N-морфолино производные (патент США № 5055466), N-гетероциклические спирты (патент США № 4885292) и пирролимидазолы (патент США № 5075451); также, производные пепстатина (патент США № 4980283) и фтор- и хлор-производные статон-содержащих пептидов (патент США № 5066643), эналкреин, 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-диизопропил-8-[4-метокси-3-(3-метоксипропокси)-фенил]-октанамида гемифумарат) SPP600, SPP630 и SPP635), антагонисты рецепторов эндотелина, ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (например, силденафил, тадалфил и варденафил), вазодилататоры, блокаторы кальциевых каналов (например, амлодипин, нифедипин, верапармил, дилтиазем, галлопамил, нилудипин, нимодипины, никардипин), активаторы калиевых каналов (например, никорандил, пинацидил, кромакалим, миноксидил, априлкалим, лопразолам), гиполипидемические агенты, например, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, такие как симвастатин и ловастатин, которые продаются как ЗОКОР® и МЕВАКОР® в форме лактон про-лекарства, и функционирующие как ингибиторы после введения, и их фармацевтически приемлемые соли дигидрокси открытого кольца кислотных ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы, такие как аторвастатин (в частности, соли кальция, реализованные в ЛИПИТОР®), розувастатин (в частности, соли кальция, реализованные в КРЕСТОР®), правастатин (в частности, соли натрия, реализованные в ПРАВАХОЛ®), церивастатин и флувастатин (в частности, соли натрия, реализованные в ЛЕСКОЛ®); ингибитор абсорбции холестерина, такой как эзетимиб (ЗЕТИА®) и эзетимиб в комбинации с любыми другими

гиполипидемическими агентами, такими как ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, отмеченные выше, и особенно с применением симвастатина (ВИТОРИН®) или аторвастатина кальция; ЛВП-повышающие препараты (например, агонисты рецепторов ниацина и никотиновой кислоты, и их варианты с расширенным сроком высвобождения или контролируемым высвобождением, и/или с ингибитором ГМГ-КоА редуктазы; агонисты рецепторов ниацина, такие как аципимокс и ацифран, а также частичные агонисты рецепторов ниацина; антагонисты рецептора глюкагона (например, МК-3577, МК-0893, LY-2409021 и КТ6-971); связывающие желчные кислоты агенты (например, колестилан, колестимид, колесевалам гидрохлорид, колестипол, колестирамин и диалкиламиноалкил производные сшитого декстрана), ингибиторы ацил-КоА:холестерин ацетилтрансферазы (например, авасимиб); агенты, предназначенные для использования при воспалительных состояниях, таких как аспирин, нестероидные противовоспалительные препараты или НПВС, глюкокортикоиды и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 или ЦОГ-2; активаторы глюкокиназы (GKA) (например, AZD6370); ингибиторы 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы 1 типа (например, такие как те, что описаны в патенте США № 6730690 и LY-2523199); ингибиторы СЕТР (например, анацетрапиб, эвацетрапиб и торцетрапиб); ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы (например, такие как те, что описаны 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 формы соли вышеупомянутых активных агентов, где это химически возможно.

[00285] Кроме того, в данном описании 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.

[00286] Комплексы согласно данному описанию можно использовать в комбинации с одним или более из других агентов любым образом, соответствующим обстоятельствам. В одном варианте реализации изобретения, лечение с применением по меньшей мере одного активного агента и по меньшей мере одного комплекса согласно данному описанию поддерживают в течение определенного времени. В другом варианте реализации изобретения, лечение с применением по меньшей мере одного активного агента снижают или

прекращают (например, при стабильном состоянии субъекта), в то время как лечение с применением комплекса согласно данному описанию поддерживают без изменения схемы приема. В дополнительном варианте реализации изобретения, лечение с применением по меньшей мере одного активного агента уменьшают или прекращают (например, при стабильном состоянии субъекта), в то время как лечение с применением комплекса(ов) согласно данному описанию уменьшают (например, снижая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема). В еще одном варианте реализации изобретения, лечение с применением по меньшей мере одного активного агента уменьшают или прекращают (например, при стабильном состоянии субъекта), а лечение с применением комплекса согласно данному описанию усиливают (например, повышая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема). В еще одном варианте реализации изобретения, лечение с применением по меньшей мере одного активного агента поддерживают, а лечение с применением комплекса согласно данному описанию уменьшают или прекращают (например, снижая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема). В еще одном варианте реализации изобретения, лечение с применением по меньшей мере одного активного агента и лечение с применением комплекса согласно данному изобретению уменьшают или прекращают (например, снижая дозу, частоту приема или продолжительность схемы приема).

Дозирование

[00287] Комплексы согласно данному описанию 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 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.

[00288] В общем случае, параметры дозирования определяют, что доза в количественном отношении должна быть меньше количества, которое может быть необратимо токсичным для субъекта (т. е. максимально переносимой дозы, МПД) и не меньше количества, необходимого для измеримого влияния на субъект. Такие количества определяются, например, фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, связанными с поглощением, распределением, метаболизмом и выведением («ADME»), с учетом пути введения и других факторов.

[00289] Эффективная 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 желаемый эффект у 50 % популяции, которой 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. Таким образом, в некоторых ситуациях эффективное количество превышает расчетное значение ЭД₅₀, в других ситуациях эффективное количество составляет меньше расчетного значения ЭД₅₀, а в прочих ситуациях эффективное количество аналогично расчетному значению ЭД₅₀.

[00290] Кроме того, эффективная доза комплекса(ов) согласно данному описанию может представлять собой количество, которое при введении субъекту в виде одной или нескольких доз позволяет получить желаемый результат по сравнению со здоровым субъектом. Например, эффективная доза может быть одной из тех, которые при введении субъекту с повышенным уровнем глюкозы и/или инсулина в плазме позволяет достичь желаемого снижения по сравнению с уровнем у здорового субъекта на по меньшей мере около 10 %, по меньшей мере около 20 %, по меньшей мере около 25 %, по меньшей мере около 30 %, по меньшей мере около 40 %, по меньшей мере около 50 %, по меньшей мере около 60 %, по меньшей мере около 70 %, по меньшей мере около 80 % или более чем на 80 %.

[00291] Соответствующий уровень дозировки обычно будет составлять от около 0,001 до 100 мг/кг массы тела пациента в день, которые можно вводить в виде одной или нескольких доз. В некоторых вариантах реализации изобретения, уровень дозировки будет составлять от около 0,01 до около 25 мг/кг в день, а в других вариантах реализации изобретения - от около 0,05 до около 10 мг/кг в день. Подходящий уровень дозировки может составлять от около

0,01 до 25 мг/кг в день, от около 0,05 до 10 мг/кг в день, или от около 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.

[00292] 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 миллиграмм активного ингредиента. Комплекс(ы) можно вводить по схеме, например, от 1 до 4 раз в день, и, часто, один или два раза в день

[00293] Дозировку комплекса(ов) согласно данному описанию можно повторять с соответствующей частотой, которая может находиться в пределах от одного раза в день до одного раза каждый месяц, в зависимости от фармакокинетики комплекса (например, времени полужизни) и фармакодинамического ответа (например, продолжительности терапевтического эффекта комплекса). В некоторых вариантах реализации изобретения, прием часто повторяют от одного раза в неделю, одного раза в две недели, одного раза каждый месяц. В других вариантах реализации комплекс вводят приблизительно один раз в месяц.

[00294] В некоторых вариантах реализации изобретения доза описанного комплекса содержится в "единичной лекарственной форме". Фраза "единичная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, причем каждая единица содержит заданное количество комплекса по данному описанию, либо по отдельности, либо в комбинации с одним или более дополнительными агентами, достаточными для получения желаемого эффекта. Следует принимать во внимание, что параметры дозированной лекарственной формы зависят от конкретного агента и планируемого эффекта.

Наборы

[00295] В данном описании также рассматриваются наборы, содержащие описанный(е) комплекс(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 комплекса субъекту, нуждающемуся в снижении массы тела).

[00296] Набор может содержать один или более из комплекса(ов), описанного в данном документе (например, в стерильном контейнере), который может присутствовать в форме

фармацевтической композиции, пригодной для введения субъекту. Комплекс(ы) могут быть предоставлены в форме, готовой к применению, или в форме, требующей, например, восстановления или разбавления перед введением. Если комплекс(ы) находятся в форме, которая требует восстановления пользователем, набор может также содержать буферы, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и т. п., упакованные с комплексом(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 данному описанию может предусматривать условия, необходимые для надлежащего поддержания компонентов, размещенных в нем (например, охлаждение или замораживание).

[00297] 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.). 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 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

[00298] Этикетки или вкладыши могут дополнительно включать в себя, или быть присоединены к машиночитаемому носителю, такому как диск (например, жесткий диск, карта, карта памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнитная лента, или электрические носители, такие как RAM и ROM или их гибриды, такие как магнитные/оптические носители информации, флэш-носители или карты памяти. В некоторых вариантах реализации изобретения, инструкции фактически отсутствуют в наборе, однако предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника, например, сети Интернет.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

[00299] Следующие примеры представлены с целью обеспечить специалистов в данной области техники полным описанием способов реализации и применения данного 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.

[00300] 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 следующие: 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 = нанограмм; мкг = микрограмм; мг = миллиграмм; г = грамм; кг = килограмм; дл = децилитр; мкл = микролитр; мл = миллилитр; л = литр; мкМ = микромолярный; мМ = 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 натощак; FPI = уровень инсулина в плазме натощак; ITT = тест переносимости инсулина; РТТ = тест переносимости пирувата; оGTT = 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

[00301] Следующие способы и материалы были использованы в примерах, описанных ниже.

