

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037979**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.06.18**

**(21)** Номер заявки  
**201890389**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.02.27**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 47/64* (2017.01)  
*A61K 49/00* (2006.01)  
*C07K 5/02* (2006.01)  
*C07K 14/00* (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ КОНЬЮГАТА ХТЕН И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

---

**(31)** 61/634,312; 61/690,187; 61/709,942

**(32)** 2012.02.27; 2012.06.18; 2012.10.04

**(33)** US

**(43)** 2018.07.31

**(62)** 201491441; 2013.02.27

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АМУНИКС ОПЕРЕЙТИНГ ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Шелленбергер Фолькер, Подуст**  
**Владимир, Ван Цзя-Вэй, Маклафлин**  
**Брайант, Сим Би-Чэн, Дин Шен, Гу**  
**Чэнь (US)**

**(74)** Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,**  
**Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев**  
**А.В. (RU)**

**(56)** WO-A1-2011144756  
US-A1-20100239554  
US-A1-20090092582  
EVA BENGTSSON et al. The Amino-terminal  
Part of PRELP Binds to Heparin and Heparan Sulfate.  
The Journal of Biological Chemistry, 2000, Vol. 275,  
No. 52, pp. 40695-40702, реферат, с. 40699-40702

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к композициям рекомбинантных полипептидов с расширенными свойствами (ХТЕН), композициям конъюгатов, состоящих из полипептидов ХТЕН и полипептидов ХТЕН, связанных с кросс-линкерами, пригодными для конъюгации с фармакологически активными нагрузочными веществами, методам получения высокоочищенных полипептидов ХТЕН, методам получения конъюгатов ХТЕН-линкер и ХТЕН-нагрузочное вещество и методам применения композиций ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-нагрузочное вещество.

---

**B1**

**037979**

**037979**

**B1**

### Ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка истребует приоритет по предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/634312, поданной 17 февраля 2012 г., предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/690187, поданной 18 июня 2012 г., и предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/709942, поданной 4 октября 2012 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Уровень техники

Продление периода полувыведения лекарственного средства, которое является лечебным белком, пептидом или небольшой молекулой, часто требует использования специальных рецептур или модификации самого лечебного фактора. Стандартные способы модификации, такие как пэгилирование, добавление к лечебному агенту фрагмента антитела или молекулы альбумина, имеют несколько принципиальных недостатков. В то время как эти модифицированные формы могут быть получены в промышленном масштабе, эти стандартные способы обычно подвержены недостаткам из-за высокой стоимости сырья, сложности процесса производства и низкого качества конечного продукта. Нередко является сложным, даже невозможным очистить целевой материал до гомогенного состояния. Это утверждение, в частности, справедливо для процесса пэгилирования, в котором саму реакцию невозможно точно контролировать для получения гомогенного набора пэгилированных агентов, которые несут одинаковое количество или массу полиэтиленгликоля. В дальнейшем, метаболиты этих пэгилированных агентов могут обладать серьезным побочным действием. Например, было обнаружено, что пэгилированные белки вызывают вакуолизацию почечных канальцев на моделях животных (Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G. & Shopp, G. Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicol. Sci.* 1998. 42, 152-157). выводимые почками пэгилированные белки или их метаболиты могут накапливаться в почках, приводя к образованию гидратов ПЭГ, которые препятствуют нормальной гломерулярной фильтрации. Кроме того, у животных и людей может индуцироваться образование антител к ПЭГ (Sroda, K. et al. Repeated injections of PEG-PE liposomes generate anti-PEG antibodies. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2005, 10, 37-47).

Поэтому сохраняется значительная потребность в получении альтернативных композиций и способов, пригодных для получения высокоочищенных форм лечебных агентов, обладающих увеличенным периодом полувыведения и приемлемой ценой.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности и обеспечение соответствующих преимуществ. Композиции и способы, раскрываемые в данном тексте, применимы не только для терапии, но также особенно подходят как средства для доклинических и клинических разработок вероятных лечебных агентов. В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности частично путем получения реагентов расширенного рекомбинантного полипептида (ХТЕН), которые могут быть очищены до гомогенного состояния одной или несколькими простыми стадиями и/или которые пригодны для химической конъюгации с нагрузочными пептидами, белками или небольшими молекулами с реакционноспособными группами, используя широкое разнообразие методов конъюгации. Использование ХТЕН-реагентов обеспечивает с высоким выходом образование продукта ХТЕН-связанного агента, который в одном или большем количестве аспектов является исключительным, включая высокую гомогенность, высокую растворимость, длительную стабильность и повышенный конечный период полувыведения по сравнению с неконъюгированным продуктом. Настоящее изобретение частично относится к новым композициям, содержащим в основном гомогенные расширенные рекомбинантные полипептиды (ХТЕН), подходящие в качестве конъюгационных участников для связывания с одним или более нагрузочных фармакологически или биологически активных агентов, что приводит к получению композиций ХТЕН-нагрузочное вещество. В одном аспекте это изобретение предлагает полипептид ХТЕН, сконструированный для ковалентного связывания с одним или более непосредственно или через кросс-линкеры, обеспечивая получение композиций ХТЕН-нагрузочное вещество, которое включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более молекул одного, двух, трех и более типов нагрузочных веществ. Объектом настоящего изобретения является предоставление таких сконструированных полипептидов ХТЕН, которые используются в получении конъюгатов с интересующими нагрузочными агентами в виде композиций с расширенными фармацевтическими свойствами, включающими расширенные фармакокинетические свойства. В этом изобретении предложены полипептиды ХТЕН, которые в основном гомогенные по длине и последовательности и которые пригодны для получения конъюгатов, содержащих ХТЕН, связанный с одним или более нагрузочных веществ, что приводит к получению конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество, обладающих высокой степенью чистоты. Такие конъюгаты высокой степени чистоты пригодны для получения фармацевтических композиций для пациентов с болезненным состоянием, для которого одно или более нагрузочных веществ обладает полезным действием для предупреждения, лечения или облегчения этого болезненного состояния. В первом аспекте изобретения предложены в основном композиции с гомогенным полипептидом ХТЕН, пригодные как конъюгационные участники для получения промежуточных веществ ХТЕН-кросс-линкер и композиций ХТЕН-нагрузочное вещество. В некоторых вариантах изобретения предоставляет в основном гомогенную попу-

ляцию полипептидов, включающих расширенный рекомбинантный полипептид (ХТЕН), и в которой по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул полипептида упомянутой популяции обладают идентичной длиной последовательностей. В одном варианте вышеуказанного осуществления изобретения полипептид ХТЕН обладает такими характеристиками: общее количество аминокислотных остатков в ХТЕН составляет по меньшей мере от 36 до около 3000 аминокислотных остатков; суммарное количество остатков глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P) составляет более 90% от общего количества аминокислотных остатков ХТЕН; последовательность ХТЕН в основном не содержит повторений, так что (i) последовательность ХТЕН не содержит три последовательные идентичные аминокислоты, если только эти аминокислоты не являются серином, (ii) по меньшей мере около 80%, или около 90%, или около 95% последовательности ХТЕН состоит из неперекрывающихся мотивов последовательности, каждый из мотивов последовательности состоит из от около 9 до около 14 аминокислотных остатков, в которых какие-либо два последовательных аминокислотных остатка не встречаются чаще, чем дважды в каждом из мотивов последовательности; или (iii) последовательность ХТЕН обладает числом подпоследовательностей меньше 10; последовательность ХТЕН несет больше 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или больше 99% случайных статистических клубков, определенных GOR-алгоритмом; последовательность ХТЕН несет меньше 2, или 3, или 4, или 5%  $\alpha$ -спиралей; последовательность ХТЕН несет меньше 2, или 3, или 4, или 5%  $\beta$ -слоев, определенных алгоритмом Чоу-Фасман; и последовательность ХТЕН не содержит вычисленных эпитопов Т-клеток при анализе алгоритмом ТЕРИТОРЕ, в котором расчет алгоритма ТЕРИТОРЕ для эпитопов в последовательности ХТЕН основан на значениях -8, или -9, или -10. В другом варианте вышеуказанного осуществления изобретения полипептид ХТЕН включает последовательность, обладающую по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 2, 3, 4 и 22-25.

