

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035158**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.05.06**

(51) Int. Cl. *A61K 38/18* (2006.01)  
*C07K 14/475* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201591661**

(22) Дата подачи заявки  
**2014.03.07**

---

(54) **ПЕПТИДЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ СУСТАВОВ**

---

(31) **61/775,400; 61/938,123**

(32) **2013.03.08; 2014.02.10**

(33) **US**

(43) **2015.12.30**

(86) **PCT/US2014/022102**

(87) **WO 2014/138687 2014.09.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**НОВАРТИС АГ (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Джонсон Кристен, Ши Цзянь (US)**

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

(56) **WO-A2-2011008773**

JENNIFER A. SIEPEN ET AL.: "Prediction of Missed Cleavage Sites in Tryptic Peptides Aids Protein Identification in Proteomics", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 6, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 399-408, XP055125357, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr060507u, the whole document

E.F. O'SHEA ET AL.: "Synthesis of Trypsin-Resistant Variants of the Listeria-Active Bacteriocin Salivaricin P", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 76, no. 16, 25 June 2010 (2010-06-25), pages 5356-5362, XP055125364, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00523-10, the whole document

(57) Изобретение относится к выделенному полипептиду с хондрогенной активностью и его вариантам, к фармацевтической композиции для лечения или профилактики артрита или повреждения хряща у пациента, содержащей указанный выделенный полипептид, к способу лечения, способу индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты.

**B1**

**035158**

**035158 B1**

### Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет и преимущество предварительной патентной заявки США № 61/775400, поданной 8 марта 2013 года, и предварительной патентной заявки США № 61/938123, поданной 10 февраля 2014 года, каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

### Предпосылки изобретения

Остеоартроз (ОА) представляет собой наиболее распространенное расстройство опорно-двигательного аппарата. В настоящее время им страдают приблизительно 40 миллионов американцев; число увеличится до 60 миллионов человек в ближайшие двадцать лет в результате старения населения и увеличения средней продолжительности жизни, что делает ОА четвертой по значимости причиной инвалидности. ОА характеризуется медленным дегенеративным разрушением сустава, включая как суставной хрящ (содержащий клетки и матрикс, которые производят смазывание и амортизацию для сустава), так и субхондральную кость, лежащую в основе суставного хряща. ОА можно считать следствием различных этиологических факторов. Например, он может быть вызван патологическим биомеханическим стрессом или генетически обусловленной или приобретенной патологией суставного хряща или костной ткани. Современные способы лечения ОА включают облегчение боли при помощи пероральных НПВП или селективных ингибиторов циклооксигеназы 2 (COX-2), внутрисуставной (IA) инъекции средств, таких как кортикостероиды и гиалуронат, а также хирургические подходы.

Повреждение сустава, например сильное повреждение сустава, такое как разрыв мениска или связок, или внутрисуставной перелом, может также привести к артриту, например, посттравматическому артриту. Поскольку суставной хрящ обладает ограниченной способностью восстановления, даже небольшое незаметное повреждение часто может усугубляться со временем и приводить к возникновению ОА. Современные способы лечения повреждений суставов могут включать в себя операции и другие инвазивные процедуры, направленные на регенерацию поврежденных суставов, а также лечение с использованием средств для ослабления боли и воспаления.

Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) присутствуют в зрелом суставном хряще и при выделении могут быть запрограммированы *in vitro* на дифференцировку в хондроциты и мезенхимальные клетки других линий и могут быть использованы для регенерации хряща. Отчасти этот процесс регулируется факторами роста (бета-трансформирующие факторы роста, морфогенетические протеины кости), составом сыворотки и межклеточным контактом. В WO 2011/008773 описаны пептидные композиции и применение этих композиций для лечения или профилактики артрита и повреждений суставов и для индуцирования дифференцировки мезенхимальных клеток в хондроциты. Кроме того, в WO 2012/129562 описаны низкомолекулярные соединения, композиции и применение этих композиций для улучшения состояния при артрите и поражении сустава и для индуцирования дифференцировки мезенхимальных клеток в хондроциты.

Несмотря на определенный прогресс в способах хирургического вмешательства и в регенеративных методиках в плане восстановления хрящевой ткани, замедления процесса дегенерации и улучшения восстановления поврежденных суставов существует постоянная необходимость в совершенствовании композиций и способов для эффективной регенерации хряща, для лечения повреждения суставов и улучшения состояния или профилактики ОА.

### Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение относится к обнаружению новых вариантов полипептидов и белков ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3), которые имеют улучшенные фармацевтические свойства, например более стабильны, менее подвержены протеолизу и ферментативной деградации, чем ANGPTL3 дикого типа. Также изобретение относится к фармацевтическим композициям и способам лечения повреждения суставов или травмы сустава и к способам улучшения состояния при артрите или к способам профилактики артрита, повреждения суставов или травмы сустава у млекопитающего.

Таким образом, изобретение относится к протеазо-устойчивым полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности или по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентична по аминокислотной последовательности любой аминокислотной последовательности, выбранной из одной или нескольких последовательностей табл. 1, и как далее описано в настоящем документе. Модифицированные полипептиды табл. 1 включают аминокислоту, которая является полярной аминокислотой, отличной от К или R в положении 423, как определено по отношению к полипептидную последовательность полноразмерного ANGPTL3 с последовательностью SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1, представляет собой Q или S. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1, представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1, представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 423 делетирована, как определено по отношению к SEQ ID NO:1. Кроме того, предоставленные полипептиды обладают хондрогенной активностью.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность, которая по

меньшей мере на 95% идентична или по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% любой последовательности из SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 и SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична или по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% любой последовательности из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит любую последовательность табл. 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит любую последовательность из SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 и SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит любую последовательность из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой любую последовательность из табл. 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой любую последовательность из SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 и SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой любую последовательность из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64.

Полипептиды по изобретению могут включать одну или несколько химических модификаций (например, ПЭГилирование). В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению могут содержать гетерологичный пептид в качестве белка слияния, который может быть необязательно слит с амино- или карбоксиконцом полипептида. Также предоставлены полинуклеотиды, кодирующие полипептиды по изобретению; векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие полипептиды; и клетки-хозяева, которые включают такие векторы.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим полипептиды по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Такие композиции можно использовать в способах, предусмотренных в этом документе для лечения, улучшения или профилактики артрита или повреждения суставов у пациента, где способ включает введение в сустав пациента терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению. Неограничивающие примеры состояний, для которых такие способы могут иметь преимущество, включают артрит (например, остеоартрит, травматический артрит) и повреждения суставов (например, сильная травма сустава).

Настоящее изобретение также относится к способам лечения индивидуума, включающим введение терапевтически эффективного количества полипептида по изобретению.

Предоставленные способы включают лечение индивидуума, страдающего повреждением сустава и/или артритом или имеющего риск их развития, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества одного или более полипептидов по изобретению или их фармацевтической композиции. Также изобретение относится к способам индуцирования дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хрящевые клетки, включающим приведение мезенхимальных стволовых клеток в контакт с эффективным количеством полипептида по изобретению для индуцирования дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты.

Эти и другие аспекты изобретения, включая дополнительные признаки, преимущества и варианты осуществления изобретения, будут описаны и освещены более подробно в нижеследующем подробном описании и в формуле изобретения, приложенной к настоящему документу.

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 иллюстрирует схему белков hANGPTL3, сконструированных для повышения стабильности белков и повышения протеолитической устойчивости. Во время продуцирования последовательностей белка дикого типа и пептидов между Lys423 и Ser424 наблюдалось 100% расщепление. Для уменьшения протеолиза были получены различные мутантные пептиды, в которых Lys423 был заменен на Gln или Ser; или Ser424 был заменен на Thr или Lys423 был делегирован;

фиг. 2А и В - графические представления экспрессии специфических белков хряща в присутствии или при отсутствии ANGPTL3 и инженерных конструкций. Фиксированные клетки окрашивали 2А для квантификации на проколлаген типа 2А (PIIАНP) или 2В для квантификации на коллаген типа II для определения процента клеток, дифференцирующихся в хондроциты после обработки, как описано в пояс-

няющих примерах. Фиг. 2С иллюстрирует графическое представление количественной оценки анализов на ангиогенез в присутствии или при отсутствии ANGPTL3 или генно-инженерной конструкции по сравнению с белком положительного контроля, bFGF. Общая длина трубки и число точек ветвления представляли собой количественные измерения ангиогенеза. Несмотря на то что другими сообщалось об ангиогенной активности у ANGPTL3, и это исследование подтверждает активность, а также таковую у FGF, результаты продемонстрировали, что для конструкции С-терминального ANGPTL3 значительной активности не сохраняется;

фиг. 3 представляет собой графические представления, демонстрирующие увеличение экспрессии специфических белков хряща в присутствии ANGPTL3 или генно-инженерных конструкций. 3А. Клетки оценивали десять дней после лечения с помощью количественной ПЦР в реальном времени для определения экспрессии РНК для специфических белков хряща после обработки, как описано. Лубрицин, агрекан и Sox9 представляют белки, родственные хрящевым; IGF и IFITM1 представляют потенциал дифференциации, и остеокальцин и коллаген X типа представляют белки, родственные костно/фиброзным белкам. 3В. Клетки оценивали три дня после обработки, как описано. Увеличенная экспрессия агрекана была отмечена после лечения полипептидом С-концевой области генно-инженерной конструкции или ANGPTL1 дикого типа;

фиг. 4 иллюстрирует графическое представление хондрозащитной активности ANGPTL3 и генно-инженерных конструкций. 4А: высвобождение гликозаминогликана (ГАГ), индикатора повреждения матрикса, ингибировалось с ростом количества ANGPTL3 и мутантных конструкций. Анализы ингибирования высвобождения ГАГ *ex vivo* (индикатор повреждения матрикса) проводили с использованием бычьего хряща, обработанного в присутствии или при отсутствии конструкций, как описано. 4В и 4С: нормализованное высвобождение ингибировалось с увеличением количества ANGPTL3 и генно-инженерных конструкций, как указано. Хрящевые клетки обрабатывали в присутствии или при отсутствии конструкций, как описано, с последующими тестами реакции Грейсса, чтобы определить ингибирование нормализованного высвобождения как показателя хондрозащиты;

фиг. 5 - графическое представление, демонстрирующее ингибирование экспрессии коллагена типа X (показатель активности формирования фиброзных хрящей) в присутствии конструкций при гипертрофических условиях. Первичные хондроциты обрабатывали при наличии или отсутствии конструкций при гипертрофических условиях, как описано, с последующим определением экспрессии коллагена типа X, оцениваемой способом иммунофлюоресценции, как определение формирования фиброзного и гипертрофического хряща/дифференциации хондроцитов. 5А иллюстрирует результаты для С-терминального ANGPTL3 дикого типа или генно-инженерной конструкции. 5В иллюстрирует результаты для С-концевого ANGPTL3 (WT) или генно-инженерных конструкций 242KQ или 242Kdel или С-концевого ANGPTL1;

фиг. 6 - схематическое представление парадигмы дозирования (6А) с последующим графическим представлением (6В) уменьшения степени тяжести заболевания сустава после лечения мышинным ANGPTL3 (17-460), как определено путем балльной оценки эрозии хряща латерального мыщелка бедра;

фиг. 7. является графическим представлением инкапсидантных измерений (показатель боли) у мышей после хирургической индукции повреждения хряща и последующего лечения ANGPTL3-конструкциями один раз в неделю в течение трех недель (начало в день 7). 7А представляет инкапсидантные измерения на 35-й день после операции; и 7В представляет измерения, проведенные на 56-й день после операции;

фиг. 8 - графическим представлением балльной оценки общей степени тяжести заболевания сустава и улучшения степени тяжести повреждения хрящевой ткани, индуцированной коллагеназой у мышей после 3 процедур лечения один раз в неделю (дни 7, 14 и 21) ANGPTL3-конструкциями (указывается);

фиг. 9 иллюстрирует результаты повреждения суставов в модели разрыва мениска на крысах после лечения генно-инженерной ANGPTL3-конструкцией. Фиг. 9А является графическим представлением содержания протеогликанов в суставах через пять недель после лечения; фиг. 9В является графическим представлением балльной оценки степени тяжести бедренного сустава через пять недель после лечения. Результаты иллюстрируют улучшение состояния хрящевых повреждений, индуцированных хирургическим разрывом мениска у крыс, после 3 лечебных процедур один раз в неделю (дни 7, 14 и 21) с ANGPTL3-конструкциями (указывается);

фиг. 10 - результаты повреждения суставов в модели разрыва мениска на крысах после лечения генно-инженерной ANGPTL3-конструкцией. Фиг. 10А является графическим представлением процентов восстановления *in vivo*, измеряемого по степени тяжести, интенсивности сафранина О, хрящевой области и толщине хряща. Фиг. 10В является графическим представлением инкапсидантных измерений (показатель боли) у крыс после хирургической индукции повреждения хряща и последующего лечения;

фиг. 11 является графическим представлением балльной оценки общей валовой тяжести для иллюстрации улучшения в состоянии хрящевых повреждений, индуцированных хирургическим разрушением медиального мениска у собак после двухнедельных дозирования, начатого в 4-й день (каждая по 1,5 мкг/дозу или 15 мкг/дозу), или однократной 30 мкг-дозы, вводимой в 7-й день только.

### Подробное описание

Изобретение основано, по меньшей мере, частично на идентификации ангиопоэтин-подобных 3 (ANGPTL3) полипептидов, которые стимулируют хондроцитную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и которые устойчивы к расщеплению протеазами (например, трипсин-подобными протеазами). WO 2011/008773 описывает ANGPTL3-пептидные композиции и применение пептидных композиций для лечения или профилактики артрита и повреждений суставов и для индуцирования дифференцировки мезенхимных клеток в хондроциты. Мы обнаружили, что ANGPTL3-белки дикого типа подвергаются протеазному обрезанию и нестабильности, и идентифицировали варианты последовательности, чтобы уменьшить этот эффект. Настоящее изобретение, таким образом, предоставляет улучшенные пептидные композиции для восстановления хряща. В частности, предоставляются ANGPTL3-пептиды, модифицированные в соответствии с настоящим изобретением для увеличения протеаза-устойчивости по сравнению с полипептидом ANGPTL3 дикого типа. Также предлагаются композиции и способы введения ANGPTL3-полипептидов, чтобы предотвратить или смягчить артрит или травму сустава с помощью введения полипептида по изобретению в сустав, хрящевую ткань или хрящевую проксимальную ткань, или системно. Далее, изобретение предоставляет составы и способы для индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты.

#### Определения.

Термин "протеаза-устойчивый" в настоящем документе обозначает полипептид, включающий модификацию, которая предоставляет полипептид, менее чувствительный к расщеплению трипсин-подобной протеазы, чем соответствующий немодифицированный полипептид дикого типа. В конкретных вариантах осуществления протеаза-устойчивый полипептид представляет собой полипептид ANGPTL3, который имеет аминокислотную замену относительно природной пептидной последовательности дикого типа, на остаток R или K.

"ANGPTL3" относится к члену семейства ангиопоэтиновых белков. Аминокислотная последовательность ANGPTL3 (входящий номер GenBank No. NP\_055310.1) изложена в SEQ ID NO:1; и соответствующая полинуклеотидная последовательность которой изложена как SEQ ID NO:2 (номер NCBI референсной последовательности NM014495.2, где кодирующая последовательности ANGPTL3 содержит нуклеотиды 52-1434 SEQ ID NO:2). "Полипептид ANGPTL3" относится к природному экспрессируемому полипептиду. Для целей настоящего раскрытия нумерация аминокислоты, как правило, определяется с учетом полной длины полипептидной последовательности ANGPTL3 дикого типа человека (как SEQ ID NO:1). Таким образом, в вариантах осуществления, в которых полипептид по изобретению содержит только с-концевую часть полноразмерного ANGPTL3, но не N-концевую части, хотя пептид состоит менее чем 460 аминокислот в длину, нумерация положений основывается на SEQ ID NO:1. Например, ссылка на положение 423 полипептида ANGPTL3 по изобретению относится к положению 423 SEQ ID NO:1, хотя полипептид ANGPTL3 по изобретению сам по себе может составлять только 200 аминокислот в длину. При определении аминокислоты в представляющей интерес последовательности из, которая "соответствует" положению в референсной последовательности, такой как как SEQ ID NO:1, это осуществляется с помощью оптимального выравнивания последовательностей, например, используя по умолчанию параметры выравнивания CLUSTAL или по умолчанию параметры выравнивания BLAST 2 и сравнения последовательности. Например, положение 423 в представляющей интерес последовательности, которое "определяется по отношению к SEQ ID NO:1", или аминокислота, которая "соответствует" положению 423 SEQ ID NO:1, означает аминокислоту, которая согласуется с положением 423 из SEQ ID NO:1 в случае, если представляющая интерес последовательность процентов оптимально выровнена с SEQ ID NO:1.

Термины "пептидомиметический" и "миметический" относятся к синтетическому химическому соединению, которое обладают в существенной степени теми же функциональными характеристиками, что и природный или не встречающийся в природе полипептид (например, ANGPTL3), но разными (хотя обычно подобными) структурными характеристиками. Пептидные аналоги обычно используются в области как непептидные активные соединения (например, лекарства) со свойствами, аналогичными тем, которые имеются у эталонного пептида. Такие непептидные соединения называются "пептидные миметики" или "пептидомиметики" (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)). Пептидные миметики, которые конструктивно сходны с терапевтически полезными пептидами, могут использоваться для того, чтобы произвести равноценный или усиленный терапевтический или профилактический эффект. Как правило, пептидомиметики структурно сходны с эталонным полипептидом (т.е. полипептидом, обладающим биологической или фармакологической активностью), например, обнаруженной у представляющего интерес полипептида, но имеют одну или несколько пептидных связей, необязательно замененных связью, выбранной из группы, включающей, например,  $-CH_2NH-$ ,  $-CH_2S-$ ,  $CH_2-CH_2-$ ,  $-CH=CH-$  (цис и транс),  $-COCH_2-$ ,  $-CH(OH)CH_2-$  и  $-CH_2SO-$ . Миметик может либо полностью состоять из синтетических, ненатуральных аналогов аминокислот, или представляет собой химерную молекулу частично природных пептидных аминокислот и частично ненатуральных аналогов аминокислот. Миметик может также включать любое количество консервативных замен натуральных аминокислот при условии, что такие замены также не-

существенно изменяют структуру и/или активность миметика. Например, композиция миметика находится в рамках изобретения, если он обладает хондрогенной активностью полипептида ANGPTL3.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Термины применяются для аминокислотных полимеров, в которых один или более аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также для природных аминокислотных полимеров и неприродных аминокислотных полимеров. Полипептиды, пептиды и белки по изобретению включают протеаза-устойчивые ANGPTL3-пептидомиметики, обладающие хондрогенной активностью.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и аминокислотным миметикам, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Природными являются те аминокислоты, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые затем были изменены, например гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированный пептидный остов, но сохраняют ту же базовую химическую структуру, что и у природной аминокислоты. Природно кодируемыми аминокислотами являются 20 общих аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин), а также пирролизин, пирролинкарбоксилизин и селеноцистеин.

"Консервативно модифицированные варианты" относится к последовательностям как аминокислот, так и нуклеиновых кислот. По отношению к конкретной последовательности нуклеиновых кислот консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или где нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность к, по существу, идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой заданный белок. Например, каждый из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодирует аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определяется кодоном, кодон может быть изменен на какой-либо из соответствующих кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой "молчащие вариации", которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариаций. Каждая полипептидная последовательность в настоящем документе, которая кодируется с помощью полинуклеотида, включает все возможные молчащие вариации нуклеиновой кислоты. Любой специалист в рассматриваемой области техники признает, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который является обычно единственным кодоном для метионина, и TGG, который является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован для получения функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Любой специалист признает, что отдельные замены, делеции или добавления к нуклеотидной, пептидной, полипептидной, белковой последовательности, которая изменяет, добавляет или удаляет одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот по сравнению с исходной кодируемой аминокислотной последовательностью, приводит к "консервативно модифицированному варианту", где изменение производит замену аминокислоты на химически сходную аминокислоту, и/или полипептидной последовательности, которая производит структурно сходный белок, имеющий сходную функциональную активность исходного белка. Таблицы консервативных замен, обеспечивающих функционально подобные аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению.