[00302] Животные. Самцов мышей C57BL/6J с алиментарным ожирением (The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) 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, подобную ожирению у человека, где ожирение основано на избыточном потреблении калорий. Мыши C57BL/6J склонны к ожирению, при котором наблюдается выраженное увеличение массы тела, а также гиперинсулинемия и иногда гипергликемия. Линия представляет собой наиболее часто используемую линию мышей для моделирования алиментарного ожирения. (Nilsson C. et al., *Acta Pharmacologica Sinica* (2012) 33:173-181).

[00303] Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислоты. Упомянутая кДНК OPC с номером доступа GenBankBC000529.2, кодирующая варианты GDF15 человека, и упомянутая аминокислотная последовательность с номером доступа GenBankNP_004855.2, кодирующаяся с помощью кДНК. кДНК для партнера Fc-слияния был приобретен в InvivoGen (pFUSE-CHIg-hG1, GenBank:AY623427.1, белок ID = AAT49050) и модифицирован как указано. Аминокислотная последовательность партнера Fc-слияния, кодирующаяся с помощью вектора pFUSE-CHIg-hG1, представляет собой:

[00304] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:55)

[00305] Конструирование экспрессионных конструктов. Экспрессионный вектор рТТ5 млекопитающих (National Research Council Canada) был модифицирован путем вставки элемента Козак и последовательности IgK-сигнального пептида человека: (CACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGA GGTGCCAGATGT) (SEQ ID NO:56) между сайтами PmeI и EcoRI. В то время как оба указанных сайта рестрикции были удалены, для дальнейшего клонирования в рамке считывания создали сайт AgeI. Для одиночной вставки фрагмента (например, Fc-части IgG1 человека) была использована технология In-Fusion (Clontech). Для вставки двух и более генерируемых ПЦР-фрагментов (т. е. hIgG1-Fc + GDF15) мы использовали Gibson Assembly

Master Mix (NEB) в соответствии с протоколами изготовителями. Все ПЦР фрагменты были амплифицированы с помощью ПЦР смеси Sapphire и очищены на геле с использованием набора Qiagen Gel Extraction. Электро-компетентные клетки TOP10 (Life Technologies), трансформированные в реакциях клонирования, высевали на чашки с LB-агаром, содержащим карбенициллин, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Отдельные колонии были собраны и проанализированы с помощью секвенирования. ДНК положительных колоний амплифицировали (ДНК-Maxi-prep, Qiagen), подтверждали с помощью полного секвенирования и использовали для трансфекции клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантного белка.

[00306] Для создания специфических мутеинов выполняли сайт-специфический мутагенез с использованием либо набора QuikChange Lightning или с набором QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis (Agilent) и соответствующих праймеров, следуя протоколам производителя.

[00307] (Fc/Fc)-GDF15 слитые молекулы, GDF15 дикого типа и экспрессия GDF15-гликомутеина. Все молекулы были извлечены из трансфицированных в клетках Expi 293F (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния). Клетки в рабочем порядке пересевали на среду для экспрессии Expi (Invitrogen) и поддерживали в виде суспензионных культур в колбах различного размера. Как правило, клетки пересевали при плотности клеток 5е5 жизнеспособных клеток/мл и выращивали в течение 3-х дней до пересева. Колбы держали в CO₂ инкубаторе с увлажнением (37 °C и 5 % CO₂) на шейкерных платформах New Brunswick (New Brunswick Scientific Company, Эдисон, Нью-Джерси) при скорости перемешивания 110 об/мин.

[00308] Трансфекцию выполняли по достижении плотности клеток в культуре, равной 2,5е6 жизнеспособных клеток/мл при более чем 95 % жизнеспособности. Как правило, для 50-мл трансфекции инокулировали 2,5е6 клеток/мл X 50 мл в 250-мл встряхиваемую колбу в объеме культуры 42,5 мл. Пятьдесят микрограмм (50 мкг) плазмидной ДНК, состоящей из экспрессирующего вектора, содержащего исследуемый ген, вначале разбавляли 2,5 мл восстановленной сывороточной среды OPTI-MEM (Invitrogen). Одновременно, реагент для трансфекции экспифектамин (Invitrogen) в 2,67-кратном объеме (количества плазмидной ДНК) также разбавляли в 2,5 мл восстановленной сывороточной среды OPTI-MEM. После 5 мин инкубирования при комнатной температуре разбавленный реагент для трансфекции медленно добавляли к разбавленной плазмидной ДНК для образования трансфекционных

компетентных комплексов. Еще через 20 мин инкубационного периода при комнатной температуре, 5 мл трансфекционных комплексов добавляли к 42,5 мл клеточной культуры. Затем трансфицированные клетки помещали в CO₂ инкубатор с увлажнением на орбитальный шейкер со скоростью перемешивания 110 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 CO₂ инкубатор с увлажнением на орбитальный шейкер. Через шесть-семь 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.

[00309] Очистка рекомбинантного белка. (Fc/Fc)-GDF15 молекулы, экспрессированные в кондиционированных средах (CM), оценивались для восстановления и активность после очистки. CM пропускали через мАт SelectSuRe колонку (GE) при нагрузочной способности не более чем 20 мг/мл смолы. Объемы CM колебались от 50 мл-1000 мл для оценки восстановления. После загрузки мАт SelectSuRe CM, колонку промывали 5-10 объемами колонки 1XPBS (Corning Cellgro) с последующей стадией элюирования буфером глицина с низким pH (Polysciences Inc). После элюирования, нейтрализовали pH пула (Fc/Fc)-GDF15 с 1М Трис pH 8,0 (Teknova), а затем вводили в колонку Superdex200 (GE) предварительно уравновешенную в 1XPBS (Corning Cellgro). Фракции интактных (Fc/Fc)-GDF15, полностью собранных молекул были объединены и проанализированы на чистоту и количественно оценены с помощью A280 способов с использованием соответствующего коэффициента ослабления и молекулярного веса для определения восстановления в зависимости от начальных объемов CM. Полностью собранные молекулы были димер-димерным комплексом из двух гетеродимеров. Каждый гетеродимер, имеющий Fc, связанный с Fc-GDF15 гликомутеином посредством взаимодействия выступа и впадины, и двух гетеродимеров, связанных через GDF15 – GDF15 взаимодействие.

[00310] Очистка GDF15 ДТ и GDF15 гликомутеинов. GDF15 дикого типа и GDF15 гликомутеины, не конъюгированные с Fc, были очищены от культуральной среды с использованием ионообменного захвата. GDF15 ДТ и GDF15 гликомутеины элюировали с использованием градиента соответствующей соли/pH, подходящего для оптимального элюирования и отделения от примесей белка клетки-хозяина. Все молекулы GDF15 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 невозстанавливающих условиях. Аналогично (Fc/Fc)-GDF15 молекулам, GDF15 дикого типа и GDF15 гликомутеины были экспрессированы с помощью сигнального пептида IgK.

Пример 1: Конструкция гетеродимерных выступ-во-впадину (Fc/Fc)-GDF15 слитых молекул

[00311] Конструкции Fc-GDF15 описаны на Фиг. 1 и первичные последовательности изображены ниже (конструкты B1a/b-B19a/b). Для достижения продуктивной сборки молекул Fc-GDF15, была разработана эффективная система для обеспечения димеризации Fc/Fc, допуская при этом димеризацию GDF15/GDF15. Для того, чтобы избежать неправильного сворачивания и агрегации потенциального одноцепочечного Fc-GDF15, был сконструирован гетеродимерный партнер слияния для Fc/Fc взаимодействия для обеспечения высокой точности GDF15/GDF15 гомодимеризации. Fc/Fc гетеродимеры выступ-во-впадину были сконструированы для адресной GDF15 сборки и секреции из Expi 293F транзientных систем. Fc/Fc гетеродимерные выступ-во-впадину системы оценивались с помощью [T366Y (выступ) // Y407T (впадина)] или [T366W (выступ) // T366S-L368A-Y407V (впадина)] системы, в сочетании с (G₄S)_n линкером (n=2, 3, 4 или 5) и GDF15. Следует отметить, что нумерация положений в аминокислоте в CH3 домене Fc основана на системе нумерации EC (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)). Во всех случаях, партнер Fc-слияния (выступ/впадина) был присоединен к N-концу зрелого GDF15, содержащего аминокислотные остатки A1-I112, R2-I112, N3-I112, G4-I112, D5-I112, H6-I112 или C7-I112. Усечения на N-конце GDF15 ($\Delta 1 = R2-I112$, $\Delta 2 = N3-I112$, $\Delta 3 = G4-I112$, $\Delta 4 = D5-I112$, $\Delta 5 = H6-I112$ или $\Delta 6 = C7-I112$), которые были включены для повышения устойчивости как последовательность на N-конце (ARNGDH, SEQ ID NO:95), ранее были продемонстрированы, как сайт протеолитической восприимчивости, и N-концевые усечения обеспечивают превосходную стабильность в сравнении с GDF15, который не содержит эти N-концевые усечения.