В других вариантах осуществления изобретения композиции в основном гомогенного полипептида ХТЕН содержат один или большее количество аффинных маркеров. В одном варианте осуществления в изобретении предложена композиция в основном гомогенного полипептида ХТЕН, содержащего первый аффинный маркер, в которой первый аффинный маркер имеет связывающую аффинность к хроматографическому носителю, выбранному из группы, состоящей из носителей для хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (HIC), катионообменной, анионообменной, аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС) и иммобилизованными антителами. В одном варианте вышеуказанного осуществления изобретения первый аффинный маркер обладает по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94% или по меньшей мере около 95% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 7. В другом варианте вышеуказанного полипептида ХТЕН и аффинного маркера композиция дополнительно содержит одну или больше вспомогательных последовательностей. В одном варианте вспомогательная последовательность содержит последовательность, обладающую по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 10. В другом варианте вспомогательная последовательность выбирается из группы, состоящей из последовательностей KNPEQAEEQX1EET, в которой X1 является независимо S или R; ANPEQAEEQX1EET, в которой X1 - независимо S или R; KNPEQAEEQAEEQX1EET, в которой X1 - независимо S или R; KX2X3EQAEQAEEQX1EET, в которой X1 - независимо S или R, X2 - независимо K или N и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; KX2(X3)<sub>10</sub>QX1EET, в которой X1 - независимо S или R, X2 - независимо K или N и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; KX2(X3)<sub>7</sub>AEEQX1EET, в которой X1 - независимо S или R, X2 - K или N и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; KX2X3EQE(X3)<sub>3</sub>AEEQREET, в которой X2 - независимо K или N и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; KX2X3EQE(X3)<sub>3</sub>AEE(X3)<sub>5</sub>, в которой X2 - независимо K или N и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; KKQEQEKEQAEEQ(X4X5)<sub>2</sub>REET, в которой X4 - независимо A или S и X5 - независимо K, Q или E; KKQEQEKEQAEEQ(X4X5)<sub>4</sub>REET, в которой X4 - независимо A или S и X5 - независимо K, Q или E; KKQEQEKEQAEEQ(Z)<sub>4</sub>REET, в которой Z - любая встречающаяся в природе L-аминокислота; KX2(X3)<sub>n</sub>, в которой n - целым числом в пределах 10-40 и X2 - независимо K или N и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; (X3)<sub>n</sub>, в которой n - целое число в пределах 10-50 и X3 - независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; KX2QEQEKEQAEEQ(X4X5)<sub>n</sub>X1EET, в которой n равно нулю или целому числу в пределах 1-10 и X1 - независимо S или R, X2 - независимо K или N, X4 - независимо A или S и X5 - независимо K, Q или E; KX2(X3)<sub>n</sub>(X4X5)<sub>m</sub>X1EET, в которой n является целым числом в пределах 5-20, m равно нулю или целому числу в пределах 1-10, X1 - независимо S или R, X2 -

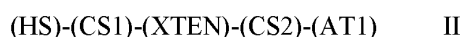
независимо К или N, X3 - независимо К, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S, X4 - независимо А или S и X5 - независимо К, Q или Е и  $KX_2(X_3)_n(Z)_mX_1EET$ , в которой n является целым числом в пределах 5-20, m равно нулю или целому число в пределах 1-10, X1 - независимо S или R, X2 - независимо К или N, X3 - независимо К, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S, и Z - любая встречающаяся в природе L-аминокислота и любая гомологичная последовательность, обладающая по меньшей мере 80, 90, 95, 98 или 99% идентичности с последовательностью вышеуказанных последовательностей при оптимальном выравнивании.

В другом варианте вышеуказанных композиций, в основном гомогенного полипептида XTEN, аффинного маркера и вспомогательной последовательности, эта композиция дополнительно содержит первую расщепляемую последовательность. Если требуется, расщепляемая последовательность выбирается из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 8 и 9. В одном варианте вышеизложенного композиция обладает конфигурацией согласно формуле I



где HS - вспомогательная последовательность; AT1 - первый аффинный маркер; CS1 - первая расщепляемая последовательность и XTEN - расширенный рекомбинантный полипептид.

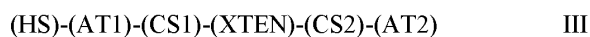
В другом варианте вышеуказанных композиций композиция дополнительно содержит вторую расщепляемую последовательность. Если требуется, первая и вторая расщепляемые последовательности способны расщепляться теми же протеазами и для которых композиция обладает конфигурацией согласно формуле II



где HS - вспомогательная последовательность; AT1 - первый аффинный маркер; CS1 - первая расщепляемая последовательность, CS2 - вторая расщепляемая последовательность и XTEN - расширенный рекомбинантный полипептид.

В другом варианте вышеуказанных композиций первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR, NNNNNN или любой аффинный маркер, известный в этой области или раскрываемый в данном тексте. В других вариантах осуществления композиций в основном гомогенных полипептидов XTEN, эти композиции включают первый и второй аффинные маркеры, первую и вторую расщепляемые последовательности и вспомогательную последовательность, в которых второй аффинный маркер отличается от первого аффинного маркера и обладает связующей аффинностью к другому хроматографическому носителю, отличному от первого аффинного маркера, при этом хроматографический носитель выбирается из множества, состоящего из HIC, катионообменной, анионообменной, IMAC и хроматографии с иммобилизованными антителами и, при этом первая и вторая расщепляемые последовательности способны расщепляться той же протеазой, и при этом аффинный маркер обладает по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94% или по меньшей мере около 95% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 7.

В одном варианте вышеизложенной композиции эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле III



где HS - вспомогательная последовательность; AT1 - первый аффинный маркер; CS1 - первая расщепляемая последовательность, CS2 - вторая расщепляемая последовательность, XTEN - расширенный рекомбинантный полипептид и AT2 - второй аффинный маркер. В другом варианте вышеуказанной композиции первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR, а второй аффинный маркер содержит последовательность NNNNNN. В другом варианте вышеуказанной композиции первый аффинный маркер содержит последовательность NNNNNN, а второй аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR. В другом варианте вышеуказанной композиции первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, а второй аффинный маркер содержит последовательность NNNNNNNN.