Термин "консервативные замены аминокислот" относится к замене (по существу или иначе) аминокислоты из одной такой группы другой аминокислотой из той же группы. Один из примеров замен основан на анализе нормированных частот аминокислотных изменений между соответствующими белками гомологичных организмов (см., например Schulz G.E. and R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). По данным такого анализа можно определить группы аминокислот, где аминокислоты внутри группы обмениваются преимущественно друг с другом и, следовательно, похожи друг на друга больше всего в их влиянии на общую структуру белка (см., например, Schulz G.E. and R.H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Один пример из набора аминокислотных групп, определенных таким образом, включает: (i) заряженную группы, состоящую из Glu and Asp, Lys, Arg и His; (ii) положительно заряженную группу, состоящую из Lys, Arg и His; (iii) отрицательно заряженную группу, состоящую из Glu и Asp; (iv) ароматическую группу, состоящую из Phe, Tyr и Trp; (v) группу азотного кольца, состоящую из His и Trp; (vi) большую алифатическую неполярную группу, состоящую из Val, Leu and Ile; (vii) слабо-полярную группу, состоящую из Met и Cys; (viii) группу небольших остатков, со-

стоящую из Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln и Pro; (ix) алифатическую группу, состоящую из Val, Leu, His, Met и Cys; и (x) небольшую гидроксильную группу, состоящую из Ser и Thr. Другие примеры консервативных замен, основанных на общих физических свойствах, являются замены в следующих группах: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

"Процент идентичности последовательности" определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения, при котором участок аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептидом по изобретению), которая не содержит добавлений или делеций, для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент высчитывается путем определения числа положений, на которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотных остатков находятся в обеих последовательностях, для получения числа совпавших положений, деленного на число совпавших положений в общем количестве положений в окне сравнения, и умножения результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют определенный процент остатков аминокислот или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. 95% идентичность, необязательно 96, 97, 98 или 99% идентичность на протяжении определенной области или, если он не указан, на протяжении всей последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения, или желательного участка, определяемого с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального исследования. Изобретение предоставляет полипептиды, которые являются существенно идентичными полипептидам, соответственно, служащим примером в настоящем документе (например, любой из SEQ ID NOs: 11-42), а также использует их, в том числе, но без ограничения, для применения при лечении или профилактике артрита или травмы сустава. Дополнительно, для нуклеиновых кислот, идентичность имеет место на протяжении области по меньшей мере примерно 150 нуклеотидов в длину или, более предпочтительно, на протяжении области, составляющей от 300 до 450 или 600 или более нуклеотидов в длину или всю длину эталонной последовательности. Для аминокислотной последовательности, необязательно, идентичность имеет место на протяжении области, составляющей по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот в длину или, более предпочтительно, на протяжении области, составляющей от 100 до 150 или 200 и более аминокислот в длину или всю длину эталонной последовательности.

При сравнении последовательностей обычно одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравниваются тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонную последовательности вводят в компьютер, обозначают координаты подпоследовательностей в случае необходимости и задают параметры программы алгоритма последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию, или могут быть определены альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы.

"Окно сравнения", как используется в настоящем документе, включает ссылку на сегмент любого ряда последовательных положений, выбранного из группы, включающей от 50 до 600, как правило, примерно от 75 до примерно 200, более обычно примерно от 100 до примерно 150, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью из такого же числа смежных положений после того, как две последовательности оптимально выровнены. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, путем алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, путем алгоритма гомологического выравнивания Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, путем поиска способом сходства Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, при помощи компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA) или путем ручного выравнивания и визуального рассмотрения (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995, приложение)).

Двумя примерами алгоритмов, пригодных для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids. Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 соответственно. Программное обеспечение для выполнения анализов BLAST публично доступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм предполагает, в первую очередь, выявление высокорезультативных пар у последовательностей (HSP) путем идентификации коротких

слов длиной  $W$  в последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительно оцененному проходному баллу  $T$  при выравнивании со словом той же длины в последовательности базы данных.  $T$  называется порогом оценки соседних слов (Altschul et al., выше). Эти первоначальные совпадения соседних слов выступают в качестве затравок для иницирующих поисков, чтобы найти более длинные HSP, их содержащие. Совпадения слов распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный балл выравнивания может увеличиваться. Совокупные баллы рассчитываются с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (наградной балл для пары совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (штрафной балл за несоответствие остатков; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей оценочные таблицы используются для расчета суммарного балла. Распространение совпадений слов в каждом направлении прекращается в случае, когда совокупный балл выравнивания снижается на количество  $X$  от своего максимального достигнутого значения; совокупный балл достигает нуля или ниже, из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигается конец любой последовательности. Параметры  $W$ ,  $T$  и  $X$  алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используется длина слова ( $W$ ) 11, ожидание ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP по умолчанию использует длину слова 3 и ожидание ( $E$ ) 10 и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) выравнивания ( $B$ ) 50, ожидание ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Одним из критериев сходства, предусмотренных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей ( $P(N)$ ), которая обеспечивает индикацию вероятности, по которой сопоставление двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей могло бы произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота рассматривается аналогично эталонной последовательности, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислоты составляет менее чем примерно 0,2, более предпочтительно менее чем примерно 0,01 и, наиболее предпочтительно, менее чем примерно 0,001.

Термин "выделенный" в случае применения к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок очищается, чтобы быть, по существу, свободной от других клеточных компонентов, с которыми она(он) связан в природном состоянии. Часто она(он) находится в однородном или почти однородном состоянии. Она(он) может быть либо сухой, либо находиться в водном растворе. Чистота и однородность может быть определена с использованием способов аналитической химии, известных и, как правило, используемых в рассматриваемой области техники, например гель-электрофорез в полиакриламидном геле, высокоэффективная жидкостная хроматография и др. Белок, который является преобладающим видом, присутствующим в препарате, является в существенной степени очищенным. Термин "очищенный" в некоторых вариантах осуществления обозначает, что белок образует, в основном, одну полосу на электрофорезном геле. Как правило, это означает, что белок, является, по меньшей мере, 85% чистоты, более предпочтительно по меньшей мере 95% чистоты и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 99% чистоты.

Термин "гиалуроновая кислота" используются в настоящем документе для включения производных гиалуроновой кислоты, которые включают сложные эфиры гиалуроновой кислоты, соли гиалуроновой кислоты, а также включает в себя термин гиалуронан. Обозначение также включает как низко-, так и высокомолекулярные формы гиалуронанов и сшитых гиалуронанов или ксиланов. Примерами таких гиалуронанов являются Synvisc™ (Genzyme Corp. Cambridge, Массачусетс), ORTHOVISC™ (Anika Therapeutics, Уорберн, Массачусетс), HYALGAN™ (Sanofi-Synthelabo Inc., Малверн, Пенсильвания) и Pro Vise (Alcon/No vartis).

Ангиопоэтин-подобные 3 протеаза-устойчивые полипептиды.

Ангиопоэтин-подобный 3 является членом ангиопоэтин-подобного семейства секретируемых факторов. Он преимущественно экспрессируется в печени и имеет характерную структуру ангиопоэтинов, состоящих из сигнального пептида, N-концевого биспирального домена (CCD) и C-концевого фибриноген(FBN)-подобного домена. Ангиопоэтин-подобный 3, как было показано, связывается с  $\alpha V/\beta 3$  интегринами, и самого по себе FBN-подобного домена было достаточно, чтобы индуцировать адгезию эндотелиальных клеток и ангиогенез *in vivo* (Camenisch et al., J. Biol. Chem. 277: 17281-17290, 2002). Эндогенные ANGPTL3 обычно расщепляются *in vivo* на аминоконцевой и карбоксиконцевой фрагменты. Как кратко изложено выше и далее описано в этом документе, изобретение предусматривает применение различных протеаза-устойчивых ANGPTL3-белков, обладающих хондрогенной активностью.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичность или по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из последовательностей в табл. 1, отличающаяся тем, что полипептид содержит аминокислоту, которая является полярной





ID NO:41, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 или SEQ ID NO:70. В дополнительном варианте полипептид представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 или SEQ ID NO:64.

Таблица 1 Конструкции вариантов ANGPTL3

<u>SEQ ID</u>	<u>Конструкция</u>	<u>Последовательность</u>
<u>14</u>	<u>207KQ</u>	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>15</u>	<u>207KS</u>	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>16</u>	<u>225KQ</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>17</u>	<u>225KS</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>18</u>	<u>225ST</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKTKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE

<u>19</u>	<u>226KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>20</u>	<u>226KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>21</u>	<u>228KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE WKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTDSESFE
<u>22</u>	<u>228KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE WKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTDSESFE
<u>23</u>	<u>228ST</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE WKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAKTKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTDSESFE
<u>24</u>	<u>233KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQ RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>25</u>	<u>233KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQ RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>26</u>	<u>241KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>27</u>	<u>241KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>28</u>	<u>242KQ</u>	IIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
<u>29</u>	<u>242KS</u>	IIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE EDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE

<u>30</u>	<u>225-455KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGDFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHYYEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTD
<u>31</u>	<u>225-455KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGDFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHYYEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTD
<u>32</u>	<u>22 6-455KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGDFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIEL EDWKDNKHYYEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD
<u>33</u>	<u>226-455KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGDFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIEL EDWKDNKHYYEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD
<u>34</u>	<u>228-455KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGDFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELED WKDNKHYYEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTD

<u>35</u>	<u>228-455KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELED WKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTD
<u>36</u>	<u>233-455KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNK HYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIH PTD
<u>37</u>	<u>233-455KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNK HYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIH PTD
<u>38</u>	<u>241-455KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFY LGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>39</u>	<u>241-455KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFY LGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>40</u>	<u>242-455KQ</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFY LGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>41</u>	<u>242-455KS</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFY LGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
<u>58</u>	<u>207Kde1</u>	IQEPTEISLSSKPRAPRTTFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAI RPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGL EKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNA IPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESE

<u>59</u>	<u>225Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESEFE
<u>60</u>	<u>226Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE EDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK TKMLIHPTDSESEFE
<u>61</u>	<u>228Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESEFE
<u>62</u>	<u>233Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESEFE
<u>63</u>	<u>241Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESEFE
<u>64</u>	<u>242Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESEFE
<u>65</u>	<u>225- 455Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHICAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD
<u>66</u>	<u>226- 455Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK TKMLIHPTD
<u>67</u>	<u>228-455Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD

68	<u>233-455Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP TD
69	<u>241-455Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY LGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWH DECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
70	<u>242-455Kdel</u>	I PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFY GNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWH DECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

Модифицированные полипептиды ANGPTL3 по изобретению имеют по меньшей мере одну замену в С-концевой части полипептида, чтобы сделать полипептид протеаза-устойчивым. Замена имеет место по остаткам R или K, так что полипептиды обладают повышенной устойчивостью, например, к трипсиноподобным протеиназам. Любая аминокислота может быть заменена на R или K в протеаза-устойчивом полипептиде ANGPTL3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой полярную аминокислоту, например H, N, Q, S, T, A или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой H, N, Q, S, T или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой S или Q. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивый пептид содержит аминокислоту в положении 423, по отношению к SEQ ID NO:1, которая отлична от K или R. В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению содержит аминокислоту в положении 423, которая является полярной аминокислотой. Например, аминокислота в положении 423 может представлять собой Q или S или другую полярную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению имеет Q в положении 423. В других вариантах осуществления полипептид по изобретению имеет S в положении 423. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к замене в 423, протеаза-устойчивый пептид имеет замену другого R или K в С-конце SEQ ID NO:1 или ее варианте, при которой замена представляет собой полярную аминокислоту, отличную от R или K. В некоторых вариантах осуществления замена в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1, представляет собой Q или S. Еще в других вариантах осуществления полипептид по изобретению имеет делецию в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению составляет 250 аминокислот или меньше в длину и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 или SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления изобретение предоставляет применение полноразмерных протеаза-устойчивых, хондрогенных белков ANGPTL3. В некоторых вариантах осуществления изобретение предоставляет протеаза-устойчивые белки ANGPTL3, содержащие С-концевую часть последовательности ANGPTL3, или ее хондрогенный вариант. В определенных вариантах осуществления у белков ANGPTL3 отсутствует аминокислотный терминальный конец нативного белка. В некоторых вариантах осуществления у протеаза-устойчивых белков ANGPTL3 по изобретению отсутствует домен CCD и/или отсутствует существенная CCD-активность. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивые белки ANGPTL3 по изобретению включают, по меньшей мере, фрагмент (например по меньшей мере 100, 150, 200, 220 или 215 смежных аминокислот) карбоксиконцевого домена белка ANGPTL3 человека, или в существенной степени идентична последовательности карбоксиконцевой последовательности белка ANGPTL3 человека, где полипептид и его варианты сохраняет хондрогенную активность. В некоторых вариантах осуществления у протеаза-устойчивого полипептида по изобретению отсутствует по меньшей мере часть С-терминальной последовательности, например, отсутствует 5, 10, 15 или 20 аминокислот с С-терминального конца SEQ ID NO:1 (т.е. отсутствуют 456-460, 451-460, 446-460 или 441-460 в SEQ ID NO:1).

В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивый полипептид ANGPTL3 по изобретению содержит смежные аминокислоты, соответствующие аминокислотным участкам: аминокислоты 241-455 или 241-460 из SEQ ID NO:1; аминокислоты 242-455 или 242-460 из SEQ ID NO:1; аминокислоты 233-455 или 233-460 из SEQ ID NO:1; аминокислоты 228-455 или 228-460 из SEQ ID NO:1, аминокислоты 226-455 или 226-260 или аминокислоты 225-455 или 225-260 из SEQ ID NO:1, в которой аминокис-

лота заменяется на R или K или один остаток делегирован. В некоторых вариантах осуществления замены содержится в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления содержится делеция в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивый полипептид содержит смежные аминокислоты, соответствующие аминокислотным областям 207-455 или 207-460 из SEQ ID NO:1, в которой аминокислота заменена на R или K, или один остаток делегирован. В некоторых вариантах осуществления замена или делеция содержится в положении 423. В некоторых вариантах осуществления замена является полярной аминокислотой, например H, N, Q, S, T, A или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой H, N, Q, S, T или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой S или Q. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления, включена делеция в положении 423 относительно SEQ ID NO:1.

Изобретение дополнительно предоставляет протеаза-устойчивый полипептид, при этом полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность, или по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичность с аминокислотами 240-454 из SEQ ID NO:1, аминокислотами 241-455 из SEQ ID NO:1 или аминокислотами 242-455 из SEQ ID NO:1 с заменой или делецией по аминокислоте, соответствующей положению 423 из SEQ ID NO:1, где замещенной аминокислотой является не R, и где полипептид обладает хондрогенной активностью. В других вариантах осуществления полипептид включает аминокислоты 240-454 из SEQ ID NO:1, аминокислоты 241-455 из SEQ ID NO:1 или аминокислоты 242-455 из SEQ ID NO:1, каждый полипептид с заменой или делецией по аминокислоте, соответствующей положению 423 SEQ ID NO:1, где замещенной аминокислотой является Q или S.

В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивый полипептид ANGPTL3 по изобретению содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотами аминокислотами 242-455 или 242-460 из SEQ ID NO:1; 241-455 или 241-460 из SEQ ID NO:1; аминокислотами 233-455 или 233-460 из SEQ ID NO:1; аминокислотами 228-455 или 228-460 из SEQ ID NO:1, аминокислотами 226-455 или 226-260 из SEQ ID NO:1, или аминокислотами 225-455 или 225-260 из SEQ ID NO:1, в котором аминокислота заменена на R или K, или R или K делегированы. В некоторых вариантах осуществления замена или делеция содержится в положении 423. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой полярную аминокислоту, например H, N, Q, S, T, A или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой H, N, Q, S, T или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой S или Q. В некоторых вариантах осуществления, замена представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления содержится делегированный остаток в положении 423 относительно SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивый полипептид ANGPTL3 по изобретению составляет 250 или 240 или меньше аминокислот в длину и содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 и SEQ ID NO:70. В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивый полипептид ANGPTL3 по изобретению составляет 230 или 225 или меньше аминокислот в длину и содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 или SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивые белки ANGPTL3 по изобретению включают аминокислотные последовательности, имеющие, по меньшей мере 95% идентичность, или, по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичность с C-концевой последовательностью белка ANGPTL3 собаки, быка или лошади. В некоторых вариантах осуществления протеаза-устойчивые белки ANGPTL3 по изобретению включают, по меньшей мере, фрагмент (например, по меньшей мере 100, 150, 200, 215 смежных аминокислот) последовательности нативного белка ANGPTL3 собаки (SEQ ID NO:4), лошади (SEQ ID NO:5) или быка (как SEQ ID NO:6), или последовательности, в существенной степени идентичной последовательности нативного белка ANGPTL3 собаки, быка или лошади, где полипептид включает аминокислоту, которая является полярной аминокислотой, отличной от K или R в положении 423, или полипептид содержит делецию в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1, и полипептид обладает хондрогенной активностью. В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность, или по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичность с SEQ ID NO:42 и SEQ ID NO:43, где полипептид включает аминокислоту, которая является полярной аминокислотой, отличной от K или R в положении 423, или полипептид содержит делецию в положении 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1, и полипептид обладает хондрогенной активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид





нию содержит смежные аминокислоты, соответствующие аминокислотным областям: аминокислоты 241-455 из SEQ ID NO:6; аминокислоты 233-455 из SEQ ID NO:6; аминокислоты 228-455 из SEQ ID NO:6 или аминокислоты 225-455 из SEQ ID NO:6, в котором аминокислота заменена на R или K, или содержится делеция R или K. В некоторых вариантах осуществления замена или делеция находится в положении 422 в SEQ ID NO:6 (которая является положением 423, как определено по отношению к SEQ ID NO:1). В некоторых вариантах осуществления замена является полярной аминокислотой, например H, N, Q, S, T, A или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой H, N, Q, S, T или Y. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой S или Q. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой Q. В некоторых вариантах осуществления имеется делеция находится в положении 422 в SEQ ID NO:6.

Белки ANGPTL3 по изобретению, как описано выше, может включать природные последовательности белка ANGPTL3, фланкирующие области, описанные выше. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления белки ANGPTL3 по изобретению могут включать фланкирующие последовательности белка ANGPTL3, отличные от природных. Например, хондрогенно-активная часть белка ANGPTL3 может быть слита с одним или несколькими партнерами по слиянию и/или гетерологичными аминокислотами с образованием слитого белка. Последовательности партнеров по слиянию могут включать, в качестве неограничивающих примеров, аминокислотные теги, аминокислоты, отличные от L-аминокислот (например, D-аминокислоты) или другие аминокислотные миметики для продления *in vivo* времени полужизни и/или протеазной устойчивости, нацеливания последовательностей или других последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению является ПЭГилированным. В некоторых вариантах осуществления полипептид по изобретению слит с гетерологичным пептидом. В определенных вариантах осуществления полипептид слит с любым из человеческого сывороточного альбумина (HSA), константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), полигистидина, глутатион-S-трансферазы (GST), тиоредоксина, белка A, белка G, мальтоза-связывающего белка (MBP) или фрагментом любого из вышеперечисленных гетерологичных полипептидов(а). В конкретных вариантах осуществления гетерологичный полипептид слит с амино-терминальным концом полипептида по изобретению. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления гетерологичный полипептид слит с карбокси-терминальным концом полипептида по изобретению.

Белки ANGPTL3 по изобретению имеют хондрогенную активность и являются протеаза-устойчивыми. Как определено в настоящем документе, хондрогенез или хондрогенная активность относится к развитию хондроцитов из MSC. Индикаторы хондрогенной активности включают, без ограничения, продуцирование хрящевого матрикса. Продуцирование хрящевого матрикса может быть измерено с помощью различных маркеров, например таких как Sox9, коллагена II типа или продуцирование гликозаминогликанов (ГАГ). В некоторых вариантах осуществления продуцирование ГАГ измеряется как маркер продуцирования хрящевого матрикса. В некоторых вариантах осуществления 3-кратное увеличение продуцирования ГАГ при помощи экспрессии хрящ-специфического белка указывает на положительное продуцирование хрящевого матрикса.