[00312] На Фиг. 1A–1D продемонстрировано расположение выступа по отношению к впадине в Fc-GDF15 (цепь A), в сочетании с соответствующей впадиной по отношению к выступу в гетеродимерном Fc-партнере (цепь B), в сочетании либо с шарниром IgG дикого типа, содержащего две межмолекулярные дисульфидные связи, или доменом без шарнира (Δ шарнир). Для Fc гетеродимерных выступа или впадины A/B цепей

мутация AA (APELLGGP (SEQ ID NO:96) → APALAGGP (SEQ ID NO:97)) была внесена для удаления функциональности эффектора IgG1. Гетеродимерные выступ-во-впадину (Fc/Fc)-GDF15 конструкции были экспрессионно профилированы для сборки и представлены на Фиг. 2A. Во всех случаях, транзистентная экспрессия выступ-во-впадину (Fc/Fc)-GDF15 приводит к восстановлению после очищения между 0 мг/л и 74,9 мг/л правильно собранного продукта (0 = агрегаты/без экспрессии, <25 мг/л, 25 мг/л - 49,9 мг/л, 50 мг/л - 74,9мг/л, 75 мг/л - 99,0 мг/л, >100 мг/л). Во всех случаях, сборка и секреция выступ-во-впадину гетеродимерных Fc/Fc-GDF15 молекул сопровождалась различными загрязняющими уровнями неправильно свернутых гетеродимерных видов таких как Fc(впадина):Fc(впадина), Fc(выступ):Fc(выступ), Fc(выступ)-GDF15:Fc(выступ)-GDF15 и Fc(впадина)-GDF15:Fc(впадина)-GDF15. Основываясь на определении профиля экспрессии, T366W (выступ) расположенный на Fc-GDF15 цепи, в сочетании с T366S-L368A-Y407V (впадина) на цепи гетеродимерного Fc партнера (Фиг. 1D), был найден для производства продукта с максимальной стабильностью и минимизированным неправильным спариванием Fc/Fc-гомодимерных продуктов (Фиг. 2A – вариант B5a/B5b). Эта конструкция была в центре дальнейшего конструирования экспрессии и оптимизации.

[00313] Вариант B5a/B5b, восстановленный из трансфицированных источников Expi 293F, представлял восстановления в диапазоне от 0,0 мг/л до 24,9 мг/л. Чтобы усилить экспрессию, сборку и восстановление, сайты N-гликозилирования были введены в зрелую последовательность GDF15 (Фиг. 1F). В сконструированных конструктах, наличие одного консенсусного сайта N-связанного гликана на GDF15 значительно улучшало экспрессию, сборку и восстановление полностью зрелых (Fc/Fc)-GDF15 выступ-во-впадину гетеродимеров B5a/B5b (Фиг. 2A – варианты B9a/B9b to B19a/B19b). Было установлено с помощью *in vitro* анализа, что длина линкера оптимальна, когда n=5 для (G₄S)_n для связывания и активности рецептора. Наличие гликана в положении D5T полностью удаляет первичный сайт дезамидирования в положении N3 зрелого GDF15 и появляется для дальнейшего повышения стабильности молекулы как было продемонстрировано в Примере 2.

[00314] Предполагается, что наличие N-связанных гликанов в последовательности GDF15 помогает экспрессии и минимизирует неправильное сворачивание продуктов накопления за счет увеличения времени пребывания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи в ходе секреторного процесса. Предполагается, что это дополнительное время пребывания

имеет положительный эффект на кинетику сворачивания и позволяет значительно улучшить гетеро-димерное (Fc/Fc) выступ-во-впадину сопряжение и извлечения из культуры тканей млекопитающих.

[00315] Последовательности вариантов (B1a/b-B19a/b) представлены ниже. В последовательностях, изображенных ниже, сигнальный пептид IgK человека находится в нижнем регистре, следующим за Fc-последовательностью. В последовательностях, которые также содержат линкер и GDF15 последовательность, Fc-последовательность следует за последовательностью линкера (подчеркнуто), которая следует за GDF15 последовательностью (жирный шрифт). Нумерация положений аминокислотных замен в Fc-последовательности основано на нумерации EC, замены со ссылкой на аминокислоту представлены в соответствующем положении IgG1Fc человека (SEQ ID NO:2). Нумерация N-концевой делеции в последовательности GDF15 и аминокислотных замен(ы) со ссылкой на зрелый GDF15 дикого типа человека (SEQ ID NO:1).

B1a:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366Y)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

[00316] mdmrvpaqlglglwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLG
WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
MVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID NO:57)

B1b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(Y407T)

[00317] mdmrvpaqlglglwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK (SEQ ID NO:58)

B2a:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(Y407T)- (G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

[00318] mdmrvpaqlglglwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

[00319] mdmrvpaqlglglllwlrgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:60)

[00320] mdmrvpaqlglglwlgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSFGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTG
VSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:61)

[00321] mdmrvpaqlgllllwlrgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:62)

[00322] mdmrvpaqllgllllwlgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENN

YKTPPVLDSDGSFFLTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
 VQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:63)

B4b:hIgK-hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366Y)

[00323] mdmrvpaqlglglwlgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLYCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:64)

B5a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

[00324] mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
MVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:65)

B5b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00325] mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:66)

B6a:hIgK- hIgG1-Fc(AA) (T366S)(L368A)(Y407V)-(G₄S)₅-ΔN6-GDF15 (C7-I112)

[00326] mdmrvpaqlglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADW

**VLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQ
KTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:67)**

B6b:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)

[00327] mdmrvpaqlglglwlrargcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:68)

B7a:hIgK-hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)

[00328] mdmrvpaqlglglwlrargcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR
**EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTD
TGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:69)**

B7b:hIgK-hIgG1-Fc(Δшарнир AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00329] mdmrvpaqlglglwlrargcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:70)

B8a:hIgK-hIgG1-Fc(Δh, AA) (T366S)(L368A)(Y407V)-(G₄S)₅-ΔN6-GDF15 (C7-I112)

[00330] mdmrvpaqlglglwlrargcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
**TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQ
TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:71)**

B8b:hIgK-hIgG1-Fc(Δ h, AA)(T366W)

[00331] mdmrvpaqlglglglwlgarcAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:72)

B9a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₃-GDF15 (A1-I112) (D5T)

[00332] mdmrvpaqlglglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSARNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:73)

B9b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00333] mdmrvpaqlglglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

B10a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₄-GDF15 (A1-I112) (D5T)

[00334] mdmrvpaqlglglglwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGTHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:75)

[00342] mdmrvpaqlgllllwlrgarcDKTHTCPPCPAPALAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG**GDHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLG**
WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
MVLIQKTDGTGVSLOTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:82)

B14b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00343] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:83)

B15a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)

[00344] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQK
 SLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
 MVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:84)

B15b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00345] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:85)

B16a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)

[00346] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQK
 SLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRTANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
 MVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:86)

B16b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00347] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:87)

B17a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)

[00348] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
 MVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:88)

B17b:hIgK-hIgG1-Fc(AA)(T366S)(L368A)(Y407V)

[00349] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:89)

B18a:hIgK- hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G₄S)₅-ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)

[00350] mdmrvpaqllgllllwlgarcDKTHTCPPCPAPALAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNP
 MVLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:90)

[00359] IgK-GDF15-гликомутеин R53N/A55T

[00360] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:110)

[00361] **IgK-GDF15-гликомутеин S64N/H66T**

[00362] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTNLTRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
QTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:111)

[00363] **IgK-GDF15-гликомутеин P70N**

[00364] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKNDTVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
QTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:112)

[00365] **IgK-GDF15-гликомутеин Q90N**

[00366] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLINKTDGTGVSQ
TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:113)

[00367] **IgK-GDF15-гликомутеин K91N/D93T**

[00368] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSQ
TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:114)

[00369] **IgK-GDF15-гликомутеин D93N/G95T**

[00370] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTNNTTVSLQ
TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:115)

[00371] **IgK-GDF15-гликомутеин G95N**

[00372] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNTVSLQ
TYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:116)

[00373] **IgK-GDF15-гликомутеин S97N/Q99T**

[00374] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE
VQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQ
TTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:117)

[00375] **IgK-GDF15-гликомутеин L98N**

[00376] mdmrvpaqlglglwlrgrcARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPRE VQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSNTQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:118)

[00377] Молекулы GDF15 были экспрессированы с использованием сигнального пептида IgK, который отщеплялся от секретируемого полипептида сигнальной пептидазой, экспрессируемой 293 клетками. Восстановление зрелого GDF15 дикого типа человека (SEQ ID NO:1) и гликомутеины GDF15 перечислены на Фиг. 2B.

[00378] Иллюстративные гликомутеины GDF15, которые могут быть экспрессированы как Fc-Fc(выступ/впадина)GDF15 гликомутеины, описаны в USSN14/811578, поданной 28 июля 2015 года.

Пример 2: Влияние (Fc/Fc)–GDF15 слитых молекул на массу тела и прием пищи у мышью DIO модели

[00379] Влияние подкожного введения гибридной молекулы, содержащей рекомбинантный Fc-гетеродимер, слитый с рекомбинантным GDF15 человека (т. е., комплекс из двух гетеродимеров, каждый гетеродимер, имеющий Fc-полипептид димеризованный с полипептидом Fc-GDF15 гликомутеина), на массу тела было оценено в течение 35-дневного периода. Вкратце, слитые молекулы B9a/B9b, B11a/B11b и B13a/B13b вводили еженедельно в течение 21 дня в дозах от 0,4 нмоль/кг и 4 нмоль/кг в виде однократной подкожной болюсной инъекции (10 мл/кг) DIO мышам массой приблизительно 35-40 г. После введения контрольного наполнителя или слитых молекул, уменьшение массы тела наблюдалось в различных временных точках в течение 35-дневного периода, который содержал 21-дневную схему приема белка с последующей 14-дневной промывкой (после введения дозы) для мониторинга эффективности.