В другом аспекте в данном изобретении предложены композиции, содержащие в основном гомогенную популяцию полипептида, полученного в технологическом процессе. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции получают в процессе, включающем культивирование клеток-хозяин, которые содержат вектор, кодирующий полипептид в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии данного полипептида путем экспрессии неочищенного продукта клеткой-хозяин, при которой закодированный полипептид включает полипептид XTEN, первую расщепляемую последовательность и первый аффинный маркер; адсорбцию полипептида неочищенного продукта экспрессии на первом хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера на первом хроматографическом носителе; элюирование полипептида и выделение полипептида. В некоторых вариантах по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% полипептидов полученной популяции имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель выбирается из множества, состоящего из HIC, катионообменной, анионообменной и IMAC-хроматографии. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции аффинный маркер выбирается из группы, состоящей из аффинных маркеров табл. 7. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является катионообменным и первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR. В другом вариан-

те вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является и ИМАС носителем и первый аффинный маркер содержит последовательность НННННННН. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции кодирующий вектор кодирует любые варианты осуществления полипептида ХТЕН, описанные в данном тексте, содержащие, по меньшей мере, аффинный маркер, по меньшей мере, первую расщепляемую последовательность, вспомогательную последовательность и в некоторых случаях вторую расщепляемую последовательность. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции вектор дополнительно кодирует вторую расщепляемую последовательность и второй аффинный маркер, в которых первая и вторая расщепляемые последовательности способны расщепляться той же протеазой, и при этом второй аффинный маркер обладает связующей аффинностью к второму другому хроматографическому носителю, отличному от первого аффинного маркера, при этом композиция получается в процессе, дополнительно включающем адсорбцию полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера на втором хроматографическом носителе; элюирование полипептида и выделение полипептида, в котором по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% популяции полипептидов обладают идентичной длиной последовательности. В одном варианте осуществления первый хроматографический носитель отличается от второго хроматографического носителя и каждый из первого и второго хроматографического носителя независимо выбираются из множества, состоящего из ИС, катионообменной, анионообменной и ИМАС-хроматографии. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является катионообменным, а первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, и второй хроматографический носитель является ИМАС-носителем, а первый аффинный маркер содержит последовательность НННННННННН или НННННННННН. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является ИМАС-носителем, а первый аффинный маркер содержит последовательность НННННННННН или НННННННННН, и второй хроматографический носитель является катионообменным, а первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR. В другом варианте вышеуказанные композиции содержат первый или первый и второй аффинные маркеры, которые в дальнейшем процессируют обработкой композиции протеазой в условиях, эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности(ей), при этом высвобождая полипептид ХТЕН от аффинного(ых) маркера(ов); адсорбцией ХТЕН на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания полипептида ХТЕН, но не аффинного(ых) маркера(ов) или протеазы; элюирования ХТЕН и выделения полипептида ХТЕН. В получаемой композиции по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных ХТЕН-молекул имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способны расщепляться протеазой, выбранной из множества протеаз в табл. 9. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способна(ы) расщепляться трипсином и протеаза является трипсином. В другом варианте вышеуказанной композиции хроматографический носитель является анионообменным. Анионообменный носитель может быть носителем, выбранным из группы, состоящей из носителей масгосар Q, сарто Q, superQ-650M и rogos D. Альтернативно, вышеуказанные композиции содержат один аффинный маркер или два аффинных маркера, которые в дальнейшем процессируют обработкой композиции в условиях, эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности(ей), при этом высвобождая полипептид ХТЕН от одного или двух аффинных маркеров; адсорбцией ХТЕН на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания протеазы и аффинных маркеров, но не полипептида ХТЕН, и выделением полипептида ХТЕН из элюата. В некоторых вариантах в получаемом элюате по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных ХТЕН-молекул имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способна(ы) расщепляться протеазой, выбранной из множества протеаз в табл. 9. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способна(ы) расщепляться трипсином и используемая протеаза является трипсином. Хроматографический носитель может выбираться из одного или более носителей для катионообменной, ИС или ИМАС-хроматографии. В другом аспекте данное изобретение относится частично к полипептидным композициям, которые могут расщепляться на сегменты ХТЕН равной длины и одинаковой последовательности. В одном варианте осуществления изобретения предлагается композиция, включающая последовательность ХТЕН, в которой последовательность ХТЕН дополнительно содержит одну или большее количество расщепляемых последовательностей, способных разрушаться трипсином, и при этом обработка трипсином в условиях, эффективных для разрушения всех расщепляемых последовательностей, приводит к получению ХТЕН-фрагментов, причем каждый ХТЕН-фрагмент обладает по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью с любым другим фрагментом этого препарата. В одном варианте осуществления композиции расщепляемая последовательность обладает по меньшей мере 86% идентичности последовательности или является идентичной последовательности SASRSA или SASKSA. В другом варианте композиции расщепляемая последовательность включает последовательность RX или KX, в которых X является какой-либо L-аминокислотой, но не пролином. В одном варианте вышеуказанного осуществления композиций ХТЕН-композиция обладает последова-

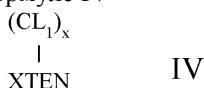
тельностью по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с последовательностями, выбранными из множества последовательностей, отраженных в табл. 6.

В другом аспекте данное изобретение относится частично к способам получения ХТЕН-фрагментов в основном равной длины и одинаковой последовательности. В одном варианте изобретение предоставляет способ получения в основном гомогенной популяции полипептида ХТЕН, данный способ включает обработку популяции, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 6, трипсином в условиях, эффективных для разрушения всей(х) расщепляемой(ых) последовательности(ей), что приводит к получению в основном гомогенной популяции полипептидов ХТЕН, в которой по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул ХТЕН-фрагментов имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте вышеуказанного способа данный способ дополнительно включает адсорбцию ХТЕН-фрагментов на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания ХТЕН-фрагментов, но не протеазы; элюирование ХТЕН-фрагментов и выделение ХТЕН-фрагментов, при этом по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул популяции имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте вышеуказанного способа хроматографический носитель является анионообменным. Носитель может быть выбран из группы, состоящей из носителей: масгосар Q, сарто Q, супер Q-650M и порос D. В другом варианте реализации вышеуказанного способа полипептид ХТЕН обладает последовательностью по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности с последовательностями, выбранными из множества последовательностей, отраженных в табл. 6. В другом варианте реализации вышеуказанного способа получаемый ХТЕН-фрагмент обладает последовательностью по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 или 3. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает композиции полипептидов ХТЕН, полученные в процессе вышеуказанных способов его осуществления. В другом аспекте данное изобретение относится частично к способам получения высокого выхода экспрессии в клетке-хозяине полипептидов ХТЕН. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предлагает способ, включающий культивирование клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность ХТЕН и вспомогательную последовательность в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии полипептида, как компонента неочищенного продукта экспрессии в концентрации больше чем около 2 г/л, или около 3 г/л, или около 4 г/л, или около 5 г/л, или около 6 г/л, или около 7 г/л упомянутого полипептида. В одном варианте вышеуказанного способа вышеизложенные выходы экспрессии достигаются, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 100, или по меньшей мере 130, или по меньшей мере 150 при длине волны 600 нм. В другом варианте реализации данное изобретение предлагает способ, включающий культивирование клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность ХТЕН и вспомогательную последовательность в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии полипептида как компонента неочищенного продукта экспрессии в концентрации больше чем около 10 мг/л сухой массы клеток-хозяев, или по меньшей мере около 15 мг/л, или по меньшей мере около 20 мг/л, или по меньшей мере около 25 мг/л, или по меньшей мере около 30 мг/л, или по меньшей мере около 40 мг/л, или по меньшей мере около 50 мг/л упомянутого полипептида. В одном варианте вышеуказанного способа вышеизложенные высокие выходы экспрессии достигаются, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 100, или по меньшей мере 130, или по меньшей мере 150 при длине волны 600 нм. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает способ, включающий культивирование клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность ХТЕН и вспомогательную последовательность в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии полипептида, как компонента неочищенного продукта экспрессии в концентрации больше чем около 10 мг/л сухой массы клеток-хозяев, или по меньшей мере около 250 мкмоль/л, или по меньшей мере около 300 мкмоль/л, или по меньшей мере около 350 мкмоль/л, или по меньшей мере около 400 мкмоль/л, или по меньшей мере около 450 мкмоль/л, или по меньшей мере около 500 мкмоль/л упомянутого полипептида. В одном варианте вышеуказанного способа вышеизложенные выходы экспрессии достигаются, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 100, или по меньшей мере 130, или по меньшей мере 150 при длине волны 600 нм. В одном варианте вышеуказанной реализации изобретения вспомогательная последовательность экспрессируемого полипептида является N-концевым полипептидом, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94 или 95% идентичностью последовательности или является идентичной последовательности, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 10. В другом варианте осуществления вышеуказанных способов вектор экспрессии дополнительно кодирует первый аффинный маркер и расщепляемую последовательность между аффинным маркером и полипептидом ХТЕН, и данный способ дополнительно включает выделение неочищенного продукта экспрессии из реакционной смеси ферментации клеток-хозяев; адсорбцию полипептида неочищенного продукта экспрессии на первом хроматографическом носителе, при которой первый хроматографический носитель выбирается из группы, состоящей из носителей НИС, катионообменной, анионообменной и ИМАС-хроматографии; элюирование и выделение полипептида, в котором по

меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% полипептидов обладают идентичной длиной последовательности. В другом варианте осуществления вышеуказанных способов вектор экспрессии дополнительно кодирует первый аффинный маркер и второй аффинный маркер, отличный от первого аффинного маркера и расщепляемой последовательности между каждым аффинным маркером и полипептидом XTEN, и данный способ дополнительно включает выделение неочищенного продукта экспрессии из реакционной смеси ферментации клеток-хозяев; адсорбцию полипептида на хроматографическом носителе, при этом первый хроматографический носитель выбирается из группы, состоящей из носителей НИС, катионообменной, анионообменной и ИМАС-хроматографии; элюирование полипептида; адсорбцию полипептида на втором хроматографическом носителе, выбираемом из группы, состоящей из носителей НИС, катионообменной, анионообменной и ИМАС-хроматографии; элюирование полипептида и выделение полипептида, в котором по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% полипептидов обладают идентичной длиной последовательности. В одном варианте осуществления вышеуказанных способов данные способы дополнительно включают обработку полипептида протеазой в условиях, эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности(ей), таким образом из полипептида высвобождается XTEN; адсорбцию полипептида XTEN на анионном хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания XTEN; элюирование XTEN и выделение XTEN, при этом по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных XTEN-молекул имеют идентичную длину последовательностей. В вышеуказанных способах анионообменный носитель может быть носителем, выбранным из группы, состоящей из носителей масгосар Q, carto Q, super Q-650M и rogos D. В одном варианте осуществления вышеуказанных способов расщепляемая(ые) последовательность(и) способны расщепляться трипсином, и протеаза является трипсином. В другом варианте осуществления вышеуказанных способов данный способ дополнительно включает обработку полипептида протеазой в условиях, эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности(ей), таким образом из полипептида высвобождается XTEN; адсорбцию протеазы на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания протеазы и аффинных маркеров, но не XTEN, и выделение XTEN из элюата, в котором по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% полипептида XTEN обладает идентичной длиной последовательности. В одном варианте осуществления вышеуказанного способа расщепляемая последовательность способна расщепляться трипсином, и используемая протеаза является трипсином. В вышеуказанном способе для захватывания протеазы и аффинного маркера хроматографический носитель может выбираться из одного или более носителей для катионообменной, НИС или ИМАС-хроматографии.

В другом аспекте данное изобретение частично относится к твердой подложке, содержащей иммобилизованную на ней популяцию в основном идентичных молекул полипептида XTEN. В одном варианте реализации в данном изобретении предлагается твердая подложка, содержащая иммобилизованную на ней популяцию в основном идентичных молекул полипептида, при этом твердая подложка содержит иммобилизованную на ней популяцию в основном идентичных молекул полипептида, при этом твердая подложка содержит хроматографический носитель, иммобилизованные полипептиды, каждый включающий XTEN, первый аффинный маркер и второй аффинный маркер, при этом первый аффинный маркер присоединен к полипептиду XTEN расщепляемой последовательностью к N-концу XTEN и второй аффинный маркер присоединен к полипептиду XTEN расщепляемой последовательностью к C-концу и при этом второй аффинный маркер отличается от первого аффинного маркера, при этом хроматографический носитель способен связываться с упомянутым первым или вторым аффинным маркером, но не с обоими, и при этом по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% иммобилизованных молекул полипептида имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанного изобретения полипептид XTEN включает последовательность, обладающую по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 2, 3, 4 и 22-25, первый и второй аффинные маркеры каждый независимо обладает по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94% или по меньшей мере около 95% идентичностью последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, отображенных в табл. 7, и расщепляемая последовательность выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отображенных в табл. 8 и 9. В одном варианте осуществления вышеуказанного изобретения расщепляемая последовательность обладает по меньшей мере около 86% идентичности с последовательностью или является идентичной последовательности SASRSA или SASKSA. В одном варианте осуществления вышеуказанной реализации расщепляемая последовательность включает последовательность RX или KX, в которых X является какой-либо L-аминокислотой, но не пролином. В одном варианте осуществления вышеуказанного изобретения твердая подложка выбирается из множества, состоящего из хроматографической смолы НИС, катионообменной хроматографической смолы, анионообменной хроматографической смолы и хроматографической смолы ИМАС. В одном варианте осуществления вышеуказанного изобретения первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, а второй аффинный маркер содержит последовательность НННННННН или НННННННННН. В другом варианте осуществления вышеуказанного изобретения

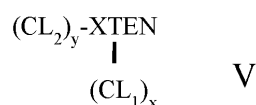
первый аффинный маркер содержит последовательность НННННН или НННННННН, а второй аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR. В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям полипептидов ХТЕН, конъюгационно связанных с кросс-линкерами. В некоторых вариантах в данном изобретении представлены композиции любых полипептидов ХТЕН, описанных в данном тексте, которые ковалентно связаны с одной или более молекул. по меньшей мере, первого кросс-линкера, в которых кросс-линкер выбирается из группы, содержащей кросс-линкеры, отображенные в табл. 13, алкиновые реактанты, отображенные в табл. 15, и азидные реактанты, отображенные в табл. 15. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции первый кросс-линкер присоединен. по меньшей мере, к первому полипептиду ХТЕН в положении, выбранном из множества, состоящего из  $\alpha$ -аминогрупп N-концевого аминокислотного остатка полипептида ХТЕН;  $\epsilon$ -аминогрупп каждого остатка лизина полипептида ХТЕН и тиоловой группы каждого остатка цистеина полипептида ХТЕН. При необходимости полипептид ХТЕН этого осуществления обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или на 100% идентичности последовательности к последовательности, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции полипептид ХТЕН выбирается из группы, состоящей из AE144, AE288, AE432, AE576, AE864, Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199 и кросс-линкера, конъюгационно присоединенного к  $\alpha$ -аминогруппе N-концевой аминокислоты полипептида ХТЕН. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции полипептид ХТЕН выбирается из группы, состоящей из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отображенных в табл. 3, и кросс-линкера, конъюгационно присоединенного к тиоловой группе каждого цистеинового остатка полипептида ХТЕН. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции первый кросс-линкер выбирается из множества, состоящего из N-малеинимида, йодацетила, пиридилдисульфида и винилсульфона, 3-пропаргилноксипропановой кислоты, (оксиэтил)<sub>n</sub>-ацетилен, где n равно 1-10, дибензилциклооктина (ДБЦО), циклооктина (ЦОТ), 3-азид-пропионовой кислоты, 6-азид-гексановой кислоты и (оксиэтил)<sub>n</sub>-азида, где n равно 1-10. В вышеизложенных в этом параграфе вариантах реализации данный конъюгат имеет конфигурацию согласно формуле IV