Полипептид можно оценить на протеазную устойчивость, используя любой известный тест, который определяет расщепление с помощью сериновой протеазы, такой как трипсин. В некоторых вариантах осуществления протеазы, используемые для оценки протеолиза восприимчивость является сериновая протеаза трипсин. Полипептид считается протеаза-устойчивым, если он имеет пониженную чувствительность к трипсину, по сравнению с аналогом дикого типа. Пример анализа заключается в измерении количества расщепленного продукта, который образуется, когда полипептид подвергается воздействию трипсина в течение определенного периода времени, по сравнению с соответствующим природным пептидом человека. Расщепление можно определить с помощью любого известного анализа, например, электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и LCMS. Иллюстративный анализ приводится в разделе "Примеры".

В иллюстративном анализе ограниченный протеолиз путем проведения трипсинолиза осуществляется путем инкубации 10 нг белка, подлежащего оцениванию, с трипсином при массовом соотношении 8000:1 (белок:трипсин) в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию трипсинолиза можно затем гасить добавлением уксусной кислоты, чтобы довести реакцию до pH 3,0. Загашенные образцы затем разделяли и анализировали способом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, например в 4-12% трис-бис геле для идентификации белков, которые устойчивы к расщеплению, от тех, которые расщепляются с появлением фрагмента, который образуется путем расщепления трипсином. Продукт расщепления отсутствует или снижен в протеаза-устойчивых полипептидах по сравнению с их аналогами дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды ANGPTL3 по изобретению включают по меньшей мере одну природно не кодируемую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит 1, 2, 3, 4 или более не встречающихся в природе аминокислот. Способы получения и встраивания не встречающейся в природе аминокислоты в белок известны. См., например, патенты США № 7083970; и 7524647. Общие принципы производства ортогональных систем трансляции, которые подходят для создания белков, которые содержат одну или более желаемых не встречающихся в природе

аминокислот, известны в данной области техники, так как являются общими способами получения ортогональных систем трансляции. Например, см. номера международных публикаций WO 2002/086075, озаглавленной "METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINO ACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS"; WO 2002/085923, озаглавленной "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS"; WO 2004/094593, озаглавленной "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE"; WO 2005/019415, поданной 7 июля 2004; WO 2005/007870, поданной 7 июля 2004; WO 2005/007624, поданной 7 июля 2004; WO 2006/110182, поданной 27 октября 2005, озаглавленной "ORTHOGONAL TRANSLATION COMPONENTS FOR THE VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS" и WO 2007/103490, поданной 7 марта 2007, озаглавленной "SYSTEMS FOR THE EXPRESSION OF ORTHOGONAL TRANSLATION COMPONENTS IN EUBACTERIAL HOST CELLS". Для обсуждения ортогональных систем трансляции, которые включают не встречающиеся в природе аминокислоты, и способы их производства и применения, см. также Wang and Schultz, (2005) "Expanding the Genetic Code" *Angewandte Chemie Int. Ed.* 44: 34-66; Xie and Schultz, (2005) "An Expanding Genetic Code" *Methods* 36: 227-238; Xie and Schultz, (2005) "Adding Amino Acids to the Genetic Repertoire" *Curr. Opin. in Chemical Biology* 9: 548-554; и Wang, et al., (2006) "Expanding the Genetic Code" *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35: 225-249; Deiters et al., (2005) "In vivo incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli*" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15: 1521-1524; Chin et al., (2002) "Addition of p-Azido-L-phenylalanine to the Genetic Code of *Escherichia coli*" *J. Am. Chem. Soc.* 124: 9026-9027; и международную публикацию № WO 2006/034332, поданную 20 сентября 2005. Дополнительные подробности обнаруживаются в патентах США № 7045337; 7083970; 7238510; 7129333; 7262040; 7183082; 7199222 и 7217809. "Природно не кодируемая аминокислота" означает аминокислоту, которая не является одной из обычных аминокислот или пирролизин, пирролинкарбоксилизином или селеноцистеином. Другими терминами, которые могут использоваться синонимично с термином "природно не кодируемая аминокислота", являются "ненатуральная аминокислота", "неприродная аминокислота", "не встречающаяся в природе аминокислота" и различные их версии с дефисом и без него. Термин "природно не кодируемая аминокислота" также включает, без ограничения, аминокислоты, которые возникают путем модификации (например, посттрансляционные модификации) природно кодируемой аминокислоты (включая, без ограничения, 20 обычных аминокислот или пирролизин, пирролинкарбоксилизин или селеноцистеин), но сами природно не включаются в растущую цепь полипептида при помощи трансляционного комплекса. Неограничивающие примеры таких не встречающихся в природе аминокислот включают N-ацетилглюкозаминил-L-серин, N-ацетилглюкозаминил-L-треонин и O-фосфотирозин.

Природно не кодируемая аминокислота обычно обладает любой структурой, имеющей любую замещающую боковую цепь, отличную от тех, которые используются в двадцати природных аминокислотах. Поскольку природно не кодируемые аминокислоты по изобретению, как правило, отличаются от природных аминокислот только структурой боковой цепи, природно не кодируемые аминокислоты образуют амидные связи с другими аминокислотами, включая, в качестве неограничивающих примеров, природно или неприродно кодируемые, в том же порядке, в котором они формируются в природных полипептидах. При этом природно не кодируемые аминокислоты имеют группы боковой цепи, которые отличаются их от природных аминокислот. Например, R необязательно включает алкил-, арил-, ацил-, кето-, азидо-, гидроксил-, гидразин-, циано-, гало-, гидразид, алкенил, алкинил, простой эфир, тиол, селено-, сульфонил-, борат, боронат, фосфо, фосфоно, фосфин, гетероциклическая, энон, имин, альдегид, сложный эфир, тиокислоту, гидроксилламин, аминогруппу или тому подобное или любые их сочетания. Другие не встречающиеся в природе аминокислоты, представляющие интерес, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении, включают, в качестве неограничивающих примеров, аминокислоты, содержащие фотоактивируемый кросс-линкер, спин-меченые аминокислоты, флуоресцентные аминокислоты, металл-связывающие аминокислоты, металл-содержащие аминокислоты, радиоактивные аминокислоты, аминокислоты с новыми функциональными группами, аминокислоты, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами, фотозапираемые и/или фотоизомеризуемые аминокислоты, аминокислоты, которые содержат биотин или аналог биотина, гликозилированные аминокислоты, такие как серин с замещенным сахаром, других аминокислоты с модифицированными углеводами, кето-содержащие аминокислоты, аминокислоты, содержащие полиэтиленгликоль или полиэфир, аминокислоты с замещенным тяжелым атомом, химически расщепляемые и/или фоторазрушаемые аминокислоты, аминокислоты с удлиненной боковой цепью по сравнению с природными аминокислотами, включая, в качестве неограничивающих примеров, полиэферы или длинноцепочечные углеводороды, включающие, в качестве неограничивающих примеров, больше, чем примерно 5 или больше, чем примерно 10 атомов углерода, углерод-связанные сахаросодержащие аминокислоты, редокс-активные аминокислоты, аминотиокислот-содержащие аминокислоты и аминокислоты, содержащие одну или более токсичных функциональных групп.

Типичные природно не кодируемые аминокислоты, которые могут быть пригодны для использования в настоящем изобретении и которые полезны для реакций с водорастворимыми полимерами, включают, в качестве неограничивающих примеров, таковые с карбонильной, аминоксидной, гидразиновой, гидразидной, семикарбазидной, азидной и алкинной реакционноспособными группами. В некоторых вари-

антах осуществления природно не кодируемые аминокислоты содержат сахаридную функциональную группу. Примеры таких аминокислот включают N-ацетил-L-глюкозаминил-L-серин, N-ацетил-L-галактозаминил-L-серин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-треонин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-аспарагин и O-маннозил-L-серин. Примеры таких аминокислот включают также примеры, где природные N- или O-связь между аминокислотой и сахаридом заменяется ковалентной связью, не часто встречающейся в природе, в том числе в качестве неограничивающих примеров, алкен, оксим, тиозфир, амид и тому подобное. Примеры таких аминокислот включают также сахараиды, которые обычно не встречаются в природных белках, такие как 2-дезоксиглюкоза, 2-дезоксигалактоза и тому подобное.

Другой тип модификации, которую можно дополнительно вводить в белки ANGPTL3 по изобретению (например, в пределах полипептидной цепи или на N- или C-конец), например, для продления *in vivo* времени полужизни, является ПЭГилирование или включение длинноцепочечных полимеров полиэтиленгликоля (ПЭГ). Введение ПЭГ или длинноцепочечных полимеров ПЭГ увеличивает эффективную молекулярную массу полипептидов, присутствующих, например, для предотвращения быстрой фильтрации в мочу. В некоторых вариантах осуществления остаток лизина в последовательности ANGPTL3 конъюгирован с ПЭГ непосредственно или через линкер. Такой линкер может представлять собой, например, остаток Glu или ацильный остаток, содержащие тиоловые функциональные группы для связывания с соответствующим образом модифицированной цепью ПЭГ. Альтернативным способом введения цепи ПЭГ является введение сначала остатка Cys в C-конец полипептидной цепи или в гидрофильные остатки, такие как замены по остаткам Arg или Lys. Этот остаток Cys затем сайт-специфически присоединяют к цепи ПЭГ, заключающей, например, малеимидную функцию. Способы включения ПЭГ или длинноцепочечных полимеров ПЭГ известны в рассматриваемой области техники (описанный, например, в Veronese F.M. et al., *Drug Disc. Today* 10: 1451-8 (2005); Greenwald R.B. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 217- 50 (2003); Roberts M.J. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54: 459-76 (2002)), содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Другие способы полимерных конъюгатов, известные в данной области техники, могут также использоваться в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, поли(2-метакрилоилоксиэтил фосфорилхолин) (PMPC) вводится в качестве полимерного конъюгата с белками ANGPTL3 по изобретению (см., например, WO 2008/098930; Lewis et al., *Bioconjug Chem.*, 19: 2144-55 (2008)). В некоторых вариантах осуществления в фосфорилхолин-содержащие полимерные конъюгаты с белками ANGPTL3 могут быть использованы в настоящем изобретении. Специалист в рассматриваемой области техники признает, что другие биосовместимые полимерные конъюгаты могут быть использованы.

Описанный ранее альтернативный подход для включения ПЭГ или полимеров ПЭГ через включение ненатуральных аминокислот (как описано выше) может быть осуществлен с настоящими полипептидами. Этот подход использует эволюционирующую пару тРНК/тРНК-синтетазы и кодируется экспрессионной плазмидой при помощи амбер-супрессорного кодона (Deiters A. et al. (2004). *Bio-org. Med. Chem. Lett.* 14, 5743-5). Например, p-азидофенилаланин можно включать в настоящие полипептиды и затем проводить в реакцию с полимером ПЭГ, обладающего ацетиленовым радикалом, в присутствии восстановителя и ионов меди для облегчения органической реакции, известной как "Хуисген[3+2]циклоприсоединение".

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предусматривает конкретные мутации белков ANGPTL3, с тем чтобы изменить гликозилирование полипептида. Такие мутации могут быть отобраны так, чтобы ввести или устранить один или более сайтов гликозилирования, включая, в качестве неограничивающих примеров, O-связанные или N-связанные сайты гликозилирования. В определенных вариантах осуществления белки ANGPTL3 по настоящему изобретению имеют сайты гликозилирования и структуры без изменений по отношению к природным белкам ANGPTL3. В определенных вариантах осуществления вариант белков ANGPTL3 включает вариант гликозилирования, в котором число и/или тип сайтов гликозилирования были изменены по отношению к природным белкам ANGPTL3. В определенных вариантах вариант полипептида содержит большее или меньшее число N-связанных сайтов гликозилирования по сравнению с природным полипептидом. Сайт N-связанного гликозилирования характеризуется последовательностью: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, в котором аминокислотный остаток, обозначенный как X, может представлять собой любой аминокислотный остаток, кроме пролина. Замена аминокислотных остатков для создания этой последовательности обеспечивает потенциальный новый сайт для добавления N-связанной углеводной цепи. Кроме того, замены, которые устраняют эту последовательность, удалят существующую N-связанную углеводную цепь. В определенных вариантах осуществления обеспечивается перестановка N-связанных углеводных цепей, где один или более N-связанных сайтов гликозилирования (обычно те, которые являются природными) устраняются и создаются один или более новых N-связанных сайтов.

Типичные варианты белков ANGPTL3 включают варианты цистеина, в которых один или более остатков цистеина удалены или заменены на другую аминокислоту (например, серин) по отношению к аминокислотной последовательностью природных белков ANGPTL3. В определенных вариантах осуществления цистеиновые варианты могут быть полезны, если белки ANGPTL3 должны быть повторно свернуты в биологически активную конформацию, например после выделения нерастворимых тел вклю-

чения. В определенных вариантах осуществления цистеиновые варианты имеют меньше остатков цистеина, чем природный полипептид. В определенных вариантах осуществления цистеиновые варианты содержат четное число остатков цистеина для минимизации взаимодействий, вытекающих из непарных цистеинов.

В некоторых вариантах осуществления функциональные варианты или модифицированные формы белков ANGPTL3 включают слитые белки белка ANGPTL3 по изобретению и один или более сливных доменов. Известные неограничивающие примеры сливных доменов включают полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, белок А, белок G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), мальтоза-связывающий белок (MBP) и/или сывороточный альбумин человека (HSA). Сливной домен или его фрагмент может быть выбран так, чтобы придать желаемое свойство. Например, некоторые сливные домены являются особенно полезными для выделения слитых белков с помощью аффинной хроматографии. Для аффинной очистки используются соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как глутатион-, амилаза- и никель- или кобальт-конъюгированные смолы. Множество таких матриц доступны в форме "наборов", таких как система очистки Pharmacia GST и система QLAexpress™ (Qiagen), применимая для (HIS<sub>6</sub>) партнеров по слиянию. В качестве другого примера сливной домен может быть выбран таким образом, чтобы облегчить детектирование белков ANGPTL3. Примеры таких детекционных доменов включают различные флуоресцентные белки (например, GFP), а также "эпитопные теги", которые, как правило, представляют собой короткие пептидные последовательности, для которых доступны специфические антитела. Известные эпитопные теги, для которых легкодоступны специфические моноклональные антитела, включают теги FLAG, гематоглинин вируса гриппа (HA) и с-тус. В некоторых случаях сливные домены имеют сайт расщепления протеазой, такой как сайт для фактора Ха или тромбина, который позволяет соответствующей протеазе частично расщеплять слитые белки и тем самым высвобождать оттуда рекомбинантные белки. Освобожденные белки могут быть отделены от сливного домена путем последующего хроматографического разделения. В определенных вариантах осуществления белок ANGPTL3 слит с доменом, который стабилизирует белок ANGPTL3 *in vivo* ("стабилизирующий" домен). По "стабилизацией" понимается все, что увеличивает время полужизни в сыворотке крови, независимо от того, является ли это следствием уменьшения деструкции, уменьшения выведения почками или другим фармакокинетическим эффектом. Слияния с Fc-частью иммуноглобулина, как известно, придают желательные фармакокинетические свойства широкому спектру белков. Кроме того, слияния человеческого сывороточного альбумина может придавать желательные свойства. Другие типы сливных доменов, которые можно выбрать, включают мультимеризированные (например, димеризированные, тетрамеризированные) домены и функциональные домены (что придает дополнительную биологическую функцию, по желанию). Слияния могут быть сконструированы таким образом, чтобы гетерологичный пептид был слит с аминоконца полипептида по изобретению и/или карбоксиконца полипептида по изобретению.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие ангиопозтин-подобные 3 протеаза-устойчивые полипептиды.

Изобретение также предоставляет нуклеиновые кислоты, кодирующие протеаза-устойчивые полипептиды по изобретению и векторы экспрессии и клетки-хозяева для экспрессии протеаза-устойчивого полипептида. В других аспектах изобретения предоставляет полинуклеотид, кодирующий полипептид по изобретению, и экспрессионные векторы и клетки-хозяева, включающие такой полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид оптимизирован для экспрессии в клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления изобретения предоставляет способ улучшения состояния или профилактики артрита или повреждение сустава у пациента-человека, включающий: введение в сустав пациента экспрессионного вектора, кодирующего полипептид по изобретению, после чего экспрессии полипептида приводит к улучшению состояния или предотвращает артрит или повреждение сустава у пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет артрит или повреждение сустава. В некоторых вариантах осуществления пациент не имеет, но находится в группе риска получения артрита или повреждения сустава. В некоторых вариантах осуществления артрит представляет собой остеоартрит, травматический артрит или аутоиммунный артрит.

Для экспрессии полипептидов по изобретению используют рутинные способы из области рекомбинантной генетики. Основные руководства, раскрывающие общие способы, использованные в этом изобретении, включают Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; серийные издания Ausubel et al. eds. (2007, с доработанным в 2010) *Current Protocols in Molecular Biology*, среди других известных в данной области техники.

Для экспрессии могут использоваться любые подходящие клетки-хозяева, известные в данной области техники, например клетки-хозяева млекопитающих, бактериальные клетки-хозяева, дрожжевых клетки-хозяева, клетки-хозяева насекомых и др. Как прокариотические, так и эукариотические системы экспрессии являются широко доступными. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная система представляет собой систему экспрессии клеток млекопитающих, такую как система экспрессии СНО-клеток. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть кодон-оптимизированной для облегчения экспрессии в желаемой клетке-хозяине.

Невирусные векторы и системы включают плазмиды и эписомные векторы, обычно включающие

экспрессионную кассету для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., Nat. Genet. 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, полезные для экспрессии полипептидов по изобретению в клетках млекопитающих (например, человека), включают рThi-oHis A, B & C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные в рассматриваемой области техники для экспрессии других белков. Полезные вирусные векторы включают, в качестве неограничивающих примеров, векторы на основе аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса НВР Эпштейна-Барра, вектор на основе вируса оспы кур, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV).

Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемой клетки-хозяина, в которой вектор будет экспрессироваться. Как правило, экспрессирующие векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими полипептид по изобретению. В некоторых вариантах осуществления используется индуцируемый промотор, чтобы предотвратить экспрессию встроенных последовательностей, кроме как при индуцирующих условиях. Индуцибельные промоторы включают, например, арабинозный, lacZ, металлотионеиновый промотор, глюкокортикоидные промоторы или промотор теплового шока. Кроме того, другие регуляторные элементы также могут быть включены для улучшения экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, например энхансеры, сайты связывания с рибосомой, последовательности терминации транскрипции и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению, может также включать последовательность, кодирующую последовательность сигнала секреции, так что полипептид секретруется из клетки-хозяина. Такая последовательность может быть предусмотрена в векторе или как часть нуклеиновой кислоты ANGPTL3, присутствующей в векторе.

Способы введения векторов экспрессии, содержащих представляющую интерес полинуклеотидную последовательность, варьируют в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию при помощи хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработка фосфатом кальция или электропорация может быть использована для других клеточных хозяев (см., обычно, Sambrook et al., выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, липосомо-опосредованную трансформацию, инъекции и микроинъекции, баллистические способы, вирусомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, незащищенную ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса, агент-усиливающее поглощение ДНК и трансдукция *ex vivo*. Для долгосрочного, высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков часто желательна стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют полипептиды по изобретению, могут быть подготовлены, используя экспрессирующие векторы по изобретению, которые содержат участок начала репликации вируса или эндогенные элементы экспрессии и селективируемый маркерный ген.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие протеаза-устойчивые полипептиды ANGPTL3 по изобретению, могут доставляться пациенту для лечения травмы или болезни, связанной суставами. Доставка таких нуклеиновых кислот может быть достигнуто с помощью любых средств, известных в данной области техники, но обычно выполняется с помощью прямой инъекции в пораженный сустав. В некоторых вариантах осуществления ДНК доставляется в виде незащищенной ДНК с помощью прямой инъекции в сустав. В некоторых вариантах осуществления используется вирусный вектор, включая, в качестве неограничивающих примеров, аденовирусный или аденовирус-ассоциированный вектор, вектор на основе вируса герпеса, вектор на основе вируса оспы кур или вектор на основе вируса коровьей оспы.