[00380] Как показано на Фиг. 3-6, введение Fc-слитых молекул (гетеродимер-гетеродимерный комплекс) в дозе от 0,4 нмоль/кг и 4 нмоль/кг привело к значительному снижению массы тела. В каждой группе мышей, $n = 6$ и p -значения (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, нз = не значимо) определяли с помощью непараметрического Т-критерия Стьюдента при сравнении контрольной группы, получавшей носитель, в каждый указанный момент времени. Как изображено на Фиг. 7, общий вес тела с анализом СОС показан в каждый момент времени взятия проб для всех групп. Как изображено на Фиг. 8, изменения в массе тела (г) с анализом СОС и p -значениями показаны в каждый момент времени взятия

проб для всех групп. Как изображено на Фиг. 9, процент изменения массы тела (%) с анализом СОС и р-значениями показаны в каждый момент времени взятия проб для всех групп.

[00381] Как изображено на Фиг. 3 и 5, наблюдается увеличение эффективности в снижении веса тела для B13a/B13b по сравнению с B9a/B9b и B11a/B11b в 0,4 нмоль/кг исследуемой дозы. Повышенная эффективность *in vivo* для B13a/B13b объясняется повышенной стабильностью за счет усечения 2 N-концевых остатков GDF15 (Δ AR).

[00382] В данном документе описаны конкретные варианты реализации данного 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 опытные специалисты могут при необходимости использовать такие изменения. Соответственно, предполагается, что на практике изобретение будет использовано иначе, чем описано в данном документе, и что данное изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета изобретения, изложенные в формуле изобретения, приложенной к данному документу в соответствии с действующим законодательством. 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.

[00383] Все публикации, патентные заявки, учетные номера и другие источники, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок 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.
 Shen, Wenyan
 Lindhout, Darrin A.
 Haldankar, Raj
 Matern, Hugo

<120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

<130> NGMB-142WO

<150> US 62/073737

<151> 2014-10-31

<150> US 62/244604

<151> 2015-10-21

<160> 136

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> ППТ

<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> 232

<212> ППТ

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
1				5					10					15	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
		35					40					45			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
	50					55					60				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
65					70					75					80
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
				85					90					95	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
			100					105					110		
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
		115					120					125			
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
	130					135					140				
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
145					150					155					160
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
				165					170					175	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
			180					185					190		
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
		195					200					205			
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
	210					215					220				
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
225					230										

<210> 3
 <211> 347
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Gly Thr
225 230 235 240

His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg
245 250 255

Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg
260 265 270

Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg
275 280 285

Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys
290 295 300

Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro
305 310 315 320

Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr
325 330 335

Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
340 345

<210> 4

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 5
 <211> 362
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	85	90	95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	100	105	110	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	115	120	125	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	130	135	140	
Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	145	150	155	160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	165	170	175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	180	185	190	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	195	200	205	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	210	215	220	
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	225	230	235	240
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Gly	Thr	His	245	250	255	
Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	260	265	270	
Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	275	280	285	
Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	290	295	300	
Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	305	310	315	320
Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	325	330	335	

Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp
340 345 350

Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 6

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 7
<211> 361
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys
245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn Ala Ser
260 265 270

Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
275 280 285

Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala
290 295 300

Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
325 330 335

Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 8

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 8

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 9

<211> 361

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys
245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Asn
260 265 270

Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
275 280 285

Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala
290 295 300

Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
325 330 335

Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 10

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 10

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 11
<211> 361
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 11

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	65	70	75	80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	85	90	95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	100	105	110	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	115	120	125	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	130	135	140	
Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	145	150	155	160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	165	170	175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	180	185	190	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	195	200	205	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	210	215	220	
Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	225	230	235	240
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	His	Cys	245	250	255	
Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	260	265	270	
Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	275	280	285	
Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln	Asn	Arg	Thr	Ala	290	295	300	
Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	305	310	315	320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
325 330 335

Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 12

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 12

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	165	170	175	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	180	185	190	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	195	200	205	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	210	215	220	
Pro Gly Lys																225			
<210> 13																			
<211> 361																			
<212> ПРТ																			
<213> Искусственная последовательность																			
<220>																			
<223> синтетическая последовательность полипептида																			
<400> 13																			
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Ala	Leu	Ala	Gly	1	5	10	15
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	20	25	30	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	35	40	45	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	50	55	60	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	65	70	75	80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	85	90	95	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	100	105	110	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	115	120	125	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	130	135	140	

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys
245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser
260 265 270

Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
275 280 285

Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr
290 295 300

Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
325 330 335

Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 14
<211> 227
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 14

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 15
 <211> 361
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

 <400> 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys
245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser
260 265 270

Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
275 280 285

Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala
290 295 300

Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
325 330 335

Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 16

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 17
<211> 361
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys
245 250 255

Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser
260 265 270

Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val
275 280 285

Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala
290 295 300

Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp
305 310 315 320

Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val
325 330 335

Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp
340 345 350

Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
355 360

<210> 18

<211> 227

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 18

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 19
<211> 4
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 19

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 20
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 21
<211> 4
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 21

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 22
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 22

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 23

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 25

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 26

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 27

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 28

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 28

Glu Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 29

<211> 4

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (3)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любую гидрофобную аминокислоту

<400> 29

Pro Xaa Xaa Xaa
1

<210> 30

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (3)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любую гидрофобную аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любой Ser или Thr

<400> 30

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любой Leu или Gln

<400> 31

Pro Xaa Gly Met Thr Ser

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)

<223> аминокислота в этом положении может представлять собой любой Leu или Gln

<400> 32

Pro Xaa Gly Met Thr

1

5

<210> 33
<211> 10
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 33

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

<210> 34
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 34

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

<210> 35
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 35

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

<210> 36
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 36

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

<210> 37
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 37

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

<210> 38
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 38

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

<210> 39
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 39

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

<210> 40
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 40

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

<210> 41
<211> 14
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 41

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

<210> 42
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 42

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

<210> 43
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 43

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

<210> 44
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 44

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

<210> 45
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 45

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

<210> 46
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 46

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

<210> 47

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 47

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

<210> 48

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 48

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

<210> 49

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 49

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

<210> 50

<211> 12

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 50

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

<210> 51

<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 51

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

<210> 52
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 52

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

<210> 53
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 53

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

<210> 54
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 54

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

<210> 55
<211> 227
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Lys
225

<210> 56

<211> 69

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 56

accatggaca tgaggggtccc cgctcagctc ctgggggtcc tgctactctg gctccgaggt 60

gccagatgt 69

<210> 57

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 57

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

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

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 58

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 58

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

<210> 59

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 59

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

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

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 60

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 60

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 61

<211> 373

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 61

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
		35					40					45			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
	50					55					60				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
65					70					75					80
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
				85					90					95	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
			100					105					110		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
		115					120					125			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
		130				135					140				
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Tyr	Cys	Leu
145					150					155					160
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
				165					170					175	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
			180					185					190		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
		195					200					205			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
	210					215					220				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly
225					230					235					240
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro
			260					265					270		
Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu
		275					280					285			

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
290 295 300

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
305 310 315 320

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
325 330 335

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
340 345 350

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
355 360 365

Asp Cys His Cys Ile
370

<210> 62

<211> 239

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 62

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 63

<211> 373

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 63

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	100	105	110
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	115	120	125
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	130	135	140
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	145	150	155
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	165	170	175
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	180	185	190
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	195	200	205
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	210	215	220
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	225	230	235
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	245	250	255
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	260	265	270
Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	275	280	285
Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	290	295	300
Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	305	310	315
Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	325	330	335
Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	340	345	350

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
355 360 365

Asp Cys His Cys Ile
370

<210> 64

<211> 239

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 64

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230 235

<210> 65
 <211> 383
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 65

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

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

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 66
<211> 249
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 66

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 67

<211> 380

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 67

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val
275 280 285

Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro
290 295 300

Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe
305 310 315 320

Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu
325 330 335

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

Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr
355 360 365

Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 68

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 68

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

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

<210> 69

<211> 373

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 69

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
260 265 270

Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
275 280 285

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
290 295 300

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
305 310 315 320

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
325 330 335

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
340 345 350

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
355 360 365

Asp Cys His Cys Ile
370

<210> 70

<211> 239

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 70

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	85	90	95	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	100	105	110
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	115	120	125
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	130	135	140
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	145	150	155
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	165	170	175
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	180	185	190
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	195	200	205
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	210	215	220
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		225	230	235

<210> 71
 <211> 370
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 71

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	Pro	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	20	25	30	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	35	40	45	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	50	55	60	

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys
260 265 270

Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
275 280 285

Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
290 295 300

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
305 310 315 320

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
325 330 335

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
340 345 350

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
355 360 365

Cys Ile
370

<210> 72

<211> 239

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 72

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 Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val
20 25 30