где независимо в случае каждого появления  $CL_1$  является кросс-линкером; x равно целому числу от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1. При необходимости полипептид ХТЕН этого осуществления включает последовательность, обладающую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы IV  $CL_1$  является кросс-линкером, выбранным из табл. 13. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций ХТЕН-кросс-линкер данные композиции дополнительно включают одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В одном варианте осуществления вышеуказанного первое нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций ХТЕН-кросс-линкер данные композиции дополнительно включают нагрузочное вещество, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11 и 12, присоединенных к каждому первому кросс-линкеру.

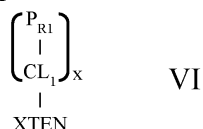
В других вариантах конъюгационных композиций ХТЕН-кросс-линкер в данном изобретении представлены композиции осуществления полипептидов ХТЕН, описанных в данном тексте, которые ковалентно связаны с одной или более молекул первого кросс-линкера, присоединенного к тиоловой группе каждого остатка цистеина ХТЕН или  $\epsilon$ -аминогруппе любого остатка лизина ХТЕН, а второй кросс-линкер присоединен к  $\alpha$ -аминогруппе N-концевой аминокислоты ХТЕН, при этом каждый кросс-линкер независимо выбирается из группы, содержащей кросс-линкеры, отображенные в табл. 13, алкин-реактанты, отображенные в табл. 15, и азидные реактанты, отображенные в табл. 15. В вышеизложенном осуществлении данная композиция обладает конфигурацией согласно формуле V





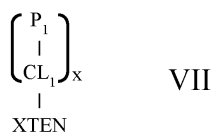
где независимо в случае каждого появления  $\text{CL}_1$  является первым кросс-линкером, присоединенным к остаткам цистеина  $\text{XTEN}$ ;  $\text{CL}_2$  - второй кросс-линкер, присоединенный к  $\text{XTEN}$  на N-конце;  $x$  - целое число от 1 до около 10;  $y$  - целое число от 1 с ограничением  $x+y \geq 2$ ; а  $\text{XTEN}$  является цистеином сконструированного полипептида  $\text{XTEN}$ , содержащего  $x$  остатков цистеина или лизином сконструированного полипептида  $\text{XTEN}$ , содержащего  $x$  остатков лизина. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций  $\text{XTEN}$ -кросс-линкер данные композиции дополнительно включают одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы, и одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому второму кросс-линкеру, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В одном варианте осуществления вышеуказанное первое нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, и второе нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть независимо выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21.

В некоторых вариантах композиции  $\text{XTEN}$ -кросс-линкер-нагрузочное вещество эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле VI



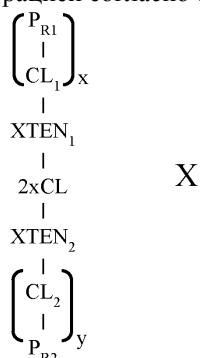
где независимо в случае каждого появления  $\text{P}_{\text{R}_1}$  является одноатомным остатком нагрузочного вещества, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы;  $\text{CL}_1$  является кросс-линкером;  $x$  равно целому числу от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равно 3, или равно 2, или равно 1. При необходимости полипептид  $\text{XTEN}$  этого осуществления включает последовательность, обладающую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы VI одноатомный остаток нагрузочного вещества выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте осуществления конъюгата формулы VI  $\text{CL}_1$  является кросс-линкером, выбранным из табл. 13. В одном варианте реализации конъюгата формулы VI каждый кросс-линкер связан с серой цистеина полипептида  $\text{XTEN}$ . В другом варианте осуществления конъюгата формулы VI каждый кросс-линкер связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида  $\text{XTEN}$ . В другом варианте осуществления конъюгата формулы VI,  $x$  равно 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой полипептида  $\text{XTEN}$ . В другом варианте осуществления конъюгата формулы VI  $\text{CL}_1$  является продуктом реакции первого и второго реагентов климми, выбранных из табл. 15. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы VI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул  $\text{XTEN}$  препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций  $\text{XTEN}$ -кросс-линкер данные композиции дополнительно включают первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому из первых кросс-линкеров, при этом нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, и второе нагрузочное вещество отличается от первого нагрузочного вещества присоединением к второму кросс-линкеру, при этом второе нагрузочное вещество, выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции  $\text{XTEN}$ -кросс-линкер-нагрузочное вещество данная композиция включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому из первых кросс-линкеров, при этом нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из компонентов лекарственных веществ табл. 21 и второе нагрузочное вещество отличается от первого нагрузочного вещества, присоединением к второму кросс-линкеру, при этом второе нагрузочное вещество, выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов из табл. 21. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции  $\text{XTEN}$ -кросс-линкер-нагрузочное вещество с первым и вторым нагрузочными веществами, одно второе нагрузочное вещество присоединено к N-концу полипептида  $\text{XTEN}$  через второй кросс-линкер, присоединенный посредством реакции алкинового реактанта и азидного реактанта, выбранных из множества, состоящего из реагентов из табл. 15. В некоторых ва-

риантах композиции ХТЕН-кросс-линкер-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле VII



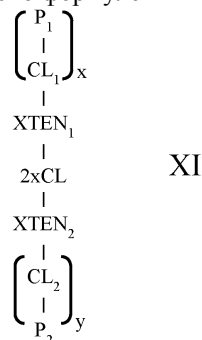
где независимо в случае каждого появления  $P_1$  - нагрузочное вещество, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21;  $CL_1$  - кросс-линкер;  $x$  равно целому числу от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1, и полипептид ХТЕН является последовательностью, обладающей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающее 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы VII  $CL_1$  является кросс-линкером, выбранным из табл. 13. В одном варианте реализации конъюгата формулы VII каждый кросс-линкер связан с серой цистеина полипептида ХТЕН. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VII каждый кросс-линкер связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида ХТЕН. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VII  $x$  равно 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой полипептида ХТЕН. В одном варианте осуществления этот конъюгат формулы VII выбирается из группы, состоящей из конъюгатов, отраженных в табл. 21. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VII  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. Для специалиста в этой области знаний понятно, что композиции вышеуказанных осуществлений включают нагрузочное вещество, присоединенное к ХТЕН-кросс-линкеру с использованием определенных компонентов, представляющих продукты реакции реагирующих веществ и поэтому отличающихся от точной композиции реактантов. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы VII, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул ХТЕН препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей. В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям первого и второго полипептидов ХТЕН, конъюгационно связанных друг с другом. В некоторых вариантах осуществления конъюгационная композиция включает первый и второй полипептиды ХТЕН, при этом полипептиды ХТЕН являются одинаковыми или разными и каждый из них независимо обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 3, и при этом первый и второй полипептиды ХТЕН конъюгационно присоединены друг к другу через N-концы первого и второго полипептидов ХТЕН кросс-линкером, образованным в реакции алкинового реактанта и азидного реактанта, выбранных из группы, состоящей из реагентов табл. 15, что приводит к образованию димерного ХТЕН-конъюгата. В одном варианте осуществления данной димерной ХТЕН-композиции по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул каждого первого полипептида ХТЕН имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул любого второго полипептида ХТЕН имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления данного димерного ХТЕН-конъюгата первый полипептид ХТЕН обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, состоящих из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3, а второй полипептид ХТЕН обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, состоящих из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3. В другом варианте осуществления данного димерного ХТЕН-конъюгата первый и второй полипептиды ХТЕН являются одинаковыми и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по

меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 3. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата первый и второй полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, состоящих из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата каждый из первого и второго полипептидов XTEN содержит один или большее количество остатков цистеина и дополнительно включают первый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина первого полипептида XTEN, а второй кросс-линкер присоединен к каждому остатку цистеина второго полипептида XTEN, при этом первый и второй кросс-линкеры независимо выбраны из набора, состоящего из кросс-линкеров, отраженных в табл. 13. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата любой из первого и второго полипептидов XTEN содержат один или большее количество остатков лизина и дополнительно включают первый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку лизина первого и второго XTEN-конъюгатов, при этом кросс-линкеры выбираются из набора, состоящего из кросс-линкеров, отраженных в табл. 13. В другом варианте реализации димерных полипептидов XTEN, присоединенных к кросс-линкерам, данный конъюгат дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы, и дополнительно включает одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В вышеуказанном осуществлении первое нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, а второе нагрузочное вещество с одноатомным остатком является нагрузочным веществом, отличным от первого нагрузочного вещества, и может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21. В некоторых вариантах композиции димерных остатков XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле X



где независимо в случае каждого появления  $P_{R1}$  - одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, в котором этот остаток выбирается из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $P_{R2}$  - одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, в котором этот остаток выбирается из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $CL_1$  - кросс-линкер;  $x$  - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1;  $CL_2$  - кросс-линкер, отличный от  $CL_1$ ;  $y$  - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1 с ограничением  $x+y \geq 2$ ;  $2xCL$  - альтернативный двухвалентный кросс-линкер или продукт реакции первого и второго реагентов клик-химии, выбранных в табл. 15;  $XTEN_1$  - полипептид, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3, и  $XTEN_2$  - полипептид, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере

мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы X  $CL_1$  и  $CL_2$  каждый выбирается из группы кросс-линкеров, отраженных в табл. 13. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X  $x$  равно 1, а  $CL_1$  связан с N-концевой аминогруппой полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата формулы X  $CL_2$  является продуктом реакции первого азидного и второго алкинового реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X каждый  $CL_1$  связан с серой цистеина полипептида XTEN<sub>1</sub> а каждый  $CL_2$  связан с серой цистеина полипептида XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X каждый  $CL_1$  связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида XTEN<sub>1</sub>, а каждый  $CL_2$  связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X каждый  $CL_1$  связан с серой цистеина полипептида XTEN<sub>1</sub>, а каждый  $CL_2$  связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X полипептиды XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются идентичными. В другом варианте реализации конъюгата формулы X полипептиды XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются различными. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы X, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей. В другом варианте осуществления димерного полипептида XTEN, присоединенного к кросс-линкерам, данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом первое нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, и дополнительно включает второе нагрузочное вещество, отличающееся от первого нагрузочного вещества тем, что второе нагрузочное вещество присоединено к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом второе нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21. В другом варианте осуществления димерного полипептида XTEN, присоединенного к кросс-линкерам, данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом первое нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нацеленных функциональных частей, отраженных в табл. 18 или 21, и дополнительно включает второе нагрузочное вещество, отличающееся от первого нагрузочного вещества тем, что второе нагрузочное вещество присоединено к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом второе нагрузочное вещество выбирается из группы токсинов, отраженных в табл. 18 или 21. В другом осуществлении димерного полипептида XTEN, присоединенного к кросс-линкерам и первому и второму нагрузочным веществам, первый полипептид XTEN является сегментом Seg 176, отраженным в табл. 3, а второй полипептид XTEN выбирается из группы, состоящей из Seg 176 и Seg 177, отраженных в табл. 3. В некоторых вариантах композиции димерных полипептидов XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XI

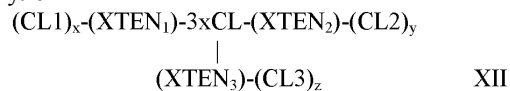


где независимо в случае каждого появления  $P_1$  - первое нагрузочное вещество, выбранное из группы нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21;  $P_2$  - второе нагрузочное вещество, выбранное из группы нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21 и отличающееся от  $P_1$ ;  $CL_1$  - кросс-линкер;  $x$  - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равно 9, или равно 3, или равно 2, или равно 1;  $CL_2$  - кросс-линкер, отличный от  $CL_1$ ;  $y$  - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равно 9, или равно 3, или равно 2, или равно 1 с ограничением  $x + y > 2$ ;  $2xCL$  - альтернативный двухвалентный кросс-линкер или продукт реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных в табл. 15; XTEN<sub>1</sub> - первый в основном гомогенный полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей

мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3, и XTEN<sub>2</sub> - второй в основном гомогенный полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата формулы XI CL<sub>1</sub> и CL<sub>2</sub> каждый выбирается из группы кросс-линкеров, отраженных в табл. 13. В другом варианте реализации конъюгата формулы XI x равно 1, а CL<sub>1</sub> связан с N-концевой аминогруппой полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI, CL<sub>1</sub> является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI CL<sub>2</sub> является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI каждый CL<sub>1</sub> связан с серой цистеина полипептида XTEN<sub>1</sub>, а каждый CL<sub>2</sub> связан с серой цистеина полипептида XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI каждый CL<sub>1</sub> связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида XTEN<sub>1</sub>, а каждый CL<sub>2</sub> связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI каждый CL<sub>1</sub> связан с серой цистеина полипептида XTEN<sub>1</sub>, а каждый CL<sub>2</sub> связан с эpsilon-аминогруппой лизина полипептида XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI полипептиды XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются идентичными. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI полипептиды XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются различными. В одном варианте осуществления этот конъюгат формулы XI выбирается из группы, состоящей из конъюгатов, отраженных в табл. 21. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы XI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% соответствующих молекул XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей.