Способы лечебного применения полипептидов и показания.

Способы, описанные в изобретении, включают способ лечения индивидуума, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества полипептида по изобретению, отличающийся тем, что индивидуум имеет или существует риск повреждения суставов или артрит. Изобретение также предоставляет способ улучшения состояния или профилактики артрита или повреждения сустава у пациента-человека, включающий введение в сустав пациента композиции, содержащей эффективное количество полипептида по изобретению, таким образом, улучшения состояния или профилактики артрита или травмы сустава у пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет артрит или повреждение сустава. В некоторых вариантах осуществления человек не имеет, но находится в группе риска получения артрита или повреждения сустава. В некоторых вариантах осуществления артрит представляет собой остеоартрит, травматический артрит или аутоиммунный артрит. В некоторых вариантах осуществления вводимая композиция дополнительно содержит гиалуроновую кислоту.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты, включающий контактирование мезенхимальных стволовых клеток с достаточным количеством полипептида по изобретению, для индуцирования дифференцировки стволовых клеток в хондроциты. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют *in vivo*, и стволовые клетки присутствуют у пациента-человека.

Предполагается, что полипептиды, композиции и способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения, улучшения состояния или предотвращения любого вида повреждений суставного хряща (например, повреждений суставов или травмы), в том числе, например, повреждение, возникающее в результате травмирующего события или разрыва сухожилия или связки. В некоторых вариантах осуществления белки по изобретению вводят для предотвращения или уменьшения артрита или повреждения сустава, например в случае, когда существует генетическая или семейная анамнеза артрита или повреждения сустава или травмы сустава или до или во время операции на суставе. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, композиции и способы применяются для лечения повреждения суставов. В конкретных вариантах осуществления повреждение сустава представляет собой травматические поражение сустава. В других вариантах повреждение сустава представляет собой повреждение, возникающее от возраста или обездвиженности. Еще в других вариантах осуществления поражение сустава представляет собой повреждение, возникшее вследствие аутоиммунного расстройства. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды, композиции и способы по изобретению могут применяться для лечения, улучшения состояния или профилактики остеоартрита. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, композиции и способы применяют для уменьшения или предотвращения артрита у индивидуума с риском наличия или приобретения артрита. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, композиции и способы применяют для уменьшения или предотвращения повреждения суставов у индивидуума с риском наличия или приобретения повреждения суставов.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды, композиции и способы по настоящему изобретению обеспечивают способ стимуляции пролиферации хондроцитов и производства хряща в хрящевых тканях, которые были повреждены, например, вследствие травматического повреждения или хондропатии. В конкретных вариантах осуществления полипептиды, композиции и способы по настоящему изобретению полезны для лечения повреждений хряща в суставах, например на шарнирно-сочлененной поверхности, например в позвоночнике, плече, локте, запястье, суставах пальцев рук, тазобедренных, коленных, голеностопных суставах и суставах ног. Примеры заболеваний или расстройств, которые могут получить преимущество от лечения, включают остеоартрит, ревматоидный артрит, другие аутоиммунные заболевания или остеохондритные десиканы. Кроме того, повреждение хряща или разрушение происходит в результате определенных генетических или метаболических расстройств, нарушение развития хрящевой ткани часто наблюдается в формах карликовости у человека, и/или повреждение или разрушение хрящей часто является результатом реконструктивной хирургии; таким образом, полипептиды, композиции и способы были бы полезны в терапии этих пациентов, будь то сами по себе или в сочетании с другими подходами.

Далее предполагается, что полипептиды, композиции и способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения, улучшения или профилактики различных расстройств хряща и/или связанных с ними симптомы или последствия таких состояний. Типичные состояния или расстройства для лечения, улучшения и/или профилактики с помощью полипептидов, композиций и способов по изобретению, включая, в качестве неограничивающих примеров, системную красную волчанку, ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, артроз, остеохондроз, спондилоартропатии, синдром Элерса Данло, системный склероз (склеродермию) или заболевание сухожилий. Другие состояния или расстройства, которые могут получить преимущества от лечения полипептидами для улучшения связанных эффектов, включают идиопатические воспалительные миопатии (дерматомиозит, полимиозит), синдром Шегрена, системный васкулит, саркоидоз, аутоиммунную гемолитическую анемию (иммунную панцитопению, пароксизмальную ночную гемоглобинурию), аутоиммунную тромбоцитопению (идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, иммуно-опосредованную тромбоцитопению), тиреоидит (базедова болезнь, тиреоидит Хашимото, ювенильный лимфоцитарный тиреоидит, атрофический тиреоидит), сахарный диабет, иммуноопосредованное заболевание почек (гломерулонефрит, тубулоинтерстициальный нефрит), демиелинизирующие заболевания центральной и периферической нервной системы, такие как рассеянный склероз, идиопатическая демиелинизирующая полиневропатия или синдром Гийена-Барре и хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, гепатобилиарные заболевания, такие как инфекционный гепатит (гепатит А, В, С, D, E и другие негепатотропные вирусы), аутоиммунный хронический активный гепатит, первичный билиарный цирроз, гранулематозный гепатит и склерозирующий холангит, воспалительное заболевание кишечника (язвенный колит: болезнь Крона), глютенчувствительная энтеропатия и болезнь Уиппла, аутоиммунные или иммуно-опосредованные заболевания кожи, включая буллезные кожные заболевания, мультиформную эритему и контактный дерматит, псориаз, аллергические заболевания, такие как астма, аллергический ринит, атопический дерматит, пищевая аллергия и крапивница, иммунологические заболевания легких, такие как эозинофильные пневмонии, идиопатический фиброз легких и пневмонит гиперчувствительности, сопутствующие трансплантации заболевания, включая отторжение трансплантата и реакция трансплантат против хозяина.

"Пацент", как используется в настоящем документе, относится к любому индивидууму, которому вводят терапевтический полипептид по изобретению. Предполагается, что полипептиды, композиции и способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения млекопитающего. Как используется в настоящем документе, "индивидуум" относится к любому млекопитающему, включая лю-

дей, домашних и сельскохозяйственных животных, и зоопарк, спортивных или домашних животных, например крупный рогатый скот (например, коровы), лошади, собаки, овцы, свиньи, кролики, козы, кошки и др. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек. В определенных вариантах осуществления индивидуумом является лошадь. В других вариантах осуществления индивидуум представляет собой собаку.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению могут быть гетерологичными по отношению к проходящему лечению млекопитающему. Например, белок ANGPTL3 человека или его фрагмент, белок или пептид, производный от белка ANGPTL3 человека (например, модифицированный белок ANGPTL3 человека, консервативный вариант белка ANGPTL3 человека, пептидомиметики, производные от белка ANGPTL3 человека) используются в лечении животного, такого как лошадь, крупный рогатый скот или собака. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный белок ANGPTL3 может использоваться для наращивания популяций хондроцитов в культуре для трансплантации. В некоторых вариантах осуществления к наращенным культурам дополнительно подмешивают полипептиды и композиции, гомологичные по отношению к проходящему лечению млекопитающему, и помещают в суставное пространство или непосредственно в дефект хряща. Альтернативно, полипептиды по изобретению, полученные от того же вида, т.е. белок ANGPTL3 человека или его фрагменты, белок или пептид, производный от белка ANGPTL3 человека (например, модифицированный белок ANGPTL3 человека, консервативный вариант белка ANGPTL3 человека, пептидомиметик, производный от белка ANGPTL3 человека) применяют при лечении пациента-человека. С помощью белка, полученного из тех же видов млекопитающих, которые проходят лечение, можно избежать случайных иммунных реакций.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды и композиции по настоящему изобретению применяют способом прямой инъекции в синовиальную жидкость сустава, системного введения (перорально или внутривенно) либо непосредственно в дефект хряща, либо самостоятельно, либо в комплексе с подходящим носителем для длительного высвобождения белка. В некоторых вариантах осуществления полипептиды или композиции вводят в биосовместимой матрице или каркасе. Полипептиды, композиции и способы по настоящему изобретению могут также использоваться в сочетании с хирургической процедурой на пораженном суставе. Введение полипептида по изобретению может происходить до, во время или в сочетании с, и/или после хирургической процедуры. Например, полипептиды, композиции и способы по изобретению могут быть использованы для наращивания популяции хондроцитов в культуре для аутологичной или аллогенной хондроцитной имплантации (ACI). Хондроциты можно необязательно имплантировать с параллельным лечением, состоящим из введения полипептидов и композиций по настоящему изобретению. В этих процедурах, например, хрящевые клетки могут быть собраны артроскопически с неповрежденной минорной несущей нагрузку области поврежденного сустава, и могут культивироваться *in vitro*, при необходимости в присутствии полипептидов и композиций по настоящему изобретению и/или других факторов роста, чтобы увеличить количество клеток перед трансплантацией. К выращенным культурам затем при необходимости подмешивают полипептиды и композиции по настоящему изобретению и/или помещают в пространство сустава или непосредственно в дефект. В определенных вариантах осуществления выращенные культуры (необязательно с полипептидами по настоящему изобретению) помещаются в пространство сустава, суспендированные в матриксе или мембране. В других вариантах осуществления полипептиды и композиции по настоящему изобретению могут использоваться в комбинации с одним или более периостальных или перихондральных графтов, которые содержат образующие хрящ клетки и/или помогают удерживать трансплантированные хондроциты или клетки-предшественники хондроцитов на месте. В некоторых вариантах осуществления полипептиды и композиции по изобретению используются для восстановления повреждений хряща в сочетании с другими процедурами, включая, в качестве неограничивающих примеров, лаваж сустава, стимуляцию костного мозга, абразивную артропластику, субхондральное бурение или микротравматизацию проксимальной субхондральной кости. При необходимости, после введения полипептидов и композиций по настоящему изобретению и роста хрящей может быть полезным дополнительные хирургическое лечение, чтобы соответствующим образом оконтурить новообразованную хрящевую поверхность(ти).

Фармацевтические композиции.

Терапевтические композиции, содержащие предоставляемые полипептиды, находятся в рамках настоящего изобретения, и специально предусмотрены в свете выявления нескольких полипептидных последовательностей, проявляющих повышенную стабильность и протеаза-устойчивость. Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество полипептида по изобретению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции дополнительно включают фармацевтически или физиологически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит гиалуроновую кислоту или ее производное.

В дополнение, изобретение предоставляет способ улучшения или профилактики артрита или травмы сустава пациента-человека, включающий введение в сустав пациента композиции, содержащей эффективное количество полипептида по изобретению, тем самым улучшая состояние или препятствуя артриту или травме сустава у пациента. В некоторых вариантах осуществления пациент имеет артрит



или повреждение сустава. В некоторых вариантах осуществления индивидуум не имеет, но находится в группе риска артрита или травмы сустава. В некоторых вариантах осуществления артрита представляет собой остеоартрит, травматический артрит или аутоиммунный артрит. В некоторых вариантах осуществления вводимая композиция дополнительно содержит гиалуроновую кислоту.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты, включающий контактирование мезенхимальных стволовых клеток с достаточным количеством полипептида по изобретению для индуцирования дифференцировки стволовых клеток в хондроциты. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют *in vivo*, стволовые клетки передаются пациенту-человеку, и контактирование включает введение в сустав пациента композиции, содержащей эффективное количество полипептида по изобретению, индуцируя тем самым дифференцировку стволовых клеток в хондроциты и образование хряща.

Терапевтические композиции, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по изобретению, могут быть доставлены пациенту для лечения связанной с суставом травмы или болезни, и также находятся в пределах объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат зезащищенную ДНК, кодирующую полипептид по изобретению. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор используется для осуществления доставки, и фармацевтическая композиция содержит вектор, кодирующий полипептид по изобретению, включая, в качестве неограничивающих примеров, вектор на основе аденовируса или аденовирус-ассоциированный вектор, вектор на основе вируса герпеса, вектор на основе вируса оспы кур или вектор на основе вируса коровьей оспы. Фармацевтические композиции включают терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, с фармацевтически или физиологически приемлемым носителем.

В другом аспекте настоящего изобретения предоставленные полипептиды предусматриваются для применения в качестве лекарственного средства для лечения поражения суставов. В некоторых вариантах осуществления предоставляются полипептиды по изобретению для применения в качестве лекарственного средства для облегчения артрита или повреждения суставов. В некоторых вариантах осуществления артрита является остеоартритом, травматическим артритом или аутоиммунным артритом. В некоторых вариантах осуществления повреждение суставов представляет собой травматическое поражение суставов, аутоиммунное повреждение, возрастное повреждение, или повреждение, связанное с обездвижением. В других вариантах осуществления предоставляется нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению для использования в лекарственном средстве.

Составы, пригодные для введения, содержат наполнители, включая, в качестве неограничивающих примеров, водные и неводные растворы, изотонические стерильные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают составы изотоническими, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие вещества, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции включают терапевтически эффективное количество пептида в смеси с фармацевтически приемлемое рецептурное средство, выбранное для пригодности со способом введения, форматом доставки и нужной дозировкой. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), и последующих изданий того же. Основное средство доставки или носитель в фармацевтической композиции может быть водной или неводной природы. Например, подходящее средство доставки или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная цереброспинальная жидкость, при необходимости дополненная другими материалами, распространенными в композициях для парентерального введения. Например, буферы могут использоваться, например, для поддержания композиции при физиологическом pH или при слегка пониженном pH, обычно в пределах диапазона от примерно pH 5 до примерно pH 8, и могут дополнительно включать сорбит, сывороточный альбумин, детергент или другой дополнительный компонент. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие полипептиды или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по изобретению, могут быть подготовлены для хранения в лиофилизированном виде с использованием соответствующих наполнителей (например, сахарозы).

Еще в других вариантах осуществления состав со средством, таким как инъекционные микросферы, биозеродируемые частицы, полимерные соединения, бусы или липосомы или другая биосовместимая матрица, которая обеспечивает контролируемое или замедленное высвобождение полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, может затем быть доставлен посредством депо инъекции. Например, полипептиды или нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению, могут быть инкапсулированы в липосомы, или сформулированы в виде микрочастиц или микрокапсул, или могут быть включены в другие носители, такие как биodeградируемые полимеры, гидрогели, циклодекстрины (см., например, Gonzalez et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074; Wang et al., Международная РСТ публикация № WO 03/47518 и WO 03/46185), микросферы поли(молочной-глицероловой)кислоты (PLGA) и PLCA (см., например, патент США № 6447796 и публикацию патентной заявки США № US 2002130430), биodeградируемые микрокапсулы и биоклеющиеся микросферы, или с

помощью белковых векторов (O'Hare and Normand, Международная РСТ публикация № WO 00/53722) или путем использования конъюгатов. Еще другие подходящие механизмы включают имплантируемые устройства доставки.

Доза соединения по настоящему изобретению для лечения вышеуказанных заболеваний или устройств варьирует в зависимости от способа введения, возраста и/или массы тела индивидуума, состояния проходящего лечение индивидуума, и, в конечном счете, будет определяться лечащим врачом или ветеринаром. Доза, вводимая индивидууму, в контексте настоящего изобретения должна быть достаточной, чтобы вызвать благотворный ответ у индивидуума с течением времени. Такая доза является "терапевтически эффективным количеством". В этой связи соответствующая доза может определяться эффективностью конкретного белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по используемому изобретению, и состоянием индивидуума, а также массой тела или площадью поверхности зоны обработки. Размер дозы также определяется наличием, характером и степенью каких-либо негативных побочных эффектов, которые сопровождают введение конкретного белка или вектора конкретному индивидууму. Введение может выполняться путем однократной или разделенной дозами, или в виде непрерывной инфузии с помощью имплантированного устройства или катетера. Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров полипептида или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, в применяемом составе. Врач-клиницист может титровать дозировку и/или модифицировать введение для достижения желаемых терапевтических эффектов. Типичная дозировка составляет от примерно 0,01 мкг/кг до примерно 100 мг/кг в зависимости от факторов. В определенных вариантах осуществления дозировка составляет от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 10 мг/кг; или примерно 0,1 мкг/кг; примерно 0,5 мкг/кг; примерно 1 мкг/кг; примерно 2 мкг/кг; примерно 5 мкг/кг; примерно 10 мкг/кг; примерно 15 мкг/кг; примерно 20 мкг/кг; примерно 25 мкг/кг; примерно 30 мкг/кг; примерно 35 мкг/кг; примерно 40 мкг/кг; примерно 45 мкг/кг; примерно 50 мкг/кг; примерно 55 мкг/кг; примерно 60 мкг/кг; примерно 65 мкг/кг; примерно 75 мкг/кг; примерно 85 мкг/кг; примерно 100 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет примерно 50 мкг/кг; 100 мкг/кг; примерно 150 мкг/кг; примерно 200 мкг/кг; примерно 250 мкг/кг; примерно 300 мкг/кг; примерно 350 мкг/кг; примерно 400 мкг/кг; примерно 450 мкг/кг; примерно 500 мкг/кг; примерно 550 мкг/кг; примерно 600 мкг/кг; примерно 650 мкг/кг; примерно 700 мкг/кг; примерно 750 мкг/кг; примерно 800 мкг/кг; примерно 850 мкг/кг; примерно 900 мкг/кг; примерно 950 мкг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг; примерно 4 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 9 мг/кг; примерно 10 мг/кг.

Способы введения.

Любой способ доставки белков или нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, в пораженный сустав может применяться. В практике данного изобретения композиции можно вводить парентерально, например инъектировать, например интраартикулярно (т.е. в сустав), внутривенно, внутримышечно, подкожно; впрыскивать, или имплантировать, например, в мембрану, матрицы, устройство и др. При инъектировании, вливании или имплантировании, доставка может направляться в соответствующую ткань или сустав, и доставка может представлять собой прямую доставку болюса или непрерывную подачу. В некоторых вариантах осуществления доставки может происходить в соответствующую ткань, расположенную в непосредственной близости от пораженного сустава. В некоторых вариантах осуществления доставки может проходить посредством диффузии, или посредством болюса с временным высвобождением. В некоторых вариантах осуществления система контролируемого высвобождения (например, насос) могут быть размещены в непосредственной близости от терапевтической мишени, например, объединенной в котором полипептид вводят. В других вариантах осуществления композиции могут быть выбраны для приема внутрь, например ингаляционная или пероральная доставка.

Терапевтические полипептиды или нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по изобретению по настоящему изобретению, также можно эффективно использовать в комбинации с одним или более дополнительных активных средств (например, гиалуроновой кислотой или ее производным или солью, фактором роста (например, FGF18, BMP7), хондрогиновым средством (например, перорально кальцитонин лосося, SD-6010 (ингибитор iNOS), витамином D3 (холекальциферол), гидролизатом коллагена, ресулатидацетатом, неомыляемыми веществами авокадо, сои (ASU), соединение, описанное в WO 2012/129562, картогенин), стероидом, нестероидным противовоспалительным средством (НПВП) и др.) в зависимости от желаемой терапии или эффекта для улучшения или усиления терапевтического эффекта любого. Этот процесс может включать в себя введение обоих средств пациенту одновременно, либо в виде единой композиции или фармакологического состава, который включает в себя оба средства, или путем введения двух различных композиций или составов, где одна композиция включает полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид по изобретению, а другая включает в себя второе средство(а). Введение терапевтической композиции, содержащей полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид по изобретению, может предшествовать или следовать за введением второго средства с интервалами в диапазоне от минут до недель.

Составы соединений могут храниться в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, сухого вещества или в виде обезвоженного или лиофилизованного порошка. Составы могут

быть представлены в герметичных контейнерах с единичной дозой или несколькими дозами, таких как ампулы и флаконы. В некоторых вариантах осуществления составы могут быть представлены в одно- или многокамерных предварительно наполненных шприцах (например, жидкостные шприцы, лизошприцы). Растворы и суспензии могут быть подготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного вида.