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
35 40 45

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
50 55 60

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
65 70 75 80

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
85 90 95

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
100 105 110

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
130 135 140

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
165 170 175

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 73

<211> 376

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 73

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro
260 265 270

Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu
275 280 285

Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln
290 295 300

Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn
305 310 315 320

Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr
325 330 335

Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu
340 345 350

Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu
355 360 365

Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375

<210> 74
 <211> 249
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

 <400> 74

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 75

<211> 381

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 75

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Asn
260 265 270

Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
275 280 285

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
290 295 300

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
305 310 315 320

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
325 330 335

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

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

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 76

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 76

Met 1	Asp	Met	Arg	Val 5	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu 10	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu 15	Trp
Leu	Arg	Gly	Ala 20	Arg	Cys	Asp	Lys	Thr 25	His	Thr	Cys	Pro	Pro 30	Cys	Pro
Ala	Pro	Ala 35	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro 40	Ser	Val	Phe	Leu	Phe 45	Pro	Pro	Lys
Pro	Lys 50	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 55	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu 60	Val	Thr	Cys	Val
Val 65	Val	Asp	Val	Ser	His 70	Glu	Asp	Pro	Glu	Val 75	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr 80
Val	Asp	Gly	Val	Glu 85	Val	His	Asn	Ala 90	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 95	Glu
Gln	Tyr	Asn	Ser 100	Thr	Tyr	Arg	Val	Val 105	Ser	Val	Leu	Thr	Val 110	Leu	His
Gln	Asp	Trp 115	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 120	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val 125	Ser	Asn	Lys
Ala 130	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu 135	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys 140	Ala	Lys	Gly	Gln
Pro 145	Arg	Glu	Pro	Gln	Val 150	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro 155	Ser	Arg	Glu	Glu	Met 160
Thr	Lys	Asn	Gln 165	Val	Ser	Leu	Ser	Cys 170	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 175	Pro
Ser	Asp	Ile 180	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 185	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu 190	Asn	Asn
Tyr	Lys	Thr 195	Thr	Pro	Pro	Val	Leu 200	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser 205	Phe	Phe	Leu
Val 210	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp 215	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln 220	Gln	Gly	Asn	Val
Phe 225	Ser	Cys	Ser	Val	Met 230	His	Glu	Ala	Leu	His 235	Asn	His	Tyr	Thr	Gln 240
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu 245	Ser	Pro	Gly	Lys							

<210> 77
 <211> 386
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

 <400> 77

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys
275 280 285

Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
290 295 300

Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
305 310 315 320

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
325 330 335

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
340 345 350

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
355 360 365

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
370 375 380

Cys Ile
385

<210> 78

<211> 369

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 78

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala	Pro	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	35	40	45
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	50	55	60
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	65	70	75
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	85	90	95
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	100	105	110
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	115	120	125
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	130	135	140
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	145	150	155
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	165	170	175
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	180	185	190
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	195	200	205
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	210	215	220
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	225	230	235
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	245	250	255
Gly	Gly	Ser	Asn	Gly	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	260	265	270
Arg	Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	275	280	285

Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala
290 295 300

Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr
305 310 315 320

Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val
325 330 335

Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly
340 345 350

Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys
355 360 365

Ile

<210> 79

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 80

<211> 384

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
				85					90					95		
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
			100					105					110			
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
		115					120					125				
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
	130					135					140					
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
145					150					155					160	
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
				165					170					175		
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
			180					185					190			
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
		195					200					205				
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
	210					215					220					
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
225					230					235					240	
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				245					250					255		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
			260					265					270			
Gly	Ser	Asn	Gly	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	
		275					280					285				
Leu	His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	
	290					295					300					
Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	
305					310					315					320	
Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	
				325					330					335		

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 340 345 350

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 355 360 365

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 370 375 380

<210> 81
 <211> 249
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 82

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

<210> 83
 <211> 249
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

 <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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 84

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

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

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 85
<211> 249
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 86
<211> 383

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида
 <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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 195 200 205

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

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

Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 87

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 88

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

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

Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
275 280 285

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
290 295 300

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

Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 89

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 90

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	65	70	75	80
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	85	90	95	
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	100	105	110	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	115	120	125	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	130	135	140	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	145	150	155	160
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	165	170	175	
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	180	185	190	
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	195	200	205	
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	210	215	220	
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	225	230	235	240
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	245	250	255	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	260	265	270	
Gly	Ser	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	275	280	285	
His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	290	295	300	
Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	305	310	315	320

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
325 330 335

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
340 345 350

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 91

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 91

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 92

<211> 383

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	115	120	125
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	130	135	140
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	145	150	155
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	165	170	175
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	180	185	190
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	195	200	205
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	210	215	220
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	225	230	235
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	245	250	255
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	260	265	270
Gly	Ser	Gly	Asp	His	Cys	Pro	Leu	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Cys	Arg	Leu	275	280	285
His	Thr	Val	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Gly	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	290	295	300
Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	305	310	315
Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	325	330	335
His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	340	345	350
Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	355	360	365

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
370 375 380

<210> 93

<211> 249

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<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 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
20 25 30

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
35 40 45

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
50 55 60

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
100 105 110

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
115 120 125

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
145 150 155 160

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
165 170 175

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
180 185 190

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
195 200 205

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
210 215 220

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
225 230 235 240

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 94
<211> 31
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 94

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> 95
<211> 6
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 95

Ala Arg Asn Gly Asp His
1 5

<210> 96
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 96

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 97
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 97

Ala Pro Ala Leu Ala Gly Gly Pro
1 5

<210> 98
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 98

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 99
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 99

Ala Pro Glu Leu Ala Gly Gly Pro
1 5

<210> 100
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 100

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

<210> 101
<211> 13
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 101

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

<210> 102
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 102

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

<210> 103
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 103

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 104
<211> 10
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 104

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 105
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 105

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 106
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 106

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 107

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 107

Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 108

<211> 134

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 108

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> 109
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 109

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 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> 110
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 110

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> 111
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 111

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> 112
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 112

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 Asn 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> 113
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 113

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 Asn
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> 114

<211> 134

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 114

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> 115
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 115

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> 116
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 116

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 Asn Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 117
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 117

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> 118
<211> 134
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 118

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 Asn Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 119
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 119

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

Thr

<210> 120
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> этот участок аминокислот может повторяться до 50 раз
<400> 120

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 121
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> этот участок аминокислот может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<400> 121

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 122
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> этот участок аминокислот может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<400> 122

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 123
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> этот участок аминокислот может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<400> 123

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 124
<211> 4
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> этот участок аминокислот может повторяться до 20 раз

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> эта аминокислота может повторяться до 20 раз

<400> 124

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 125
<211> 4
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> этот участок аминокислот может повторяться до 50 раз

<400> 125

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 126
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> этот участок аминокислот может повторяться до 50 раз

 <400> 126

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 127
 <211> 227
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

 <400> 127

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

130

135

140

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

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

Pro Gly Lys
 225

<210> 128

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 128

Ala Arg Asn Gly Thr 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> 129
<211> 110
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 129

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

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

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

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

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

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

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

<210> 130
<211> 109
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 130

Gly Thr 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 Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 131
<211> 109
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 131

Gly Asp 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> 132
<211> 109
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 132

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> 133
<211> 109
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 133

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> 134

<211> 109
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 134

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> 135
<211> 109
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 135

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	Gln
				85					90				95	

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

<210> 136
 <211> 109
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая последовательность полипептида

<400> 136

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				

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий:

первый полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и

второй полипептид, содержащий Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину,

причем первый полипептид димеризован со вторым полипептидом через позиционирование выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида, и

причем либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом GDF15 мутеина, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования.

2. Комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер, при этом каждый первый гетеродимер и второй гетеродимер содержат:

первый полипептид и второй полипептид, причем:

первый полипептид содержит Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и

второй полипептид содержит Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность СНЗ, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину;

причем первый полипептид димеризован со вторым полипептидом через позиционирование выпячивания первого полипептида во впадину второго полипептида,

причем либо С-конец первого полипептида, либо С-конец второго полипептида конъюгирован с N-концом GDF15 мутеина, содержащего по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, и

причем GDF15 мутеин в первом гетеродимере димеризован с GDF15 мутеином во втором гетеродимере, тем самым формируя комплекс, содержащий первый гетеродимер и второй гетеродимер.

3.Комплекс по любому из пп. 1 - 2, отличающийся тем, что С-конец первого полипептида является конъюгированным с N-концом GDF15 мутеина.

4.Комплекс по любому из пп. 1 - 2, отличающийся тем, что С-конец второго полипептида является конъюгированным с N-концом GDF15 мутеина.

5.Комплекс, содержащий первый полипептид, содержащий:

Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание, причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом, содержащим Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину; и

GDF15 мутеин, содержащий по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, причем С-конец первого полипептида является конъюгированным с N-концом GDF15 мутеина.

6.Комплекс, содержащий первый полипептид, содержащий:

Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одну сконструированную впадину, причем первый полипептид димеризуется со вторым полипептидом, содержащим Fc-последовательность IgG, при этом Fc-последовательность IgG содержит последовательность CH3, содержащую по меньшей мере одно сконструированное выпячивание; и

GDF15 мутеин, содержащий по меньшей мере один консенсусный сайт N-связанного гликозилирования, причем С-конец первого полипептида является конъюгированным с N-концом GDF15 мутеина.

7.Комплекс по любому из пп. 1 - 6, отличающийся тем, что GDF15 мутеин содержит непрерывную аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 % идентична аминокислотной последовательности GDF15 дикого типа (SEQ ID NO:1).

8.Комплекс по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что GDF15 мутеин содержит по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в SEQ ID NO:1, которая создает консенсусный сайт N-связанного гликозилирования.

9.Комплекс по п. 8, отличающийся тем, что замена содержит D5T или D5S.

10.Комплекс по п. 8, отличающийся тем, что замена содержит R21N.