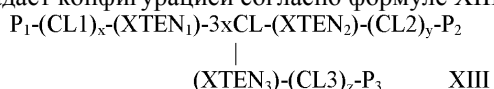
В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям первого, второго и третьего полипептида XTEN, конъюгационно связанных друг с другом с получением трехмерных конъюгационных композиций. В некоторых вариантах осуществления конъюгационные композиции включают первый, второй и третий полипептиды XTEN, при этом полипептиды XTEN могут быть одинаковыми или могут быть разными и при этом первый, второй и третий полипептиды XTEN присоединены друг к другу через N-концы с использованием трехвалентного кросс-линкера, выбранного из набора, состоящего из трехвалентных линкеров, отраженных в табл. 13 или 14. В одном варианте осуществления данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными или разными, и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 или 3. В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными или разными и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул любого первого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей, и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул каждого второго полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей, и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул любого третьего полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей. В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата трехвалентный кросс-линкер выбирается из группы, состоящей из трис-(2-малеинимидоэтил)амин (TMEA) и амин-реакционноспособного трис-(сукцинимидил-аминотриацетата) (TSAT). В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными, и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3. В другом варианте реализации данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными, и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по

меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3, а третий полипептид XTEN отличается от первого и второго полипептидов XTEN и обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3. В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата каждый полипептид XTEN содержит, по меньшей мере, первый остаток цистеина. и этот конъюгат дополнительно включает первый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина первого полипептида XTEN, второй кросс-линкер присоединен к каждому остатку цистеина второго полипептида XTEN, и третий кросс-линкер присоединен к каждому остатку цистеина третьего полипептида XTEN, данный кросс-линкер выбран из набора, состоящего из кросс-линкеров, отраженных в табл. 13. В некоторых вариантах данного тримерного конъюгата эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XII

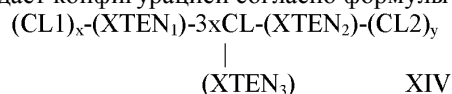


где независимо в случае каждого появления  $3xCL$  - первый трехвалентный кросс-линкер;  $CL_1$  - первый кросс-линкер, присоединенный к полипептиду  $XTEN_1$ ;  $CL_2$  - второй кросс-линкер, присоединенный к  $XTEN_2$ ;  $CL_3$  - третий кросс-линкер, присоединенный к полипептиду  $XTEN_3$ ;  $x$  - целое число от 1 до около 10;  $y$  - целое число от 1 до около 10;  $z$  - целое число от 1 до около 10 с ограничением  $x + y + z \geq 3$ ;  $XTEN_1$  - первый полипептид XTEN;  $XTEN_2$  - второй полипептид XTEN и  $XTEN_3$  - третий полипептид XTEN. В другом варианте осуществления тримерных конъюгатов данный конъюгат дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы, и одноатомный остаток третьего нагрузочного вещества, присоединенного к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте осуществления тримерной конъюгационной композиции данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21; второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества, и третье нагрузочное вещество, присоединенное к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого или второго нагрузочного вещества. В одном варианте реализации конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в табл. 17-19 и 21, а второе и третье нагрузочные вещества являются лекарственным веществом, которое может быть таким же или отличным, и при этом лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из лекарственных веществ, отраженных в табл. 11, 18 и 21. В одном варианте осуществления конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество, в котором первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, а второе и третье нагрузочное вещество является лекарственным веществом, нацеленным компонентом выбирается из группы, состоящей из LHRH, фолата и лекарственного вещества, выбранных из группы, состоящей из доксорубина, паклитаксела, ауристатина, монометилауристатина E (ММАЕ), монометилауристатина F, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В одном варианте осуществления конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, а второе и третье нагрузочное вещество является лекарственным веществом, нацеленным компонентом и компонентом лекарственного вещества, соответствующие какому-либо из конъюгатов 1-290, отраженных в табл. 21. В другом варианте осуществления конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество, в котором первое нагрузочное вещество яв-

ляется нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, а второе и третье нагрузочное вещество является лекарственным веществом, данный конъюгат несет полипептид XTEN, нацеленный компонент и компонент лекарственного вещества, соответствующие конъюгату 71 из табл. 21. В другом варианте конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XIII

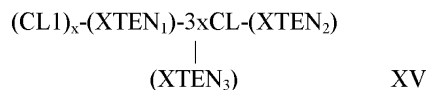


где независимо в случае каждого появления 3xCL - трехвалентный кросс-линкер, выбранный из группы трехвалентных кросс-линкеров, отраженных в табл. 13 и 14; P<sub>1</sub> является присоединенным к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN и выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21; P<sub>2</sub> - второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN и выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом это нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества; и P<sub>3</sub> - третье нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру третьего полипептида XTEN и выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом это нагрузочное вещество такое же или отличается от первого или второго нагрузочного вещества; CL<sub>1</sub> - первый кросс-линкер; x - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1; CL<sub>2</sub> - второй кросс-линкер; y - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1; z - целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1 с ограничением x + y + z ≥ 3; XTEN<sub>1</sub> - первый полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3; XTEN<sub>2</sub> - второй полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3; и XTEN<sub>3</sub> - третий полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3, при этом полипептиды XTEN<sub>1</sub>, XTEN<sub>2</sub>, и XTEN<sub>3</sub> являются одинаковыми или разными XTEN-последовательностями. В другом варианте осуществления данный конъюгат формулы XIII дополнительно включает первое нагрузочное вещество, в котором нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в табл. 17-19 и 21, а, по меньшей мере, любое другое из нагрузочных веществ являются лекарственным веществом, при этом лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из лекарственных веществ, отраженных в табл. 11, 19 и 21. В одном варианте вышеуказанной реализации данная нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из LHRH или фолата и лекарственного вещества, выбранных из: доксорубина, паклитакселя, ауристатины, монотилауристатины Е (ММАЕ), монотилауристатины F, майтанзина, доластатины, калихеамицины, алкалоида барвинка, камптотецины, митомицины С, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицины. В другом варианте композиции тримерного XTEN-конъюгата, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XIV



где независимо в случае каждого появления: 3xCL - трехвалентный кросс-линкер; CL<sub>1</sub> - первый кросс-линкер, присоединенный к полипептиду XTEN<sub>1</sub>; CL<sub>2</sub> - второй кросс-линкер, присоединенный к полипептиду XTEN<sub>2</sub>; x - целое число от 1 до около 10; y - целое число от 1 до около 10 с ограничением x + y ≥ 2; XTEN<sub>1</sub> - первый полипептид XTEN; XTEN<sub>2</sub> - второй полипептид XTEN и XTEN<sub>3</sub> - третий полипептид XTEN, при этом XTEN выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в табл. 2. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции тримерных полипептидов

XTEN формулы XVI данная композиция дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенный к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; и одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенный к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции тримерных полипептидов XTEN формулы XVI данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21; и второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества. В другом варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в табл. 17-19 и 21, а второе нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбранным из группы, состоящей из лекарственных веществ, отображенных в табл. 6, 18 и 21. В другом варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, выбираемой из группы, состоящей из LHRH, фолата и второго нагрузочного вещества, которое является лекарственным веществом, выбранным из группы состоящей из доксорубина, паклитакселя, ауристатина, монотилауристатина E (ММАЕ), монотилауристатина F, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина С, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В одном варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбранным из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11 и белков из табл. 12, а второе нагрузочное вещество является отличным от первого нагрузочного вещества и выбирается из группы нацеленных компонентов, отображенных в табл. 11, и белков в табл. 12, а второе нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбранным из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11 и белков из табл. 12. В другом варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество являются идентичными и выбираются из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11 и белков из табл. 12. В другом варианте конъюгационная композиция тримерного XTEN-конъюгата, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XV

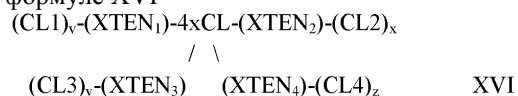


где независимо в случае каждого появления  $3xCL$  - трехвалентный кросс-линкер, связывающий полипептиды  $XTEN_1$ ,  $XTEN_2$ ,  $XTEN_3$ ;  $CL1$  - первый кросс-линкер, присоединенный к полипептиду  $XTEN_1$ ;  $x$  - целое число от 1 до около 10;  $XTEN_1$  - первый полипептид XTEN, при этом XTEN выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в табл. 3;  $XTEN_2$  - второй полипептид XTEN, при этом XTEN выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в табл. 2; и  $XTEN_3$  - третий полипептид XTEN, при этом XTEN выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в табл. 2. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции тримерного полипептида XTEN в конфигурации в виде формулы XVII данная композиция дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции тримерного полипептида XTEN в конфигурации в виде формулы XVII данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21.