Также предоставляются наборы, включающие полипептиды или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по изобретению, по изобретению. В одном варианте осуществления предоставляются наборы для изготовления вводимой единицы однократной дозы. Набор содержит первый контейнер, содержащий высушенный полипептид или нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид по изобретению, и второй контейнер, содержащий формулу водного восстановления. В определенных вариантах осуществления один контейнер содержит однокамерный предварительно заполненный шприц. В других вариантах осуществления контейнеры объединены в качестве многокамерного предварительно заполненного шприца.

Иллюстративные примеры.

Следующие примеры предлагаются для иллюстрации, но не для ограничения изобретения.

Пример 1. Конструкции протеаза-устойчивых пептидов AngptB.

Различные N-концевые укороченные мутанты были сконструированы, чтобы устранить О-связанные сайты гликозилирования и содействовать биофизическим характеристикам белка. Для идентификации протеаза-устойчивых пептидов аминокислотные замены были введены в различные положения фрагментов пептида Angpt13 человека, соответствующие С-концевой области пептида. На фиг. 1 показаны положения мутаций в Angpt13 человека. Конструкции первоначально были подготовлены His-тегами. Мутантные белки представляли собой: 225-460 K423Q (225KQ), 225-460 S424T (225ST), 226-460 K423Q (226KQ), 226-460 K423S (226KS), 228-460 K423Q (228KQ), 228-460 S424T (228ST), 233-460 K423Q (233KQ), 233-460 K423S (233KS), 241-460 K423Q (241KQ), 241-460 K423S (241KS), 241-460 Kdel (241Kdel), 242-460 K423Q (242KQ), 242-460 K423S (242KS) и 242-460 Kdel (242Kdel).

His-меченые белки экспрессировали в клетках НЕК Freestyle™ и очищали при помощи Ni-NTA колоночной хроматографии. С-концевые конструкции без тега также клонировали, очищали описанным ранее способом (Gonzalez R. et al. PNAS 2010). Кратко, целевой белок с сигнальной последовательностью (1-16) был клонирован в вектор экспрессии млекопитающих с промотором цитомегаловируса. Через 96 ч после ДНК/ПЭИ трансфекции в НЕК Freestyle 293 (Invitrogen) среду, содержащую секретрируемый целевой белок, собирали и очищали при помощи колонки Hi-Trap SP (GE Healthcare). Белок элюировался в интервале от 50 mM MES (pH 6,0), 125 mM NaCl до 50 mM MES (pH 6,0), 150 mM NaCl. Анализ способом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия подтвердил, что очищенный белок обладал по меньшей мере 95% чистотой.

Протеаза-устойчивость оценивалась следующим образом. Ограниченный трипсинолиз проводили путем инкубации 10 нг каждого подготовленного белка с трипсином при массовом соотношении 8000:1 (белок:трипсин) в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакцию трипсинолиза затем гасили добавлением уксусной кислоты, чтобы довести реакцию до pH 3,0, и загашенные образцы анализировали при помощи LC/MS. 5 мин пик ОФ-ВЭЖХ, соответствующий массе С-концевым 43 аминокислотам (S424-E460), было явным для соответствующих конструкций белка дикого типа. Сайт отрезания находился на том же участке, т.е. между K423 и S424, как отмечалось при продукции полноразмерного белка ANGPTL3 дикого типа. Этот пик отсутствовал, когда Lys в сайте отрезания был заменен на Gln. Каждая из пептидных конструкций 225KQ, 228KQ, 233KQ, 233KS, 241KQ, и 242KQ; и пептид дикого типа 225 подготавливали и анализировали. Пик, соответствующий массе С-концевым 43 аминокислотам, отсутствовал, когда Lys в сайте отрезания был заменен на Gln или Ser в каждой из конструкций, или когда Lys в положении 423 был удален.

Пример 2. Реакции связывания интегрин.

Интегрин αVβ3. Подготовленные пептиды 225KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ и 242KQ проверяли *in vitro* на связывание с интегрином αVβ3. Кратко, планшеты Maxisorp покрывали интегрином αVβ3 (2 мкг/мл) и добавляли полипептидную конструкцию (указано) в различных концентрациях. Связанный пептид детектировали путем добавления моноклонального антитела против ANGPTL3, а затем с конъюгированным с пероксидазой корня хрена козьим антимышиным IgG-антителом. Все проверенные пептиды сохранили или улучшили способность к связыванию интегрин. EC<sub>50</sub> для каждого определяли из данных связывания, и результаты показаны в табл. 2.

Таблица 2. In vitro связывание ANGPTL3 и генно-инженерных полипептидных конструкций с интегринами

	Интегрин $\alpha 5\beta 1$ EC <sub>50</sub>	Интегрин $\alpha V\beta 3$ EC <sub>50</sub>
WT	3,054	3,245
242KQ	1,566	3,076
241KQ	2,693	4,032
233KQ	13,83	6,636
228KQ	4,26	4,051
225KQ	19,89	11,18

Интегрин  $\alpha 5\beta 1$ . Подготовленные пептиды 225KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ и 242KQ кг проверяли in vitro на связывание с интегрином  $\alpha 5\beta 1$ . Планшеты покрывали 2 мкг/мл, как описано выше, но интегрином  $\alpha 5\beta 1$ , и добавляли различные концентрации полипептидной конструкции (указано), и детектирование проводили, как описано выше. Все испытанные пептиды сохранили или улучшили способность к связыванию интегрин. EC<sub>50</sub> для каждого определяли из данных связывания, и результаты показаны в табл. 2.

Пример 3. Функциональный анализ конструкций.

Культура клеток и дифференцировка. Первичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека (hMSC) были отсортированы в FACS и проверены, чтобы быть >98% положительными по CD29, CD44, CD105 и CD166 и <0,1% положительными по CD45; и для экспериментов были использованы клетки из пассажей 2-8. Хрящевые резидентные MSC человека (hCR-MSC) получали из человеческих первичных суставных хондроцитов, которые разделяли на отдельные клетки, поклоново выращивали в MSCGM и проверяли в качестве MSC через хондрогенную, остеогенную и адипогенную дифференциации. Клетки отсортировывали в FACS и проверяли, чтобы >98% были положительными по CD166 и CD105. hCR-MSC культивировали до 20 пассажей без изменения в клеточном профиле, определяли скорость роста или дифференциации.

Хондрогенез. Пептидные конструкции по изобретению оценивали в физических и функциональных тестах для оценки активности хондрогенеза.

Генно-инженерные конструкции, предоставленные в этом документе, являются производными от ANGPTL3, который принадлежит семейству из семи выявленных белков ANGPTL, которые имеют структурное сходство с ангиопоэтинами, но лишены способности связываться с рецептором Tie2 и, следовательно, имеют различные функции. Белки ANGPTL содержат N-терминальный биспиральный домена (CCD) и C-концевой фибриноген-подобный домен (FLD), и, как полагают, сильно регулируются при помощи их микроокружения и взаимодействиями с внеклеточным матриксом (ECM), таким как фибронектин и интегрины. Conklin et al., Genomics 62(3): 477-482 (1999); Goh Y.Y. et al., Am. J. Pathol. 177(6): 2791-2803 (2010); Goh Y.Y. et al., J. Biol. Chem. 285(43): 32999-33009(2010). Последовательности для членов семейства ANGPTL, наиболее близкородственные ANGPTL3, ANGPTL1 (полноразмерный и C-концевой домен) и ANGPTL4 (полноразмерный и C-концевой домен), приведены в табл. 3; и табл. 5B иллюстрирует выравнивание по всем C-концевым доменам членов этого семейства. Идентичности последовательностей среди внеклеточных доменов и C-концевых доменов ANGPTL1, ANGPTL4, а также других ангиопоэтиновых белков ANGPTL7, ANGPT1 и ANGPT2 представлены в табл. 5A. C-концевой домен (CT) ANGPTL3 имеет 37% идентичности последовательности с CT ANGPTL1 и 40% идентичности последовательности с CT ANGPTL4.

Хондрогенез на основе клеток 2D индуцировали in vitro и оценивали, как описано ранее в Johnson K. et al., (2012) Science 336, 717. Кратко, первичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека (hMSC) высевали на питательные среды, затем заменяли на среды для хондрогенной стимуляции с конструкциями и без них.

Для первоначального изображения формирования конкреций лунки фиксировали и окрашивали родамином В, где конкреции легко выявлялись визуально, а снимки получали с помощью световой микроскопии. Для обеспечения высокопропускной детекции на основе изображений и количественного определения хондрогенные конкреции окрашивали Nile красным, который связывается неспецифично с коллагенами. Окрашенные Nile красным конкреции количественно оценивали на Acumen eX3 (устройство обработки изображений с высоким содержанием) путем возбуждения 488-лазером для быстрого обнаружения конкреций.

Таблица 3. Последовательности ANGPTL-семейства

<u>SEQ</u> <u>ID</u>	<u>Конструкция</u>	<u>Последовательность</u>
<u>71</u>	<u>hANGPTL1 1-491</u>	MKTFTWTLGVLFLLVDTGHCRRGGQFKIKKINQRRYPRATDGKEEAKKCA YTFLVPEQRITGPICVNTKGQDASTIKDMITRMDLENLKDVLRSRQKREID VLQLWDVDGNIVNEVKLLRKESRNMNSRVTLQLYMQLLHEIIRKRDNSLE LSQLENKILNVTTMLKMATRYRELEVKYASLTDLVNNQSVMITLLEEQC LRIFSRQDTHVSPPLVQWPQHIPNSQQYTPGLLGGNEIQRDPGYPRDLM PPDLATSPTKSPFKIPPVTFINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPEN SNGPMQLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFRRNWNENYKKGFGNIDGEYW LGLENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLG TYQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDLDRDKMYAGNCAHFHKGGIWYNACAHSNL NGVWYRGGHYRSKHQDGI FWAERYGGSYSLRAVQMMIKPID
<u>72</u>	<u>CT</u> <u>hANGPTL1 271-491</u>	FINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNGPMQLWCENSLDPGGWTV IQKRTDGSVNFRRNWNENYKKGFGNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIE LEDWSDKKVYAEYSSFRLEPESEFYRLRLGTYQGNAGDSMMWHNGKQFTT LDRDKMYAGNCAHFHKGWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSKHQDGI FW AEYRGGYSYSLRAVQMMIKPID
<u>73</u>	<u>hANGPTL4 1-406</u>	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQ LGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGSTDPLAPESRVDPPE VLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHK HLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDFAHNVSRHLRLPRDCQELFQVGERQSG LFEIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGD PHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAY SLQLTAPVAGQLGATTVPSPGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWW FGTCSHNSNLNGQYFRSIPQQRQKLLKGI FWKTRGRYYPQLQATTMLIQPM AAEAAS
<u>74</u>	<u>CT</u> <u>hANGPTL4 179-406</u>	SRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQ RRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLR DWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLLQLTAPVAGQLGATTVPSPGLSVPFST WDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHNSNLNGQYFRSIPQQRQKLLKGI FWKTRGRYYPQLQATTMLIQPMAEAAS

Таблица 4. Хондрогенез белков-членов семейства ANGPTL

Белок	Активность образования конкреций	Индукция коллагена II типа	Входящий номер Genbank
Angpt11	Да	Да	NP_004664
Angpt12	Нет	н/о	NP_036230
Angpt13	Да	Да	NP_055310
Angpt14	Да	Нет	NP_647475
Angpt16	Нет	Нет	NP_114123
Anspt17	Нет	Нет	NP_066969
Angpt2	Нет	н/о	NP_001138
Angpt1	Нет	н/о	NP_004664

Хондрогенез на основе клеток 2D индуцировали *in vitro* и оценивали, как описано ранее в Johnson K. et al., (2012) Science 336, 717. Кратко, первичные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека (hMSC) высеивали на питательные среды, затем заменяли на среды для хондрогенной стимуляции с конструкциями и без них, и культивировали в течение 7 или 14 дней. Клетки затем фиксировали при помощи формальдегида, промывали и затем окрашивали с помощью стандартных иммуноцитохимических способов для детектирования первичных хрящевых белков проколлагена типа 2A (PI-IANP) (фиг. 2A) и коллагена типа II (фиг. 2B). Для детектирования коллагена типа II, клетки переваривали с 0,2% коллагеназы II ((Worthington Biochemical, Лейквуд, штат Нью-Джерси), которую добавляли в

раствор для нарушения проницаемости мембраны. Иммунофлуоресценцию для каждого детектируемого белка количественно определяли через отображение высокого содержания (Image Express Ultra (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния), используя ячейку балльного сценария с несколькими длинами волн, и как описано ранее. См. фиг. 2. Экспрессию агрекрана контролировали путем подготовки клеток следующим образом: кратко, первичные hMSC (5000 клеток) засеивали в Griener 384 луночный планшет. После 24 ч роста среду удаляли и заменяли 25 мкл DMEM, содержащей 1% FBS. Белковые конструкции, затем добавляли в каждую лунку в указанной дозе, и культуры выращивали при 37°C в течение 3 дней. Клетки фиксировали в 10% формалине и подвергали иммуноцитохимическим способам для детектирования экспрессии белка агрекрана. Лунки отображали при помощи ImageXpress Ultra и количественно определяли при помощи ячейку балльного сценария с несколькими длинами волн, n=6/концентрация белка. Результаты проиллюстрированы на фиг. 3B по отношению к контролю (клетки, стимулированные без конструкции, только разбавителем) для С-концевого (225-460) ANGPTL3 WT дикого типа, генно-инженерной конструкции 242KQ или 242Kdel или полноразмерного ANGPTL1, члена родственного семейства ANGPTL-белков. Подобные результаты были получены в экспериментах с использованием каждой из конструкций 225WT, 225KQ, 226KQ, 228KQ, 233KQ, 241KQ и 242KQ.

Анализ хондрогенеза проводили с использованием тестов и способов, описанных ранее и в настоящем документе для дополнительных членов ANGPTL-родственного семейства.

Эксперименты проводили для проверки того, обладают ли близкородственные белки хондрогенной активностью и сохраняет ли активность С-терминальный конец белка. ANGPTL1 и ANGPTL4 демонстрировали активность в тестах на формирование конкреций; однако только ANGPTL1 показал индукцию коллагена типа II в анализах на хондрогенез. См. табл. 4. Результаты анализов активности формирования конкреций и индукции коллагена типа II суммированы в табл. 4. Дополнительные характеристики ANGPTL1 описаны в настоящем документе. См. другие части этого примера и фиг. 3-5.

Таблица 5. Гомология последовательностей среди членов ангиопоэтин-подобного семейства человека 5A. Идентичность последовательностей среди членов ангиопоэтин-подобного семейства человека (ECD или CTD)

Family member	Family member	% Sequence Identity
hANGPTL3_17-460	hANGPTL4_26-406	32,6
hANGPTL3_17-460	hANGPTL1_24-491	25,7
hANGPTL3_17-460	hANGPTL7_27-346	28,1
hANGPTL3_17-460	hANGPT1_23-498	24,1
hANGPTL3_17-460	hANGPT2_19-496	23,4
hANGPTL3_241-460	hANGPTL4_179-406	40,0
hANGPTL3_241-460	hANGPTL1_271-491	36,8
hANGPTL3_241-460	hANGPTL7_122-343	36,4
hANGPTL3_241-460	hANGPT1_277-497	37,3
hANGPTL3_241-460	hANGPT2_275-495	36,4

5B. Выравнивание последовательностей С-терминальных доменов членов ангиопоэтин-подобного семейства hANGPTL1(271-491)/hANGPTL3(241-460)/hANGPTL4(179-406)

hANGPTL3_241-460	..-..GEPTEC	..YIYNRGENY	SGMYAIPSPN	SGVYFNVVVC	WISS-SWTE
hANGPTL4_179-406	SRLELPDC	QELFQVGERQ	SGEILPPG	SP-PFVVC	MSD-GWTV
hANGPTL1_271-471	FINGPKDC	QQAKEAGNSV	SGYIIPEN	SNPMLVWC	NLD-GWTV
Clustal Consensus	..*..*	..*..*	..*..*	..*..*	..*..*
hANGPTL3_241-460	IQSRDGSN	FNEYWENYK	GFGRDGEFW	LGLEKIYSIV	KQSNVLRLE
hANGPTL4_179-406	IQSRDGSV	FNRWENYK	GFGDNGEFW	LGLEKYSI	QDRNLRLE
hANGPTL1_271-471	IQSRDGSVN	FRWENYK	GFGDGEFW	LGLENIYMS	QSNVLRLE
Clustal Consensus	**:*..*	**:*..*	**:*..*	**:*..*	**:*..*
hANGPTL3_241-460	LRDWKDNKY	IEYSFYLGN	NETYLLLV	AITY--NVS	NATPENKDEY
hANGPTL4_179-406	LRDWQDNKE	QDSFVHLG	EOTYLLLV	APVAGQLCAT	TVSPKDEY
hANGPTL1_271-471	LRDWSDKKNY	AEYSERLEP	ESENYRLL	IYQD--NVS	SEMNHKQK
Clustal Consensus	..*..*	..*..*	..*..*	..*..*	..*..*
hANGPTL3_241-460	FSTWDHKA	KNNFNCESY	SGGWWHDE	GNNLNGKY	KRANKRER
hANGPTL4_179-406	FSTWDQHD	RRDKNCAKSL	SGGWWHDE	SNNLNGQY	TSNQRKRL
hANGPTL1_271-471	FSTWDRDKM	YVAGNCAHSH	KGGWVHDE	ANNLNGVWY	R--SNYRKR
Clustal Consensus	**:*..*	**:*..*	**:*..*	**:*..*	**:*..*
hANGPTL3_241-460	RAGGFWKSN	GRYSKSK	MLIPDDE	FE	
hANGPTL4_179-406	RKGFWKTWR	GRYPLQAV	MLIQDDE	AS	
hANGPTL1_271-471	QDGFWEYR	GSYLLHVG	MLIKDDE		
Clustal Consensus	..*..*	**:*..*	**:*..*	..*..*	

Анализ экспрессии РНК был также использован для оценки экспрессии специфических белков хряща. Вкратце, qrt-PCR hMSC выращивали в осадочной культуре ( $1 \times 10^6$  клеток/осадок) в течение 3, 7,

10, 21 суток в бессывороточной среде DMEM, 1X ITS плюс конструкции (как указано). Среда заменяли каждые 3 дня. Экспрессию мРНК лубрицина, агреккана, Sox9, IGF1, IFITM1, остеокальцина и коллагена X типа количественно оценивали с использованием Roche LightCycler (данные, полученные из 3 экспериментов, выполненных в двух повторностях (n=6)). Фиг. 3А представляет данные по экспрессии в день 10 для 242KQ и 225WT. Данные по генной экспрессии были сходными для всех генов в дни 3, 7 и 21.

Полноразмерный ANGPTL3, как ранее было показано, обладает хондрогенезной активностью как в человеческих, так и в мышечных мезенхимальных стволовых клетках. Конструкции проверяли на активность в мезенхимальных стволовых клетках человека, мыши, крысы и собаки, чтобы продемонстрировать способность к перекрестной реактивности с дополнительными видами. CR-MSC мыши, крысы, собаки и человека культивировали с конструкциями, как описано выше, в течение 18 дней. Культуры фиксировали и окрашивали с использованием стандартных иммуноцитохимических методик для детектирования хондроцит-специфического белка коллагена II типа, и коллаген II типа позитивные клетки были получены с помощью отображений высокого содержания. Похожее кратное увеличение количества коллагена II типа было подтверждено количественно для каждого вида оцениваемых клеток.

Хондропротекция. Пептидные конструкции оценивали в функциональных тестах для оценки хондропротекторной активности.

Анализ ингибирования высвобождения гликозамингликана (ГАГ) *ex vivo* (показатель повреждения матрикса) проводили, как описано в Johnson K. et al., (2012) Science 336, 717-721. Кратко, хрящ крупного рогатого скота выделяли, штамповали в симметричные круги и помещали в органокультуру. Срезы обрабатывали в течение 48 ч 20 нг/мл TNF $\alpha$  и 10 нг/мл онкостатина М (OSM) (медиаторы воспаления), чтобы индуцировать деградацию хрящевой ткани в присутствии или при отсутствии белковых конструкций для определения процента ингибирования высвобождения гликозаминогликанов (ГАГ).