11.Комплекс по п. 8, отличающийся тем, что GDF15 мутеин содержит по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1, которые создают консенсусный сайт N-связанного гликозилирования:

- i) R16N и H18T или R16N и H18S;
- ii) S23N и E25T или S23N и E25S;
- iii) S50N и F52T или S50N и F52S;
- iv) F52N и A54T или F52N и A54S;
- v) R53N и A55T или R53N и A55S;
- vi) S64N и H66T или S64N и H66S;
- vii) K91N и D93T или K91N и D93S;
- viii) D93N и G95T или D93N и G95S;
- ix) T94N и V96T или T94N и V96S;
- x) V96N и L98T или V96N и L98S;
- xi) S97N и Q99T или S97N и Q99S; и
- xii) A106N и D108T или A106N и D108S

12.Комплекс по п. 11, содержащий по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1:

- 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;
- D93N и G95T или D93N и G95S;
- S97N и Q99T или S97N и Q99S; и

A106N и D108T или A106N и D108S.

13.Комплекс по п. 11, содержащий по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1:

S64N и H66T или S64N и H66S;

K91N и D93T или K91N и D93S;

D93N и G95T или D93N и G95S; и

S97N и Q99T или S97N и Q99S.

14.Комплекс по п. 11, содержащий по меньшей мере одну из следующих пар замен соответствующих аминокислот в SEQ ID NO:1:

K91N и D93T или K91N и D93S; и

D93N и G95T или D93N и G95S.

15.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что GDF15 мутеин содержит непрерывную аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 98 аминокислот и по меньшей мере на 95 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота полипептида соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

16.Комплекс по п. 15, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первую аминокислоту, которая соответствует первой аминокислоте, присутствующей на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

17.Комплекс по п. 15, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые две аминокислоты, которые соответствуют первым двум аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

18.Комплекс по любому из п. 15, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первых трех аминокислот, которые соответствуют первым трем аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

19.Комплекс по п. 15, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые шесть аминокислот, которые соответствуют первым шести аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1, причем С-концевая аминокислота соответствует изолейцину в положении 112 в SEQ ID NO:1.

20.Комплекс по п. 15, отличающийся тем, что непрерывная аминокислотная последовательность обладает длиной по меньшей мере 98 аминокислот и не содержит первые четырнадцать аминокислот, которые соответствуют первым четырнадцати аминокислотам, присутствующим на N-конце SEQ ID NO:1.

21.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что С-конец либо первого полипептида, либо второго полипептида является конъюгированным с N-концом GDF15 мутеина посредством линкера.

22.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что Fc IgG содержит непрерывную аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90 % идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

23.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что сконструированное выпячивание содержит по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в Fc-последовательности IgG1 человека, причем замена происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 347, 366 и 394, в соответствии с нумерацией ЕС.

24.Комплекс по п. 23, отличающийся тем, что по меньшей мере одна замена является выбранной из группы, состоящей из Q347W/Y, T366W/Y и T394W/Y в соответствии с нумерацией ЕС.

25.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что сконструированная впадина содержит по меньшей мере одну замену соответствующей аминокислоты в Fc-последовательности IgG1 человека, причем замена происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 366, 368, 394, 405 и 407 в соответствии с нумерацией ЕС.

26.Комплекс по п. 25, отличающийся тем, что по меньшей мере одна замена является выбранной из группы, состоящей из T366S, L368A, T394S, F405T/V/A и Y407T/V/A в соответствии с нумерацией ЕС.

27.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выпячивание содержит замену T366W/Y и впадина содержит замены T366S, L368A и Y407T/V/A в соответствии с нумерацией ЕС.

28.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выпячивание содержит замену T366W/Y и впадина содержит замену Y407T/V/A в соответствии с нумерацией ЕС.

29.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выпячивание содержит замену T366Y и впадина содержит замену Y407T в соответствии с нумерацией ЕС.

30.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выпячивание содержит замену T366W и впадина содержит замену Y407A в соответствии с нумерацией ЕС.

31.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выпячивание содержит замену T394Y и впадина содержит замену Y407T в соответствии с нумерацией ЕС.

32.Комплекс по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что первый полипептид димеризован со вторым полипептидом посредством одной или двух дисульфидных связей, образованных между участками шарнира, присутствующих в Fc-последовательностях Ig в первом и втором полипептидах.

33.Нуклеиновая кислота, кодирующая первый и второй полипептиды по любому из предшествующих пунктов.

34.Нуклеиновая кислота по п. 33, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота является функционально связанной с элементом, контролирующим экспрессию, который обеспечивает экспрессию первого и второго полипептидов из нуклеиновой кислоты.

35.Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 33-34.

36.Вектор по п. 35, отличающийся тем, что указанный вектор содержит вирусный вектор.

37.Клетка-хозяин, которая экспрессирует первый и второй полипептиды по любому из пп. 1-32.

38.Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 33-34 или вектор по любому из пп. 35-36.

39.Первая нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид по любому из предшествующих пунктов и вторая нуклеиновая кислота, кодирующая второй полипептид по любому из предшествующих пунктов.

40.Первая и вторая нуклеиновые кислоты по п. 39, отличающиеся тем, что каждая из нуклеиновых кислот является функционально связанной с элементом, контролирующим экспрессию, который обеспечивает экспрессию первого и второго полипептидов из первой и второй нуклеиновых кислот, соответственно.

41.Первый вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту и второй вектор, содержащий вторую нуклеиновую кислоту по любому из пп. 39 - 40.

42.Первый и второй векторы по п. 41, отличающиеся тем, что каждый вектор содержит вирусный вектор.

43.Клетка-хозяин, которая экспрессирует первый полипептид и второй полипептид по любому из пп. 1-32.

44.Клетка-хозяин, содержащая первую нуклеиновую кислоту, и вторая клетка-хозяин по любому из пп. 39 - 40; или клетка-хозяин, содержащая первый вектор и второй вектор по любому из пп. 41 – 42.

45.Первая клетка-хозяин, которая экспрессирует первый полипептид по любому из пп. 1-32, и вторая клетка-хозяин, которая экспрессирует второй полипептид по любому из пп. 1-32.

46.Первая клетка-хозяин, содержащая первую нуклеиновую кислоту по любому из пп. 39 – 40, и вторая клетка-хозяин, содержащая вторую нуклеиновую кислоту по любому из пп. 39 - 40; или первая клетка-хозяин, содержащая первый вектор по любому из пп. 41 – 42, и вторая клетка-хозяин, содержащая второй вектор по любому из пп. 40 - 41.

47.Фармацевтическая композиция, содержащая комплекс по любому из пп. 1-32 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

48.Фармацевтическая композиция по п. 47, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный профилактический или терапевтический агент.

49.Антитело, которое специфически связывается с GDF15 мутеином по любому из пп. 1-32.

50.Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п. 49 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

51. Фармацевтическая композиция по п. 50, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный профилактический или терапевтический агент.

52. Стерильный контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 47-48 и пп. 50-51.

53. Стерильный контейнер по п. 52, отличающийся тем, что стерильный контейнер представляет собой шприц.

54. Набор, содержащий стерильный контейнер по любому из пп. 52-53.

55. Способ изготовления комплекса по любому из пп. 1-32, включающий стадии, в которых:
культивируют клетки-хозяина, экспрессирующие первый и второй полипептиды; и
выделяют комплекс, содержащий первый полипептид и второй полипептид.

56. Способ лечения или предотвращения расстройства массы тела у субъекта, включающий введение субъекту комплекса по любому из пп. 1-32, причем комплекс вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики расстройства массы тела у субъекта.

57. Способ лечения или предотвращения расстройства метаболизма глюкозы у субъекта, включающий введение субъекту комплекса по любому из пп. 1-32, причем комплекс вводят в количестве, эффективном для лечения или профилактики расстройства метаболизма глюкозы у субъекта.

58. Способ по любому из пп. 56-57, отличающийся тем, что введение приводит к уменьшению потребления пищи субъектом.

59. Способ по любому из пп. 56-57, отличающийся тем, что введение приводит к снижению массы тела у субъекта.

60. Способ по любому из пп. 56-57, отличающийся тем, что введение приводит к снижению уровня глюкозы в крови у субъекта.

61.Способ по п. 57, отличающийся тем, что расстройство метаболизма глюкозы представляет собой сахарный диабет.

62.Способ по любому из пп. 56-61, отличающийся тем, что субъектом является человек.

63.Способ по любому из пп. 56-62, отличающийся тем, что субъект страдает ожирением.

64.Способ по любому из пп. 56-63, отличающийся тем, что введение осуществляют посредством парентеральной инъекции.

65.Способ по п. 64, отличающийся тем, что парентеральная инъекция является подкожной.

66.Способ по любому из пп. 56-65, отличающийся тем, что введение включает введение комплекса ежедневно.

67.Способ по любому из пп. 56-65, отличающийся тем, что введение включает введение комплекса два раза в неделю.

68.Способ по любому из пп. 56-65, отличающийся тем, что введение включает введение комплекса раз в неделю.

69.Способ по любому из пп. 56-65, отличающийся тем, что введение включает введение комплекса раз в 2 недели.

70.Способ по любому из пп. 56-65, отличающийся тем, что введение включает введение комплекса один раз в месяц.

71.Композиция, содержащая комплекс по любому из пп. 1-32 для лечения или предотвращения расстройства массы тела у субъекта.

72.Композиция по п. 71 для лечения расстройства массы тела у субъекта, отличающаяся тем, что композицию вводят в количестве, эффективном для лечения расстройства массы тела у субъекта.

73.Композиция по п. 71 для предотвращения расстройства массы тела у субъекта, отличающаяся тем, что композицию вводят в количестве, эффективном для предотвращения расстройства массы тела у субъекта.