Результаты, показанные на фиг. 4А, иллюстрируют данные, полученные от 4 доноров, n=12 с генно-инженерными конструкциями как указано, и WT 225-460.

Анализ ингибирования оксида азота (NO) *in vitro* (показатель хондропротекции) проводили, как описано в Johnson K. et al., (2012) Science 336, 717-721. Кратко, первичные хондроциты обрабатывали в течение 48 ч белковыми конструкциями, как указано. Реакцию Грейсса проводили, чтобы определить влияние конструкций на ингибирование высвобождения NO. Результаты, показанные на фиг. 4В, иллюстрируют результаты для инженерных конструкций, как указывается, и WT C-терминального фрагмента 225-460. Результаты, показанные на фиг. 4С, иллюстрируют результаты с C-терминальным ANGPTL1 дикого типа, генно-инженерным ANGPTL3 242KQ или контролем.

Ингибирование формирования фиброзных хрящей. Первичные суставные хондроциты человека культивировали, как описано выше, с добавлением аскорбиновой кислоты и наличием или отсутствием конструкций (указано) в течение 14 дней для индуцирования гипертрофии и экспрессию коллагена тип X оценивали по иммунофлуоресценции. Результаты, показанные на фиг. 5А, иллюстрируют данные с конструкциями 225WT или 242KQ, как указано. Результаты, показанные на фиг. 5В, иллюстрируют данные с C-терминальным ANGPTL1 дикого типа, генно-инженерными ANGPTL3 242KQ или 242Kdel или фрагментом 225-460 C-терминальным ANGPTL3 дикого типа, как указано. Наличие дикого типа или активных конструкций оказывает ингибирующее действие на формирование фиброзной хрящевой ткани при гипертрофических состояниях, как детектируется по экспрессии коллагена типа X.

Ангиогенез. WT C-концевой домен белка ANGPTL3, как сообщалось, обладает ангиогенными активностями и свойствами *in vitro* и *in vivo* в модели роговицы на крысе. См. Camenisch et al., J. Biol. Chem. 277(19): 17281-17290 (2002). Для устранения возможного риска индуцирования новых кровеносных сосудов после *in vivo* введения c-концевого ANGPTL3, ангиогенные анализы *in vitro* были проведены. Кратко, первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) находились без сыворотки в течение ночи со средой базальных эндотелиальных клеток. Клетки затем метили зеленым клеточным трекером и добавляли к предварительно покрытым матригелем планшетам с внедренной белковой конструкцией (указывается). После культивирования в течение 18 ч в присутствии полноразмерного ANGPTL3 (50 нг/мл) или 242KQ (50 нг/мл) или bFGF в (50 нг/мл), который использовали в качестве положительного контроля, число точек ветвления и общую длину образованной пробки количественно определяли с помощью отображения высокого содержания как меру ангиогенной активности. В отличие от эффекта, наблюдаемого в присутствии полноразмерного ANGPTL3 или положительного контроля, было обнаружено незначительное увеличение любого из этих параметров в случае, когда клетки инкубировали с 242KQ. См. фиг. 2С.

CR-MSC существуют в пределах гиалинового суставного хряща и увеличиваются в числе в ответ на травму. После повреждения хрящевой ткани эти клетки обладают способностью участвовать в процессах репарации, но не в достаточной мере приводят к надлежащему восстановлению хряща сами по себе. Пациенты поэтому остаются с суставным хрящ, у которого отсутствует достаточная способность поддерживать безболезненную подвижность суставов и часто требуется хирургическое вмешательство и/или замена сустава для поддержания их качества жизни. Мы обнаружили, что ANGPTL3 и, в частности, сконструированные протеаза-устойчивые ANGPTL3-пептиды обладают способностью направлять дифференцировку человеческих CR-MSC в хондроциты, специфически секретирующие гиалиновые белки

суставного хряща коллаген II типа и Sox9 при ингибировании формирования фиброзного хряща, отмеченного путем экспрессии коллагена типа X.

Об экспрессии ANGPTL3 не сообщалось, насколько нам известно, и она не наблюдалась в наших исследованиях с использованием вестерн-блоттинга в человеческих хондроцитах, MSC человека или синовиальных фибробластах человека. В суставах грызунов, экспрессия практически не была обнаружена посредством иммуногистохимии (ИНС). Однако в остеоартритной синовиальной жидкости человека (n=2) низкий уровень ANGPTL3 (1,3-6,0 нг/мл) был выявлен с помощью иммуноферментного анализа (ELISA), указывая на то, что в подвергнутом риску суставе системно циркулирующий белок может входить в синовиальную полость.

Пример 4. Анализ конструкций *in vivo* Хирургическая модель тяжелой травмы на мышцах.

Хирургическое рассечение передней крестообразной связки (ACL), медиального мениска большеберцовой связки (MMTL) и медиальной коллатеральной связки (MCL) правого колена у мышей линии C57BL/6 (n=12 /группе) проводили, чтобы вызвать нестабильность в коленном суставе и тем самым привести к ОА-фенотипу, использованному от ранее описанной модели Glasson S.S. et al., Osteoarthritis Cartilage 15, 1061 (2007). Для оценки потенциального терапевтического преимущества ANGPTL3-лечения, 15 недель после операции мышам вводили интрасуставно, как указано на фиг. 6А, раз в неделю в недели 17-19: доза mANGPTL3 = 200 нг/колени. Количественные оценки тибияльного плато были сделаны на шкале 0-4, где 0 является нормой, а 5 - тяжелым остеоартритом (разрушение хряща на всю его толщину). Два среза от каждой мыши были вслепую классифицированы 2 независимыми наблюдателями (фиг. 6В).

Облегчение индуцированного остеоартрозом боли у животных определяли при помощи инкапсультантного тестирования или определения процента времени, в течение которого мышь стояла на прооперированной ноге vs неоперированной ноге, с помощью прибора инкапсультантного мониторинга. Фиг. 7 иллюстрирует результаты отсчетов, представляющих болевой отклик на 35- и 56-й дни после операции, выраженные как % веса, приходящийся на прооперированную конечность vs неоперированной конечности. Обработка иллюстрирует результаты, полученные на животных, дозированных, как описано выше, полноразмерным мышинным ANGPTL3 (WT17-460) или С-концевым ANGPTL3 человека (WT225-460).

Модель хронического ОА на мышцах (индуцированного коллагеназой VII). Другая широко применяемая животная модель остеоартрита, модель коллагеназы VII-индуцированного хронического поражения суставов, была использована для оценки *in vivo* эффективности конструкций. Модель и оценивание проводили, как описано ранее. См. van der Kraan P.M. et al., Am. J. Pathol. 135, 1001 (1989); и Johnson K. et al., Science 336, 717 (2012). Кратко, 3-дневный период воспаления следует за индуцированной коллагеназой дестабилизацией сустава, приводящей в результате к легкому или умеренному разрушению хрящевой ткани. Внутрисуставное введение конструкций проводили после индукции в колено один раз в неделю в течение трех недель, начиная с 3 недель после добавления коллагеназы VII. Сорок (42) дней после лечения суставы собирали и делали срезы. Гистологическая балльная оценка степени тяжести состояния сустава бедренной и большеберцовой кости давала возможность количественно оценивать репарацию тканей. Степени тяжести состояния сустава определяли путем гистологической балльной оценки, как описано выше. Фиг. 8 иллюстрирует восстановление с использованием конструкций 225WT, 225KQ, 228KQ, 233KQ и 241KQ. Для подтверждения наличия белка в суставе (долгосрочные внутрисуставные удержание), ткань фиксировали и окрашивали на присутствие конструкции белка WT с помощью иммуногистохимии. Анализ подтвердил присутствие белка, что указывало на внутрисуставное удержание ANGPTL3 (без каких-либо последствий на липид/триглицериды, оцениваемых с использованием стандартной метаболической панели, данные не приведены).

Гистологический анализ и оценивание сафранин О окрашенных срезов медиального плато большеберцовой кости (для выявления протеогликанов в участке повреждения, как описано выше) показали регенерацию в хрящевой ткани (данные не показаны). Качественный анализ подтвердил замену протеогликанов, сходную с уровнями, наблюдаемыми у наивной мыши, в то время как контроль с носителем не продемонстрировал похожей замены. Тканевые срезы также окрашивали, как описано выше для коллагена II типа, через 8 недель после инъекции повреждения. Качественный анализ подтвердил увеличение коллагена II типа в суставах, подвергавшихся лечению конструкцией, аналогичных уровням, которые наблюдались у наивной мыши; в то время как контроли, подвергшиеся лечению носителем, не продемонстрировали похожей замены. (данные не показаны).

Модель разрыва мениска на крысах.

Модель хирургической травмы на крысах также была использована для оценки эффективности конструкций *in vivo*. Модель и оценивание первоначально осуществляли, как описано ранее Gerwin N. et al. Osteoarthritis Cartilage. Suppl. 3: S24 (2010). Коротко, кожу обривали вдоль коленного сустава и медиальную коллатеральную связку (MCL) выделяли через разрез, и MCL стабилизировали и дистальный срез мениска делали с помощью скальпеля. В недели 1, 2 и 3 после операции белковую конструкцию или контроль с носителем вводили интрасуставно, затем суставы собирали и делали срезы на 4- и 6-й неделе после операции. Гистологическую балльную оценку степени тяжести состояния плато бедренной и большеберцовой кости проводили для количественной оценки восстановления тканей, как описано выше. Данные приведены за 6 недель анализов.



Здоровый гиалиновый хрящ заменял повреждение после лечения. Гистологический анализ и классификацию латерального тибияльного плато окрашенного сафранином О хряща проводили, как описано выше, и количественно оценивали. Результаты показали, что у животных, получавших конструкцию 242KQ, выявлялась регенерация в хрящевой ткани и замена протеогликанов, сходно с уровнями, наблюдаемыми у наивной крысы, в то время как контроль с носителем не продемонстрировал похожей замены. См. фиг. 9. Аналогичные результаты были отмечены для 225WT.

Слегка измененная модель хирургически индуцированного разрыва мениска, описанная выше, была использована, чтобы инициировать повреждение хряща у самцов крыс Льюиса с целью проверки эффективности 242KQ в стимулировании восстановления хрящевой ткани *in vivo*. Операции на крысах проводили, чтобы полностью разорвать медиальную коллатеральную связку и медиальный мениск для дестабилизации сустава, с тем чтобы последующая весовая нагрузка привела бы к быстрой дегенерации хряща. Был сделан надрез, чтобы разорвать связки по обе стороны иглы, обеспечивая тем самым полный разрез. Затем использовали лезвие скальпеля, чтобы проникнуть под связкой надколенника в синовиальное пространство, и заостренную верхушку использовали для того, чтобы разрезать мениск. Удачный разрез достигался, когда сустав вывихивался вбок. Через неделю после операции крыс дозировали путем внутрисуставной инъекции 242KQ или физиологического раствора в объеме 25 мкл во внутрисуставное синовиальное пространство.

Через двадцать восемь дней после операции по разрыву мениска и двадцать один день после внутрисуставной инъекции физиологического раствора или конструкции, исследуемых животных умерщвляли и пораженные суставы собирали для анализа, фиксировали в 10% формалине в PBS, декальцинировали муравьиной кислотой и заливали в парафин перед изготовлением срезов. Готовили корональные срезы и окрашивали сафранином О или оставляли неокрашенными для дальнейшего иммуногистохимического окрашивания. Анализ показал, что медиальное тибияльное плато имело наибольшее количество повреждений хряща, и было решено оценивать только эту область сустава на эффективность 242KQ. С использованием системы оценивания OARSI, балльная оценка степени тяжести состояния хрящей назначали для шести срезов по ширине тибияльного хряща для каждого животного (N=10) вслепую. Балльное оценивание проводили дважды в разные временные точки и баллы затем усредняли, чтобы создать балльную оценку повреждения хряща. Кроме того, анализы объективной балльной оценки проводили с пользовательским скриптом, сгенерированным в среде Matlab. Алгоритм выявлял суставные хрящевые поверхности и объективно количественно определял дополнительные параметры хряща (зональные анализы, интенсивность сафранина О, область хряща, толщину хряща). Результаты иллюстрируются на фиг. 10А.

Структурное восстановление хряща не всегда связано с облегчением боли, по меньшей мере, у людей. Хотя физиология грызунов и манера ходьбы значительно отличаются от таковых у людей, 242KQ оценивали, чтобы определить наличие какого-либо улучшения в манере ходьбы или в продолжительности нахождения на конечности после хирургического лечения. Инкапситуантный мониторинг проводился на крысах, получавших 242KQ. Крыс подвергали измененной хирургической операции на мениске, как описано выше. Через одну неделю после операции 242KQ вводили в синовиальное пространство. На 28-й день крыс помещали в инкапситуантный монитор задними конечностями, и 30 последующих считываний были приняты в течение более 10 мин для каждой крысы для определения процента времени, проведенного (распределение веса) на каждой задней конечности. Эти данные дают представление о боль-индуцированном перераспределении веса. Было установлено, что в модели разрыва мениска на крысах лечение при помощи 242KQ через одну неделю после операции привело к частичному восстановлению способности к равной весовой нагрузке у крыс. См. фиг. 10В.

Одной из основных проблем в ходе спонтанного или хирургического восстановления хряща является замещение гиалинового суставного хряща фиброзной хрящевой тканью. Для исследования типа восстановления хряща, опосредованного ANGPTL3, срезы коленей крыс, полученные в исследовании разрыва мениска у крыс, проведенном выше, окрашивали в присутствии коллагена II типа (для индикации гиалинового суставного хряща) и коллагена X типа (для индикации фиброзного хряща). После однократного введения 20 мкг 242KQ наблюдалось качественное уменьшение величины экспрессии коллагена X типа.

Долговременное удержание 242KQ после внутривенной и внутрисуставной инъекции в колени крыс определяли путем <sup>124</sup>I-мечения белка и введения с последующим PET/ $\mu$ СТ отображением для контроля удержания. См., Gerwin N. et al. (2006) *Advanced drug delivery reviews* 58, 226-242. Среднее время удержания (MRT) после инъекции 242KQ в сустав, как было определено, составило ~17,3 ч, что является значительно увеличенным по сравнению со стандартными 2-3 ч, как сообщалось (см. табл. 6)

Таблица 6. Устойчивость 124I242KQ

Способ	Доза (мкг)	C <sub>max</sub> (нг/мл)	AUC <sub>0-inf</sub> (ч*мкг/мл)	CL (мл/ч)	V <sub>ss</sub> (мл)	MRT (ч)	T <sub>1/2</sub> (ч)
IV	164,2	129,3	22,1	7,4	53,4	7,2	12,4
IA	38,3	0,2	1,9	-	-	17,3	7,2

Модель травматического повреждения сустава путем частичной менискэктомии на собаках Мы

также оценивали активность ANGPTL3 в модели травматического повреждения суставов у собак. Модель выполняли и оценивание осуществляли, как описано в Connor J.R. et al., Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society 17, 1236-1243 (2009). Вкратце, кожу обривали над коленным суставом и медиальную коллатеральную связку (MCL) выделяли через разрез, и MCL стабилизировали, и дистальный срез мениска проводили с помощью скальпеля. Четыре (4) дня после операции животные получали либо дозирование два раза в неделю (1,5 или 15 мкг), или однократную дозу (30 мкг) белковой конструкции (полноразмерный ANGPTL3 собаки) на 7-й день или контроль носителя (вводят внутрисуставно). Собак усыпляли на 28-е сутки и колени подвергали гистологическим срезам и классификации, как описано выше для экспериментов с крысами и мышами. Фиг. 10 иллюстрирует общую валовую балльную оценку восстановления, связанного с лечением собачьим ANGPTL3. По гистологической классификации и оценке срезов суставов собак, окрашенных сафранином O, в областях, где имели место наиболее серьезные потери хряща в группах с физраствором была, была часть сустава, которая имела наибольшее снижение в области поражения после однократной дозы 30 мкг сANGPTL3.

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены лишь для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в свете этого могут быть предложены специалистами в рассматриваемой области техники и подлежат включению в духе и компетенции данной заявки и в рамках прилагаемых пунктов формулы изобретения.

## Последовательности

<u>SEQ ID</u>	<u>Конструкция</u>	<u>Последовательность</u>
1	<u>ANGPTL3</u> <u>человека</u>	MFTIKLLLFIVPLVIVSSRIDQDNSSFDSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEKELRRTTYKLQVKN EEVKNMSLELNSKLESILLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLK TFVEKQDNISKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKP RAPRTTFFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIREPSNSQVHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNV LRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPAIPENKDLVFTWD HKAKGHFNCPGYSGWWRaDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGR LYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
2	<u>REFSEQ</u> <u>ANGPTL3</u> <u>человека</u>	ttccagaagaaaacagttccacggttgcttgaaattgaaaatcaagataaaaaatgt tcacaattaagctcctctttttattgttcctctagttatttctccagaattga tcaagacaattcatcatttgattctctatctccagagccaaaatcaagatttgct atgtagacgatgtaaaaatttagccaatggcctccttcagttgggacatggctc ttaaagactttgtccataagacgaaggccaaaattaatgacataattcaaaaact caacataatttgatcagctctttttatgatctatogctgcaaaccagtgaaatcaaa gaagaagaaaaggaactgagaagaactacataaaactacaagtcaaaaaatgaag aggtaaagaaatagtcacttgaaactcaactcaaaaacttgaaagcctcctagaaga aaaaattctacttcaacaaaagtgaatatttagaagagcaactaactaactta attcaaaaatcaactgaaactccagaacaccagaagtaacttcaacttaaaactt ttgtagaaaaacaagataatagcatcaagaccttctccagaccgtggaagacca ataataacaattaaaccaacagcatagtcaaaataaaagaaatagaaaaatcagctc agaaggactagttatcaagaaccacagaaatttctctatcttccaagccaagag accaagaactactcctcttcttcagttgaaatgaaaatagaaaatgtaaaacatga tggcattcctgctgaaatgtaccaccatttataacagagggtgaacatacaagtggc atgtagccatcagaccagcaactcctaagttttcatgtctactgtgatgta tatacaggtagtccatggacattaattcaacatogaaatagatggatcacaaaactt caatgaaacgtgggagaactacaaaataggttttgggaggcttgatggagaattt tggttggccttagagaagataatactccatagtgaaagcaatctaattatgttttac gaattgagttggaagactggaagacaacaaacattatattgaaatattcttttta cttgggaaaatcagaaaccaactatacgcctacatctagttgcgattactggcaat gtcccaatgcaatcccggaacaaaagatttggtgttttctacttgggatcaca aagcaaaaggacacttcaactgtccagagggttattcaggaggctgggtgggca tgatgagtgaggagaaaacaacctaaatggtaaaataaacaacaaagagcaaaa tctaagccagagaggagaagaggattatcttggaaagctcaaaaatggaaggttat actctataaaaatcaacaaaatggttgatccatccaacagattcagaaaagctttga atgaactgaggcaaaatttaaaggcaataattaaacattaacctattccaagt taatgtggtctataaatctggtattaaatccttaagagaaagcttgagaaaataga tttttttatactaaagtcactgtctatttaagattaaacatacaatcacataac cttaaagaataccggttacatttctcaatcaaaaattcttataatactatttgttt
		taaaattttagtgatgtgggaatcaatttttagatgggtcacaatctagattataatca ataggtgaacttattaaataacttttctaaaataaaaatttagagacttttattt taaaaggcatcataatagactaatatcacaactttcccagtttaaaaactagtagt tcttgtaaaaactctaaacttgactaaaatcacagaggactggtaattgtacagttc ttaaagtgttagtattatctcaaaaactaaaaatcgtcagcacagagtagtggt aaaaatctgtaatacaaaatttttaactgatgcttcaattttgctacaaaaatatt tggagtaaatgtttgatgatatttattatgaaacctaatgaagcagaattaaat actgtattaaaaatagttcgtgtctttaaacaatggagatgactactaagtca cattgactttaacatgaggatcactataacctatt

3	ANGPTL3 <u>мышь</u>	MHTIKLFLFWPLVIASRVDPDLSSFDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEKELRRTTSTLQVKN EEVKNMSVELNSKLESLEEKALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAQEHEPVTSLK SFVEQQDNSIRELLQSVVEEQYKQLSQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPSENSLSSKS RAPRTTPPLQLNETENTEQDDLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCD TQSGSPWTLIQHRKDGSQDFNETWENYKGFGRLDGEFVLGLEKIYAIVQQSNYI LRLELQDWKDSKHYVEYSFHLGSHETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWN HRAKGQLYCPESYSGGWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRK LYAIKSSKMLQPTT
4	ANGPTL3 <u>собака</u>	MYTIKFLFLFIIPLVISSKIDRDYSSYDSVSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTNEIKEEKELRRTTSTLQVKN EEVKNMSLELNSKVESLLEEKILLQKVRYLEKQLTSLIKNQPEIQEHEPVTSLK TFVEQQDNSIKDLLQTVVEEQYRQLNQHSQIKEIENQLRNVIQESTENSLSSKPR APRTTPFLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQVFNVCYD KSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYRFGFRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYIL RIELEDWNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFSTWDH KAKGHVNCPEYSGGWIVVHNVCGENNLNGKYNKQRAKTKPERRRGLYKWSQNGR LYSIKSTKMLIHPIDSESSE
5	ANGPTL3 <u>лошадь</u>	MYTIKFLFLVIAPLVISSRIDQDYSSLDSIPPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYALSQTNEIKEEKELRRTTSTLQVKN EEVKNMSLELNSKLESLEEKSLQKVKYLEEQTLKLIKQPEIQEHEPVTSLK TFVEQQDNSIKDLLQTMEEQYRQLNQHSQIKEIENQLRRTGIQESTENSLSSKP RAPRTTPSFHLNETKDVEHDDFPADCTTIYNRGEHTSGIYSIKPSNSQVFNVCYD VISGSSWILIQRRIDGSQNFNETWQNYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKRSNYI LRIELEDWKNKHTIEYSFHLGNHETNYTLHLVEITGNVFNALPEHKDLVFSTWD HKAKGQLNCLESYSGGWWHDVCGGDNPNKYNKPRSKTKPERRRGCWKSQNGR LYTIKSTKMLIHPIDSEFELRQIKKPMN
6	<u>Бычий</u> ANGPTL3	MYTIKFLFIAPLVISSRTDQDYTSLDSISPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTNEIKEEKELRRATSKLQVKN EEVKNMSLELDSKLESLEEKILLQKVRYLEDQLTDLIKNQPIQEYLEVTSK TLVEQQDNSIKDLLQIVVEEQYRQLNQHSQIKEIENQLRRTGIKESTEISLSSKP RAPRTTPSFHNETKNVEHDDIPADCTTIYNQKHTSGIYSIRPSNSQVFNVCYD VKSGSSWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVMQSNYI LRIELEDWKNKHYIEYSFHLGDHETNYTLHLVAISGNPKAFPEHKDLVFSTWDH KAKGHFNCPESNSGGWVYHDVCGENNLNGKYNKPKAKAKPERKEGICWKSQDGR YSIKATKMLIHPSDSENSE
7	<u>207-455WT</u>	IQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAI RPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGL EKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNA IPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
8	<u>225-455WT</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRILE LEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAK GHFNCPYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTD
9	<u>228-455WT</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELED WKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHF NCPYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTD

10	233-455WT	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKNK HYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIH PTD
11	241-455WT	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKNKHYIEYSFY LGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWH DECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
12	ANGPTL3KQ	MFTIKLLLFIVPLVSSRIDQDSSFDLSLSEPKSRFAMLDVVKILANGLLQQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSSEIKKEEKEKLRRTTYKLQVKN EEVKNMSLELNSKLESLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLK TFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKP RAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYV LRILELEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGR LYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
13	ANGPTL3KS	MFTIKLLLFIVPLVSSRIDQDSSFDLSLSEPKSRFAMLDVVKILANGLLQQLGH GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSSEIKKEEKEKLRRTTYKLQVKN EEVKNMSLELNSKLESLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLK TFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKP RAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCD VISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYV LRILELEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWD HKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGR LYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
14	207KQ	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAI RPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGL EKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNA IPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
15	207KS	IQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAI RPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGL EKIYSIVKQSNYVLRILELEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNA IPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPE RRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
16	225KQ	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTDSESEFE
17	225KS	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTDSESEFE
18	225ST	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAKTKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTDSESEFE

<u>19</u>	<u>226KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>20</u>	<u>226KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>21</u>	<u>228KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>22</u>	<u>228KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>23</u>	<u>228ST</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRATKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>24</u>	<u>233KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>25</u>	<u>233KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>26</u>	<u>241KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>27</u>	<u>241KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGW1WHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>28</u>	<u>242KQ</u>	I PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
<u>29</u>	<u>242KS</u>	I PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSDQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVNPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE

30	<u>225-455KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTD
31	<u>225-455KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI KSTKMLIHPTD
32	<u>226-455KQ</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD
33	<u>226-455KS</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD
34	<u>228-455KQ</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELED WKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTD
35	<u>228-455KS</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELED WKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSRPERRRGLSWKSQNGRLYSIKST KMLIHPTD
36	<u>233-455KQ</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGFEWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRAQSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIH PTD

37	<u>233-455KS</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEG YSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIH PTD
38	<u>241-455KQ</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWH DECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
39	<u>241-455KS</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWH DECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
40	<u>242-455KQ</u>	I PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWH DECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
41	<u>242-455KS</u>	I PAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH HYIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWH DECGENNLNGKYNKPRASSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
42	<u>227KQ собаки</u>	FLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQFENVYCDVKSGSSW TLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYILRIELED WNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFTWDHKAKGHV NCPESYSGGWWHNVCGENNLNGKYNKQRAQTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKST KMLIHPI DSESSE
43	<u>227KS собаки</u>	FLHLNETKNVEHNDIPANCTTIYNRGEHTSGIYSIRPSNSQFENVYCDVKSGSSW TLIQHRIDGSQNFNETWENYRYGFGRLDGEFVLGLEKIYSIVKQSNYILRIELED WNDNKHYIEYFFHLGNHETNYTLHLVEITGNILNALPEHKDLVFTWDHKAKGHV NCPESYSGGWWHNVCGENNLNGKYNKQRASTKPERRRGLYWKSQNGRLYSIKST KMLIHPI DSESSE
44	<u>Последова- тельность нуклеиновых кислот 225WT</u>	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAACATGATGGCATT CTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATAACAAGTGGCATGTATGC CATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGT AGTCCATGGACATTAATCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAA CGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAG TTGGAAGACTGGAAGACAACAAACATTATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAA ATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAA



		TGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTGTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAA GGACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGT GTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAAATCTAAGCC AGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCTATA AAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA
45	<u>Последова-</u> <u>тельность</u> <u>нуклеиновых</u> <u>кислот 225KQ</u>	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATT CTGCTGAATGTACCACCATTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGC CATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGT AGTCCATGGACATTAATTC AACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAA CGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATATGTTTTACGAATTGAG TTGGAAGACTGGAAAGACAACAACATATATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAA ATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAA TGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTGTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAA GGACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGT GTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCC AGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCTATA AAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA
46	<u>Последова-</u> <u>тельность</u> <u>нуклеиновых</u> <u>кислот 225KS</u>	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATT CTGCTGAATGTACCACCATTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGC CATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGT AGTCCATGGACATTAATTC AACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAA CGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGG CCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATATGTTTTACGAATTGAG TTGGAAGACTGGAAAGACAACAACATATATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAA ATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAA TGCAATCCCGGAAAACAAAGATTTGGTGTGTTTCTACTTGGGATCACAAAGCAAAA GGACTTCAACTGTCCAGAGGGTTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGT GTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCC AGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAAGTCTCAAAATGGAAGGTTATACTCTATA AAATCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA
47	<u>Последова-</u> <u>тельность</u> <u>нуклеиновых</u> <u>кислот 226KQ</u>	ACTCCCTTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCCCTG CTGAATGTACCACCATTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCAT CAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGT CCATGGACATTAATTC AACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGT GGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCT AGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATATGTTTTACGAATTGAGTTG GAAGACTGGAAAGACAACAACATATATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAAATC ACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAAATGC

		AATCCCGAAAACAAAGATTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAGCAAAGGA CACTTCAACTGTCCAGAGGTTATTAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTG GAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGA GAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAA TCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA
48	<u>Последова-</u> <u>тельность</u> <u>нуклеиновых</u> <u>кислот 226KS</u>	ACTCCCTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCCCTG CTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCAT CAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTATATCAGGTAGT CCATGGACATTAATCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGT GGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTGGTTGGGCCT AGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTG GAAGACTGGAAAGACAACAACATTATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAAATC ACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGC AATCCCGAAAACAAAGATTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAGCAAAGGA CACTTCAACTGTCCAGAGGTTATTAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTG GAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGA GAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAA TCAACCAAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA
49	<u>Последова-</u> <u>тельность</u> <u>нуклеиновых</u> <u>кислот 228KQ</u>	TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCCCTGCTGAAT GTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACC CAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTATATCAGGTAGTCCATGG ACATTAATCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGA ACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTGGTTGGGCCTAGAGAA GATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGAC TGGAAAGACAACAACATTATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAA CCAACATAACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCC GGAAAACAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAGCAAAGGACACTTC AACTGTCCAGAGGTTATTAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAA ACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAG AAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACC AAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA
50	<u>Последова-</u> <u>тельность</u> <u>нуклеиновых</u> <u>кислот 228KS</u>	TTTCTTCAGTTGAATGAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCCCTGCTGAAT GTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACC CAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTATATCAGGTAGTCCATGG ACATTAATCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGA ACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTGGTTGGGCCTAGAGAA GATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGAC TGGAAAGACAACAACATTATATTGAATATCTTTTTACTTGGGAAATCACGAAA CCAACATAACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCC GGAAAACAAGATTTGGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAGCAAAGGACACTTC AACTGTCCAGAGGTTATTAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAA ACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAG
		AAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACC AAAATGTTGATCCATCCAACAGATTAGAAAAGCTTTGAA

51	<u>Последовательность нуклеиновых кислот</u> <u>233KQ</u>	GAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATA ACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGT TTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACAXTAATTTCAACAT CGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTT TTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGT GAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAA CATATATATGAATATTTCTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTAC ATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTT GGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGT TATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTA AATATAACAAACCAAGAGCACAATCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTG GAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCAT CCAACAGATTGAGAAAGCTTTGAA
52	<u>Последовательность нуклеиновых кислот</u> <u>233KS</u>	GAAATAAGAAATGTAAAACATGATGGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATA ACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGTATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGT TTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTTCAACAT CGAATAGATGGATCACAAAACCTCAATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTT TTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGTTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGT GAAGCAATCTAATTATGTTTTACGAATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAAA CATATATATGAATATTTCTTTTACTTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTAC ATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTT GGTGTTTTCTACTTGGGATCACAAGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGT TATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTA AATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTG GAAGTCTCAAATGGAAGGTTATACTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCAT CCAACAGATTGAGAAAGCTTTGAA
53	<u>Последовательность нуклеиновых кислот</u> <u>241KQ</u>	GGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCA TGATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTAT ATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTC AATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTT GGTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACG AATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAACATTAATTAATTAATTTCTTTTAC TTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATG TCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTTCTACTTGGGATCACAA AGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAAT CTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAATGGAAGGTTATA
		CTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCATCCAACAGATTGAGAAAGCTTTGAA
54	<u>Последовательность нуклеиновых кислот</u> <u>241KS</u>	GGCATTCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCA TGATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTAT ATCAGGTAGTCCATGGACATTAATTTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTC AATGAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTT GGTGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATTATGTTTTACG AATTGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAACATTAATTAATTAATTTCTTTTAC TTGGGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATG TCCCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTTCTACTTGGGATCACAA AGCAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGGTATTTCAGGAGGCTGGTGGTGGCAT GATGAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAGCT CTAAGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGAAGTCTCAAATGGAAGGTTATA CTCTATAAAATCAACCAAATGTTGATCCATCCAACAGATTGAGAAAGCTTTGAA

55	<u>Последовательность нуклеиновых кислот 242KQ</u>	ATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGT ATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATC AGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAAT GAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGT TGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATATGTTTTACGAAT TGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAACATTATATGAATATCTTTTTACTTGG GGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCC CCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTTACTTTGGGATCACAAAGC AAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGAT GAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCACAACTA AGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAATGGAAGTTATACTC TATAAAATCAACCAAATGTTGATCCATCCAACAGATT CAGAAAGCTTTGAA
56	<u>Последовательность нуклеиновых кислот 242KS</u>	ATTCCTGCTGAATGTACCACCATTTATAACAGAGGTGAACATACAAGTGGCATGT ATGCCATCAGACCCAGCAACTCTCAAGTTTTTCATGTCTACTGTGATGTTATATC AGGTAGTCCATGGACATTAATTCAACATCGAATAGATGGATCACAAAACCTCAAT GAAACGTGGGAGAACTACAAATATGGTTTTGGGAGGCTTGATGGAGAATTTTGGT TGGGCCTAGAGAAGATATACTCCATAGTGAAGCAATCTAATATGTTTTACGAAT TGAGTTGGAAGACTGGAAAGACAACAACATTATATGAATATCTTTTTACTTGG GGAAATCACGAAACCAACTATACGCTACATCTAGTTGCGATTACTGGCAATGTCC CCAATGCAATCCCGGAAAACAAGATTTGGTGTCTTACTTTGGGATCACAAAGC AAAAGGACACTTCAACTGTCCAGAGGTTATTCAGGAGGCTGGTGGTGGCATGAT GAGTGTGGAGAAAACAACCTAAATGGTAAATATAACAAACCAAGAGCAAGCTCTA AGCCAGAGAGGAGAAGAGGATTATCTTGGAAGTCTCAAATGGAAGTTATACTC TATAAAATCAACCAAATGTTGATCCATCCAACAGATT CAGAAAGCTTTGAA
57	<u>Последовательность нуклеиновых кислот с227KQ</u>	TTTTTGCATCTCAACGAAACGAAGAATGTGGAACACAACGACATTCGGCAAATT GCACAATATCTACAATAGAGGCGAACATACGTCGGGTATCTACTCCATTAGACC TTCAAACAGCCAGGTATTCAATGTGTACTGCGATGTAAAGTCAGGATCGTCATGG ACACTGATCCAGCATAGGATCGACGGGTCCCAGAACTTCAACGAGACATGGGAGA ACTACCGCTATGGATTTGGAAGGCTGGATGGGGAGTTCTGGTTGGGACTTGAGAA AATCTACAGCATTGTGAAGCAGTCGAACTACATTCTCCGGATTGAACTGGAGGAC TGGAATGACAACAACACTACATCGAGTATTTCTTTCATCTCGGCAACCATGAAA CGAATTACACCTTGCACCTTGTGGAATCACGGGCAACATTTTGAACGCGCTGCC AGAACACAAGACCTGGTGTCTTTCGACATGGGATCACAAAGCAAAGGGGCACGTG AACTGTCCCGAATCATATAGCGGGGGATGGTGGTGGCACAATGTCTGTGGTGA ACAATCTCAACGGGAAATACAATAAGCAGCGAGCTCAGACGAAACCCGAGCGGGC GAGAGGTCTGTATTGGAAGTCGAGAATGGACGCCTGTATTCGATCAAATCGACG AAAATGCTCATCCACCCCATCGACTCCGAATCGTCCGGAG
58	<u>207Kdel</u>	IQEPTTEISLSKPRAPRTTFFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAI RPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGL EKIYSIVKQSNYVLRILELWKNKHIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNA IPENKDLVFTWDHKAKGHFNCEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPER RRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE
59	<u>225Kdel</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNYVLRILE LEDWKNKHIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAK GHFNCEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTDSESFE
60	<u>226Kdel</u>	TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNYVLRILE EDWKNKHIEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFTWDHKAKG HFNCEGYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKS TKMLIHPTDSESFE

61	<u>228Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELED WKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTK MLIHPTDSESEFE
62	<u>233Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP TDSESEFE
63	<u>241Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFY LGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
64	<u>242Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFY LGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFE
65	<u>225-455Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAK GHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK STKMLIHPTD
66	<u>226-455Kdel</u>	TPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISG PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIE LEDWKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKG HFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIK TKMLIHPTD
67	<u>228-455Kdel</u>	FLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPW TLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELED WKDNKHIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHF NCPEGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTK MLIHPTD
68	<u>233-455Kdel</u>	EIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQH RIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNK HYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHP TD
69	<u>241-455Kdel</u>	GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF NETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFY LGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD
70	<u>242-455Kdel</u>	IPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNF ETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFY LGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVSTWDHKAKGHFNCP EGYSGGWWHDECGENNLNGKYNKPRASKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD

71	hANGPTL1 1-491	MKTFWTGLVLFLLVDTGHCRRGGQFKIKKINQRRYPRATDGKEEAKKCAYTFVLP EQRITGPICVNTKGDASTIKDMITRMDLENLKDVLRSQKREIDVLQLWDVDGNI VNEVKLLRKESRNMNSRVTLQYMLLHEIIRKRDNSLELSQLENKILNVTTMLKM ATRYRELEVKYASLTDLVNNSQVSMITLLEEQLRIFSRQDTHVSPPLVQWPQHIP NSQQYTPGLLGGNEIQRDPGYPRDLMPPDLATSPTKSPFKIPPVTFINEGPFKDC QQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNQPMQLWCENSLDPGGWTVIQKRTDGSVNFNWE NYKKGFNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAEYSSFRLEPES EFYRLRLGTQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYAGNCAHFHKGWYNACAHS NLNGVWYRGGHYRSKHQDGI FWAERYGGSYS LRAVQMMIKPID
72	CT hANGPTL1 271-491	FINEGPFKDCQQAKEAGHSVSGIYMIKPENSNQPMQLWCENSLDPGGWTVIQKRTD GSVNFNWNENYKKGFNIDGEYWLGLENIYMLSNQDNYKLLIELEDWSDKKVYAE YSSFRLEPESEFYRLRLGTQGNAGDSMMWHNGKQFTTLDRDKDMYAGNCAHFHKG GWYNACAHSNLNGVWYRGGHYRSKHQDGI FWAERYGGSYS LRAVQMMIKPID
73	hANGPTL4 1-406	MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLR EHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTGSTDLPAPESRVDPVLSLQTLKAQ NSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKKLDHEVAKPARRKRLPEM AQPVDPAHNVSRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPGSPPFLVNCMTSDGGW TVIQRRHDGSVDFNRPEAYKAGFGDPHGEFVLGLEKVVHSITGDRNSRLAVQLRDW DGNALLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLR RDKNCAKSLSGGWFGTCSHNSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLOA TTMLIQPMAEEAAS
74	CT hANGPTL4 179-406	SRLHRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPGSPPFLVNCMTSDGGWTVIQRRHDGS VDFNRPEAYKAGFGDPHGEFVLGLEKVVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNALLQFS VHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHDLRDKNCAKSL SGGWFGTCSHNSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLOATMLIQPMA EAAS

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид с хондрогенной активностью, содержащий аминокислотную последовательность, которая по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 95% идентична любой аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 и SEQ ID NO:70, причем аминокислота в положении 423 представляет собой Q или аминокислота в положении 423 удалена, как определено по отношению к SEQ ID NO:1.

2. Полипептид по п.1, в котором полипептид содержит SEQ ID NO:28.

3. Полипептид по п.1, в котором полипептид состоит из любой аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 и SEQ ID NO:70.

4. Полипептид по п.1, который состоит из SEQ ID NO:28.

5. Полипептид по любому из пп.1-4, в котором полипептид является ПЭГилированным.

6. Фармацевтическая композиция для лечения, облегчения течения или профилактики артрита или повреждения хряща у пациента, содержащая терапевтически эффективное количество полипептида по любому из пп.1-5.