74.Композиция, содержащая комплекс по любому из пп. 1-32 для лечения или предотвращения нарушения метаболизма глюкозы у субъекта.

75.Композиция по п. 74 для лечения расстройства метаболизма глюкозы у субъекта, отличающаяся тем, что композицию вводят в количестве, эффективном для лечения нарушения метаболизма глюкозы у субъекта.

76.Композиция по п. 74 для предотвращения расстройства метаболизма глюкозы у субъекта, отличающаяся тем, что композицию вводят в количестве, эффективном для предотвращения нарушения метаболизма глюкозы у субъекта.

77.Композиция по любому из пп. 71-76, отличающаяся тем, что введение композиции приводит к уменьшению потребления пищи субъектом.

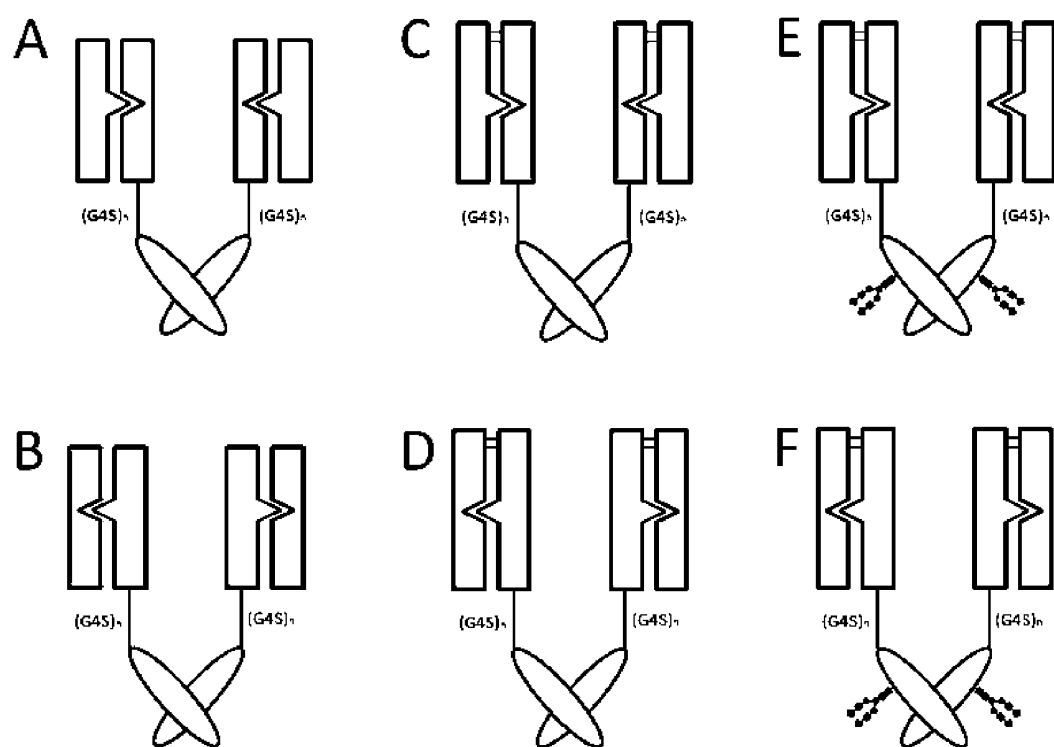
78.Композиция по любому из пп. 71-76, отличающаяся тем, что введение композиции приводит к снижению массы тела у субъекта.

79.Композиция по любому из пп. 71-76, отличающаяся тем, что введение композиции приводит к снижению уровня глюкозы в крови у субъекта.

80.Композиция по любому из пп. 71-76, отличающаяся тем, что субъект имеет или подвержен риску развития сахарного диабета.

81.Композиция по любому из пп. 71-80, отличающаяся тем, что композиция предназначена для парентерального введения.

Фигура 1 – Конструкции выступ-во-впадину молекул (Fc/Fc)-GDF15



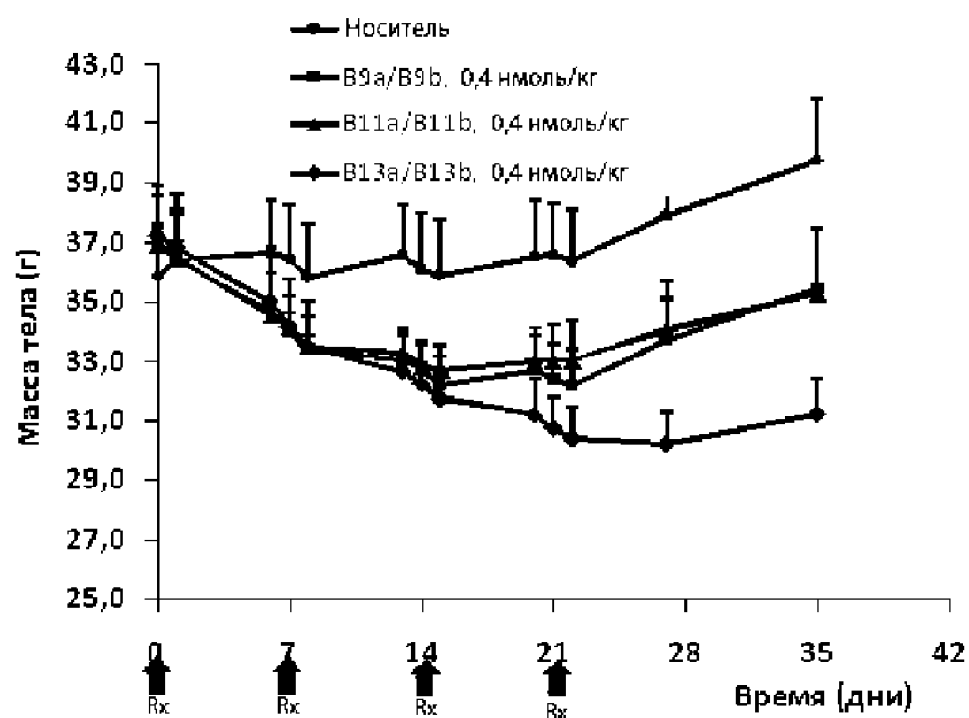
Фигура 2А – Восстановление сконструированных выступ-во-впадину молекул (Fc/Fc)-GDF15

<u>Fc-GDF15 цепь А</u>	<u>Цепь-партнер Fc-гетеродимера (выступ/впадина)</u>	<u>Номер варианта</u>	<u>GDF15 мутации (гликозилирование)</u>	<u>Восстановление (мг/л)</u>
hIgG1-Fc(AA)(T366Y)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hIgG1-Fc(AA)(Y407T)	B1a/B1b	НЕТ	<25
hIgG1-Fc(AA)(Y407T)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hIgG1-Fc(AA)(T366Y)	B2a/B2b	НЕТ	25-49,9
hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366Y)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(Y407T)	B3a/B3b	НЕТ	50-74,9
hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(Y407T)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366Y)	B4a/B4b	НЕТ	<25
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B5a/B5b	НЕТ	<25
hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)-(G4S) ₅ -ΔN6-GDF15 (C7-I112)	hIgG1-Fc(AA)(T366W)	B6a/B6b	НЕТ	<25
hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)	hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366S,L368A,Y407V)	B7a/B7b	НЕТ	25-49,9
hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366S,L368A,Y407V)-(G4S) ₅ -ΔN6-GDF15(C7-I112)	hIgG1-Fc(Δшарнир, AA)(T366W)	B8a/B8b	НЕТ	N/A
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₃ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B9a/B9b	ДА	>100
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₄ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B10a/B10b	ДА	>100
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -GDF15 (A1-I112) (D5T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B11a/B11b	ДА	>100
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₂ -ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B12a/B12b	ДА	75-99
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN2-GDF15 (N3-I112) (D5T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B13a/B13b	ДА	>100
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R21N)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B14a/B14b	ДА	75-99
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(S23N/E25T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B15a/B15b	ДА	75-99
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(F52N/A54T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B16a/B16b	ДА	>100
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(R53N/A55T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B17a/B17b	ДА	75-99
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112) (K91N/D93T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B18a/B18b	ДА	75-99
hIgG1-Fc(AA)(T366W)-(G4S) ₅ -ΔN3-GDF15 (G4-I112)(D93N/G95T)	hIgG1-Fc(AA)(T366S,L368A,Y407V)	B19a/B19b	ДА	50-74,9