7. Способ лечения, облегчения течения или профилактики артрита или повреждения хряща у пациента, включающий введение в сустав пациента терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.6.

8. Способ по п.7, при котором у пациента имеется артрит или повреждение хряща.

9. Способ по п.7, при котором у пациента существует риск возникновения артрита или повреждения хряща.

10. Способ по п.8 или 9, при котором артрит представляет собой остеоартрит, травматический артрит или аутоиммунный артрит.

11. Способ по любому из пп.7-10, при котором композиция дополнительно содержит гиалуроновую

кислоту.

12. Способ по любому из пп.7-11, дополнительно включающий хирургическое вмешательство на пораженном суставе.

13. Способ по п.12, при котором введение фармацевтической композиции происходит во время или после хирургического вмешательства.

14. Способ по п.7, при котором введение фармацевтической композиции происходит в сочетании с заменой хряща, имплантацией аутологичных хондроцитов (ACI) или матрикс-индуцированной имплантацией аутологичных хондроцитов (MACI).

15. Способ индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты, включающий приведение мезенхимальных стволовых клеток в контакт с эффективным количеством полипептида по любому из пп.1-5 для индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты.

16. Способ по п.15, при котором способ осуществляют *in vivo* и стволовые клетки присутствуют в организме индивида-человека.

17. Способ по п.16, при котором у индивида имеется артрит или повреждение хряща.

18. Способ по п.16, при котором у индивида имеется риск возникновения артрита или повреждения хряща.

19. Способ по п.17 или 18, при котором артрит представляет собой остеоартрит, травматический артрит или аутоиммунный артрит.

20. Способ лечения, облегчения течения или профилактики артрита или повреждения хряща у индивида, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества полипептида по любому из пп.1-5.

21. Способ по п.20, при котором индивид имеет артрит или повреждения хряща.

22. Способ по п.20, при котором индивид находится в группе риска возникновения артрита или повреждения хряща.

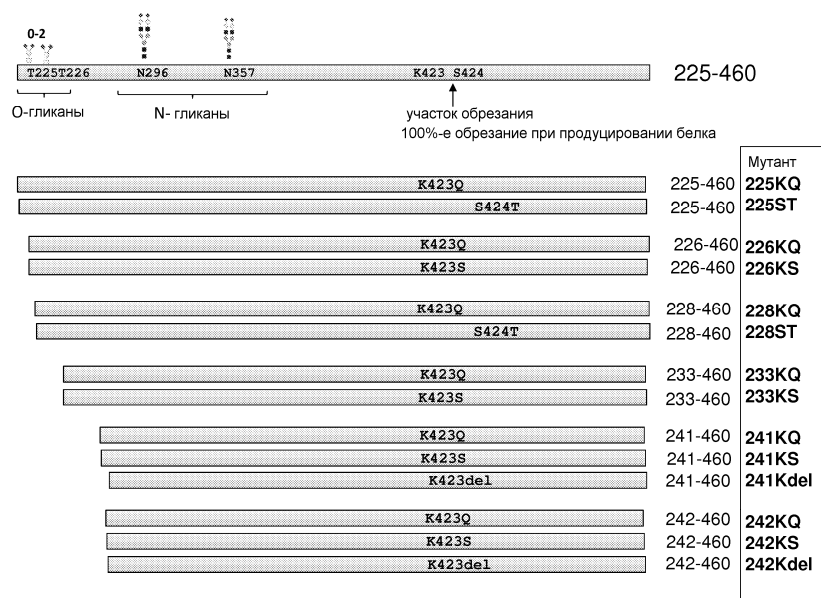
23. Способ по п.21 или 22, при котором артрит представляет собой остеоартроз, травматический артрит или аутоиммунный артрит.

24. Способ по любому из пп.20-23, дополнительно включающий введение гиалуроновой кислоты.

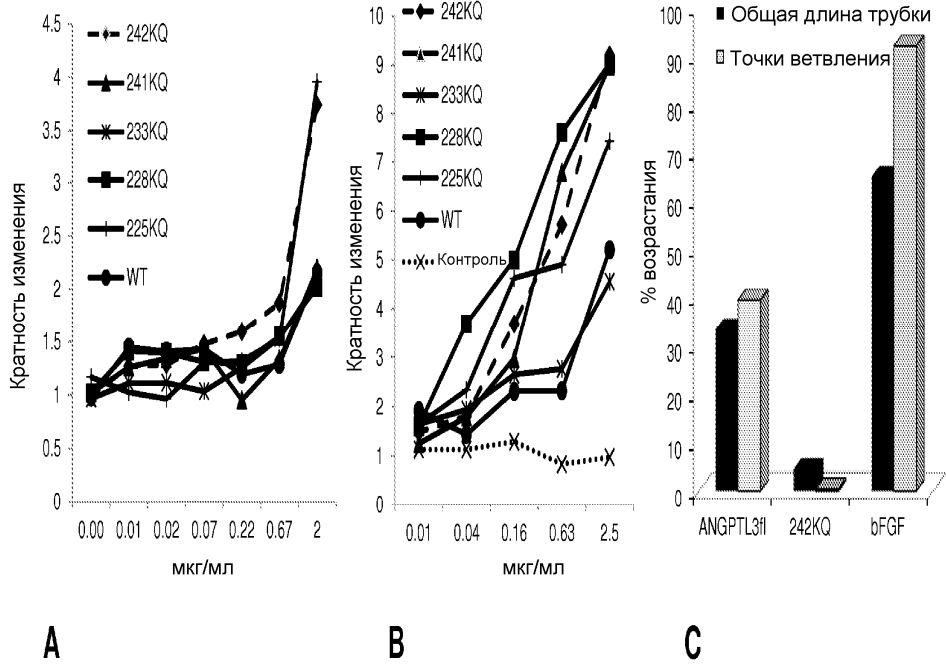
25. Способ по любому из пп.20-24, дополнительно включающий хирургическое вмешательство на пораженном суставе.

26. Способ по п.25, при котором введение полипептида происходит во время или после хирургического вмешательства.

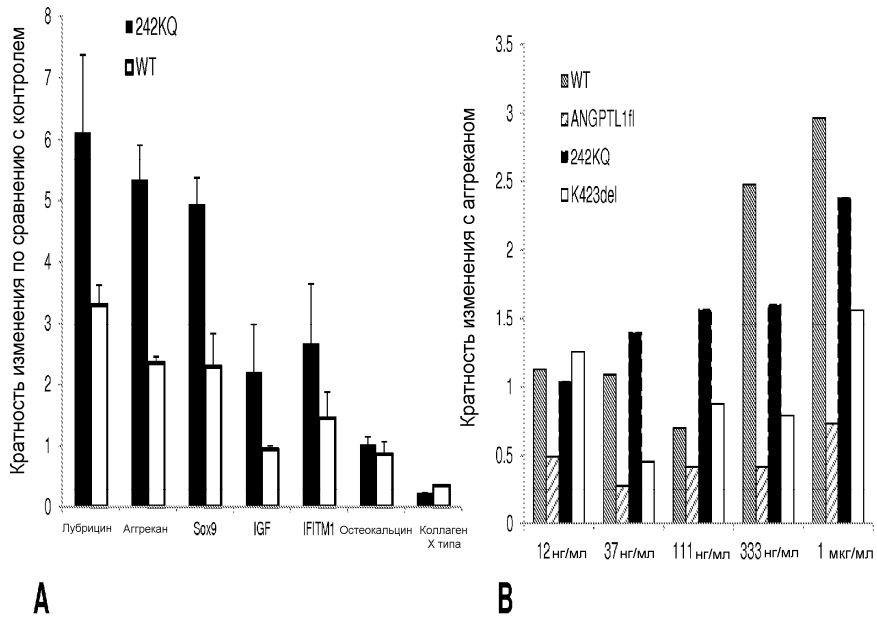
27. Способ по п.20, при котором введение полипептида происходит в сочетании с заменой хряща, имплантацией аутологичных хондроцитов (ACI) или матрикс-индуцированной имплантацией аутологичных хондроцитов (MACI).



Фиг. 1

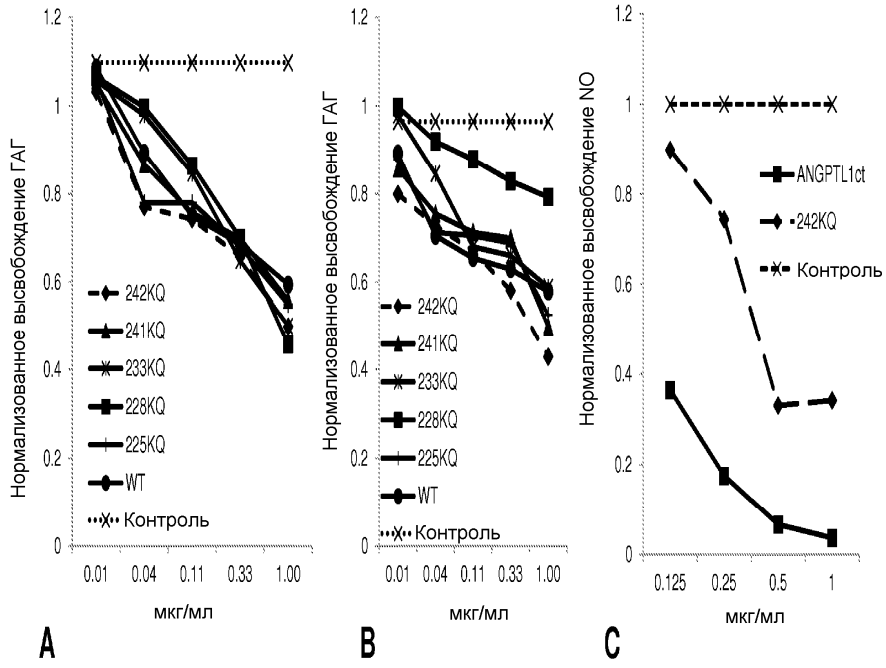


Фиг. 2

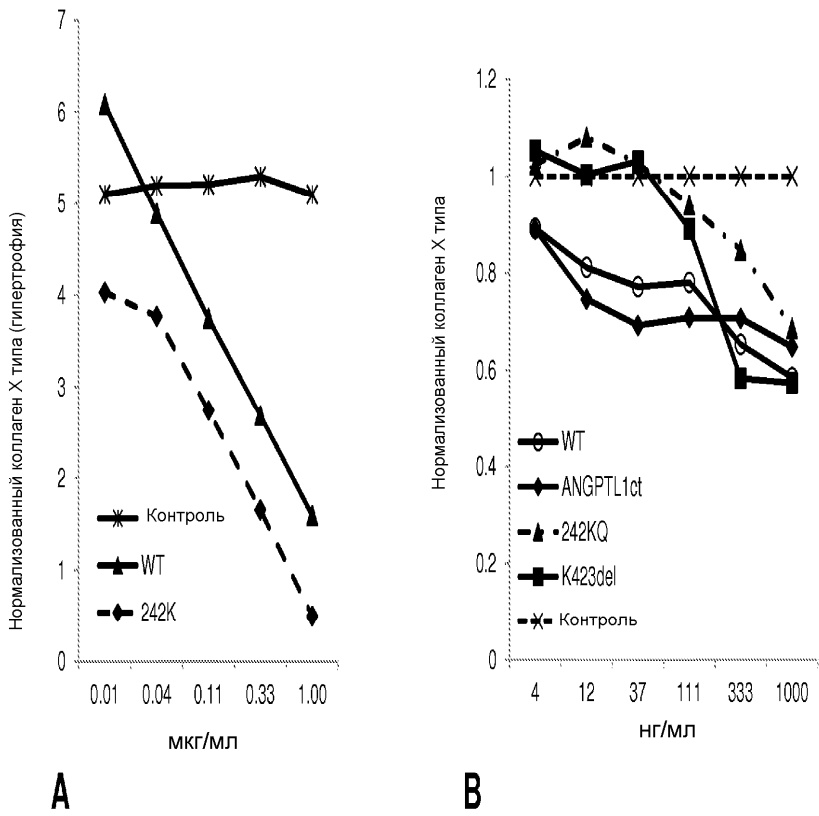


Фиг. 3

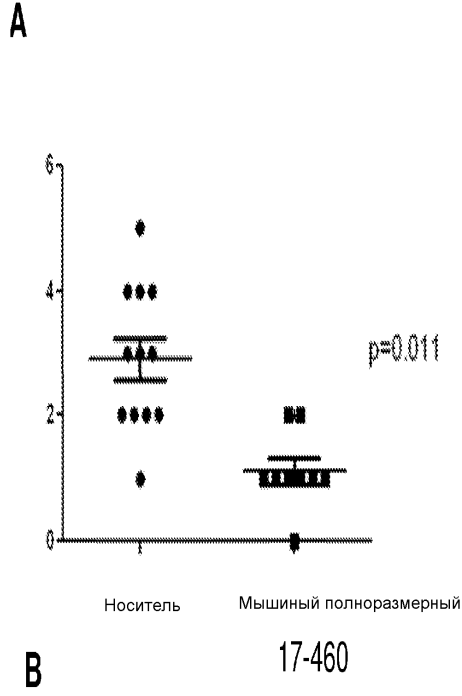
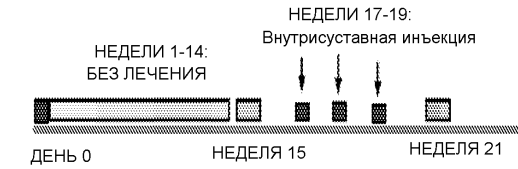




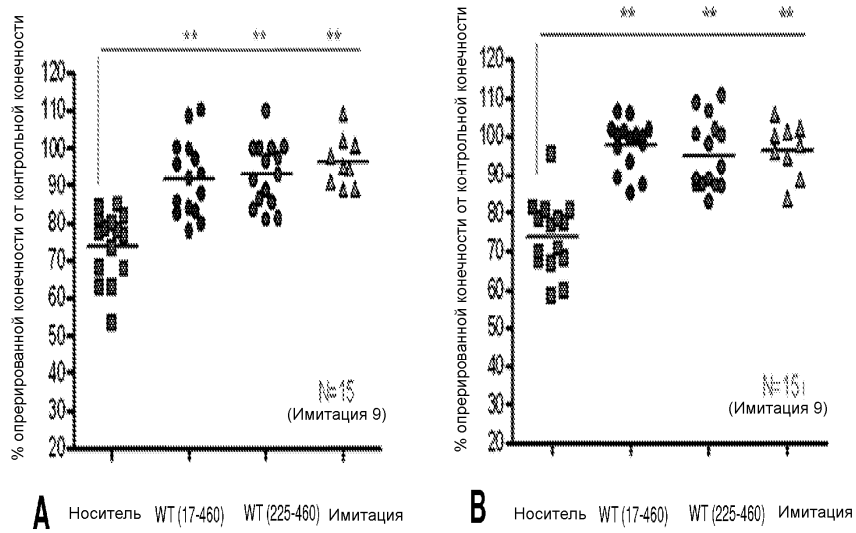
Фиг. 4



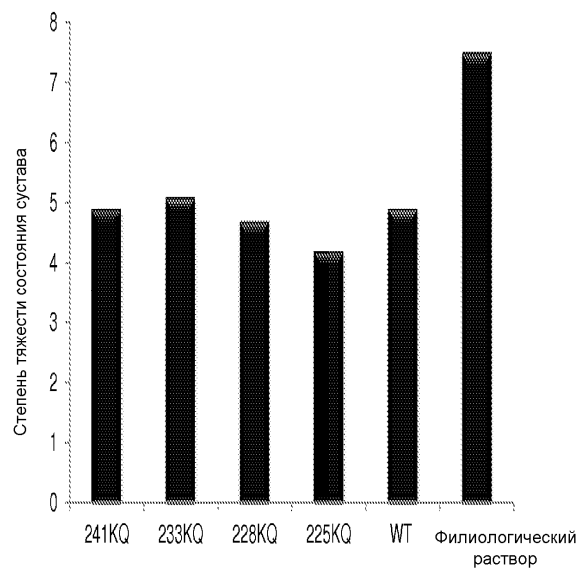
Фиг. 5



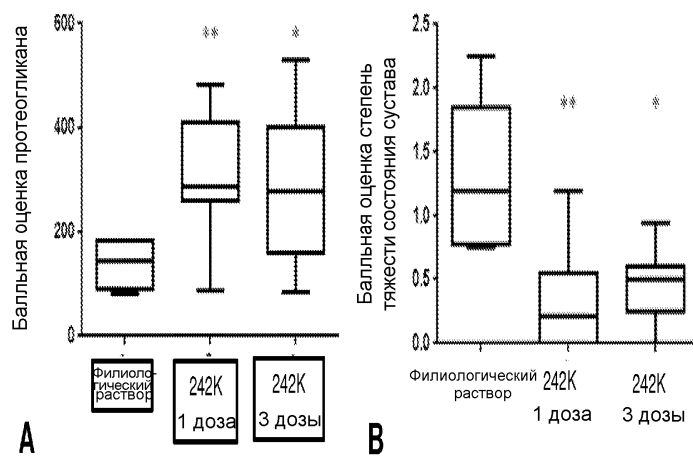
Фиг. 6



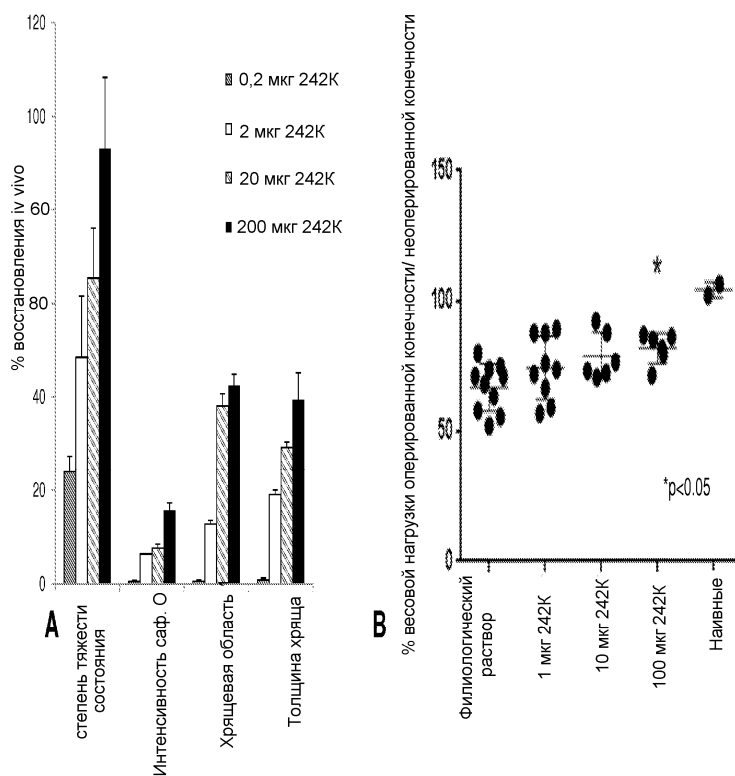
Фиг. 7



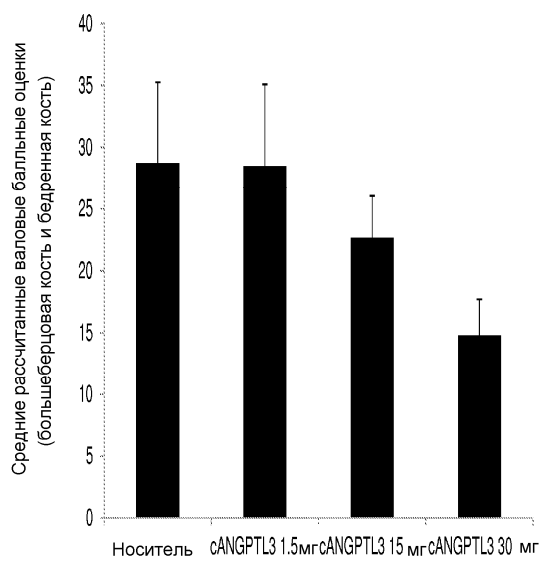
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