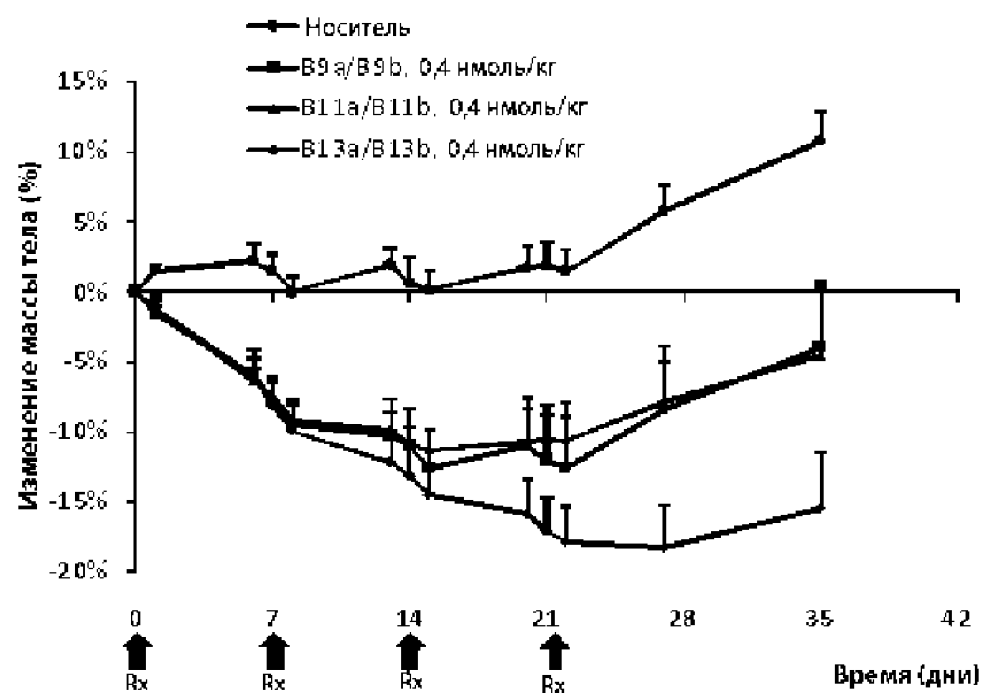
Фигура 2В – Восстановление гликомутеинов GDF15

<u>Гликовариант</u>	<u>Восстановление</u> <u>(мг/л)</u>
hGDF15 дикий тип	< 0,99
R21N	< 0,99
R53N/A55T	4 - 7,99
S64N/H66T	16 - 31,99
P70N	2 - 3,99
Q90N	4 - 7,99
K91N/D93T	16 - 31,99
D93N/G95T	8 - 15,99
G95N	8 - 15,99
S97N/Q99T	8 - 15,99
L98N	4 - 7,99

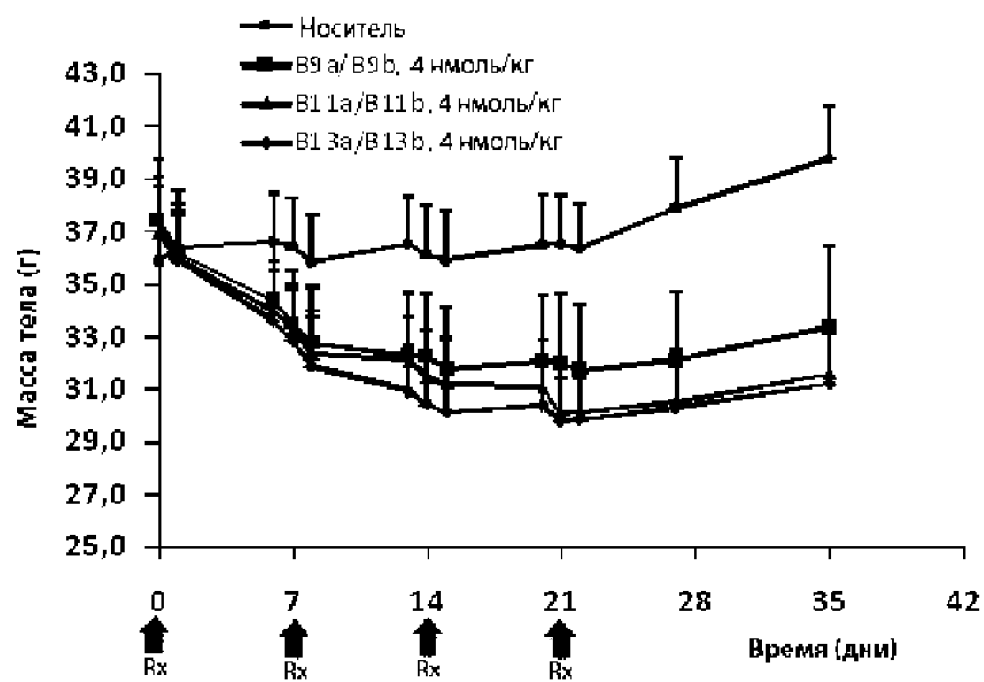
Фигура 3 – Снижение массы тела в мышинной модели DIO при доставке 0,4 нмоль/кг молекул (Fc/Fc)-GDF15



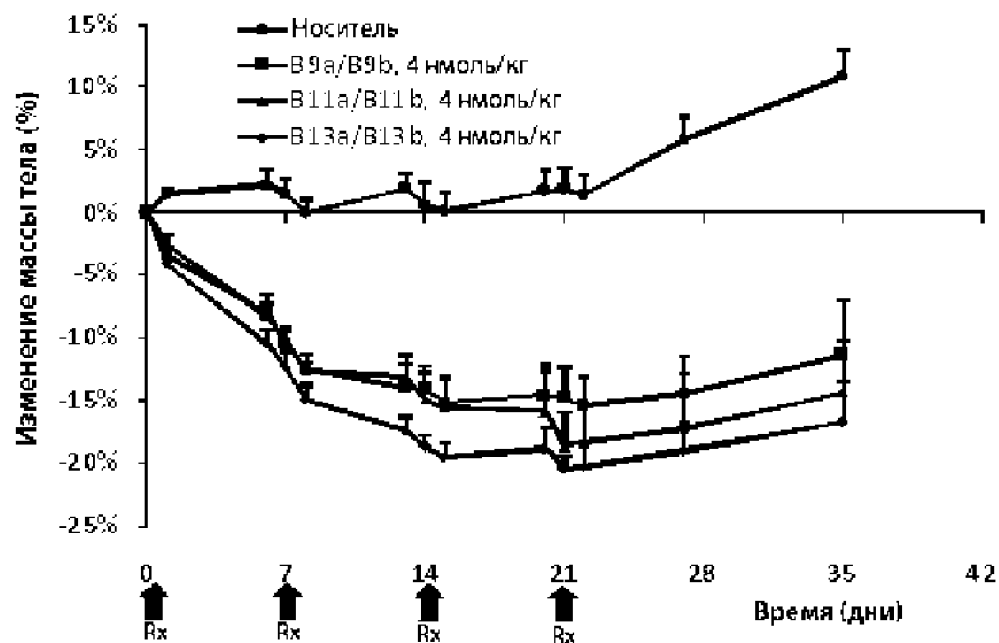
Фигура 4 – Процент снижения массы тела в мышинной модели DIO при доставке 0,4 нмоль/кг молекул (Fc/Fc)-GDF15



Фигура 5 - Снижение массы тела в мышинной модели DIO при доставке 4,0 нмоль/кг молекул (Fc/Fc)-GDF15



Фигура 6 – Процент снижения массы тела в мышечной модели DIO при доставке 4,0 нмоль/кг молекул (Fc/Fc)-GDF15



Фигура 7 – Масса тела (г) у DIO мышей в каждой точки времени для 0,4 нмоль/кг и 4,0 нмоль/кг молекул (Fc/Fc)-GDF15

	Д 0	Д 1	Д 6	Д 7	Д 8	Д 13	Д 14	Д 15	Д 20	Д 21	Д 22	Д 27	Д 35
Носитель	35,9	36,4	36,6	36,4	35,9	36,6	36,1	35,9	36,5	36,6	36,4	37,9	39,8
B9a/B9b 0,4 нмоль/кг	37,0	36,4	34,7	34,0	33,4	33,0	32,8	32,2	32,7	32,4	32,2	33,7	35,5
B9a/B9b 4 нмоль/кг	37,4	36,2	34,4	33,5	32,8	32,3	32,2	31,8	32,1	32,0	31,7	32,1	33,4
B11a/B11b 0,4 нмоль/кг	36,9	36,5	34,5	34,2	33,5	33,3	32,9	32,7	33,0	33,0	33,0	34,1	35,3
B11a/B11b 4 нмоль/кг	37,0	36,0	34,0	33,3	32,3	32,1	31,5	31,2	31,1	30,1	30,2	30,6	31,6
B13a/B13b 0,4 нмоль/кг	37,2	36,8	35,0	34,2	33,5	32,7	32,2	31,8	31,2	30,7	30,4	30,2	31,2
B13a/B13b 4 нмоль/кг	37,4	35,9	33,6	32,9	31,9	31,0	30,5	30,2	30,4	29,8	29,9	30,4	31,2

sem	Д 0	Д 1	Д 6	Д 7	Д 8	Д 13	Д 14	Д 15	Д 20	Д 21	Д 22	Д 27	Д 35
Носитель	1,77	1,72	1,81	1,87	1,78	1,74	1,92	1,84	1,89	1,82	1,76	1,87	2,04
B9a/B9b 0,4 нмоль/кг	1,58	1,58	1,30	1,17	1,13	0,91	0,93	0,99	1,16	1,21	1,23	1,39	2,01
B9a/B9b 4 нмоль/кг	2,32	2,35	2,27	2,12	2,14	2,39	2,37	2,35	2,47	2,63	2,51	2,61	3,15
B11a/B11b 0,4 нмоль/кг	0,59	0,58	0,52	0,47	0,45	0,77	0,69	0,82	1,15	1,23	1,35	1,69	2,15
B11a/B11b 4 нмоль/кг	1,70	1,78	1,89	1,76	1,65	1,69	1,76	1,76	1,81	1,72	1,68	1,93	1,87
B13a/B13b 0,4 нмоль/кг	1,69	1,80	1,81	1,64	1,55	1,44	1,33	1,36	1,21	1,09	1,02	1,07	1,17
B13a/B13b 4 нмоль/кг	1,70	1,75	1,96	1,94	1,87	1,70	1,66	1,69	1,71	1,64	1,63	1,71	1,97