В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям первого, второго, третьего и четвертого полипептидов XTEN, конъюгационно связанных друг с другом с получением тетрамерных конъюгационных композиций. В некоторых вариантах осуществления конъюгационные композиции включают первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN, при этом полипептиды XTEN выбираются из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в табл. 3, при этом полипептиды XTEN могут быть одинаковыми или могут быть разными, и при этом первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN присоединены друг к другу через N-концы с использованием четырехвалентного кросс-линкера, при этом четырехвалентный кросс-линкер является четырехвалентным малеинимидным кластером. В одном варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN являются идентичными или разными, и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по



меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 или 3. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN являются идентичными или разными и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул каждого первого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул каждого второго полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул каждого третьего полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94 или 95% отдельных молекул каждого четвертого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый и второй полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99 или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3, а третий и четвертый полипептиды XTEN являются одинаковыми, но отличными от первого и второго полипептида XTEN, и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в табл. 3. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата каждый полипептид XTEN содержит по меньшей мере первый остаток цистеина, и этот конъюгат дополнительно включает первый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина первого полипептида XTEN, второй кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина второго полипептида XTEN, третий кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина третьего полипептида XTEN, и четвертый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина четвертого полипептида XTEN, при этом каждый кросс-линкер выбран из набора, состоящего из кросс-линкеров, отраженных в табл. 13. В некоторых вариантах композиции тетрамерных конъюгационных композиций данная композиция обладает конфигурацией согласно формуле XVI



где независимо в случае каждого появления  $4xCL$  - четырехвалентный кросс-линкер;  $CL1$  - первый кросс-линкер, присоединенный к полипептиду  $XTEN_1$ ;  $CL2$  - второй кросс-линкер, присоединенный к  $XTEN_2$ ;  $CL3$  - третий кросс-линкер, присоединенный к полипептиду  $XTEN_3$ ;  $CL4$  - четвертый кросс-линкер, присоединенный к полипептиду  $XTEN_4$ ;  $v$  - целое число от 1 до около 10;  $x$  - целое число от 1 до около 10;  $y$  - целое число от 1 до около 10;  $z$  - целое число от 1 до около 10 с ограничением  $x + y + z \geq 4$ ;  $XTEN_1$  - первый полипептид XTEN;  $XTEN_2$  - второй полипептид XTEN;  $XTEN_3$  - третий полипептид XTEN и  $XTEN_4$  - четвертый полипептид XTEN. В другом варианте осуществления тетрамерных конъюгационных композиций данная композиция дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; одноатомный остаток третьего нагрузочного вещества, присоединенного к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы и одноатомный остаток четвертого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому четвертому кросс-линкеру четвертого полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции данная композиция дополнительно

включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида ХТЕН, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21; второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида ХТЕН, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества; третье нагрузочное вещество, присоединенное к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида ХТЕН, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого или второго нагрузочного вещества и четвертое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому четвертому кросс-линкеру четвертого полипептида ХТЕН, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого, второго или третьего нагрузочного вещества. В другом варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции ХТЕН-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в табл. 17-19 и 21, и по меньшей мере одно из второго, третьего и четвертого нагрузочных веществ является лекарственным веществом, при этом это лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из веществ, отображенных в табл. 11, 18 и 21. В одном варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции ХТЕН-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из LHRH, фолата и по меньшей мере одного из второго, третьего и четвертого нагрузочного вещества, которое является лекарственным веществом, выбранным из группы состоящей из доксорубина, паклитакселя, ауристатина, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомicina C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В другом варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции ХТЕН-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в табл. 17-19 и 21, и по меньшей мере одно из второго, третьего и четвертого нагрузочных веществ является лекарственным веществом, при этом это лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из веществ, отображенных в табл. 11, 18 и 21, и при этом полипептид ХТЕН, нацеленный компонент и компонент лекарственного вещества соответствуют какому-либо из конъюгатов 1-290, отраженных в табл. 21.

В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям, содержащим мультимерные ХТЕН-молекулы с разветвленным видом конфигурации, при этом растворимость такой композиции снижена. В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, включающая раствор, который содержит мультимерные ХТЕН-молекулы, несущие по меньшей мере три связанных вместе ХТЕН-фрагмента в разветвленном виде (например, в виде тримера), при этом вязкость этого раствора снижена до по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сП в растворе, содержащем  $\geq 100$ , 130 или 150 мг/мл тримерного полипептида ХТЕН по сравнению с раствором, содержащим  $\geq 100$ , 130 или 150 мг/мл соответствующего линейного полипептида ХТЕН равной молярной концентрации. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, включающая раствор, который содержит мультимерные ХТЕН-молекулы, несущие по меньшей мере четыре связанных вместе ХТЕН-фрагмента в разветвленном виде (например, в виде тетрамера), при этом композиция имеет вязкость меньше чем у раствора, содержащего соответствующий линейный полипептид ХТЕН, обладающий таким же количеством аминокислот и такой же молярной концентрацией, при этом вязкость этого раствора снижена до по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сП в растворе, содержащем  $\geq 100$ , 130 или 150 мг/мл тримерного полипептида ХТЕН по сравнению с раствором, содержащим  $\geq 100$ , 130 или 150 мг/мл соответствующего линейного полипептида ХТЕН равной молярной концентрации. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, включающая раствор, который содержит мультимерные ХТЕН-молекулы, несущие по меньшей мере пять связанных вместе ХТЕН-фрагментов в разветвленном виде (например, в виде пентамера), при этом композиция имеет вязкость меньше чем у раствора, содержащего соответствующий линейный полипептид ХТЕН, обладающий таким же количеством аминокислот и такой же молярной концентрацией, при этом вязкость этого раствора снижена до по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сП в растворе, содержащем  $\geq 100$ , 130 или 150 мг/мл тримерного полипептида ХТЕН, по сравнению с раствором, содержащим  $\geq 100$ , 130 или 150 мг/мл соответствующего линейного полипептида ХТЕН равной молярной концентрации. В вышеуказанных осуществлениях этого параграфа отдельная ХТЕН-молекула мультимерных конфигураций выбирается из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3.

В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются композиции полипептида, обладающего по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около

95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 52. В другом варианте реализации данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат какого-либо из осуществлений конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, описанного в данном тексте, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления вышеуказанная фармацевтическая композиция применяется для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в табл. 16. В другом варианте осуществления вышеуказанная фармацевтическая композиция применяется для использования в фармацевтическом режиме лечения пациента, упомянутый режим включает назначение этой фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления вышеуказанный фармацевтический режим дополнительно содержит этап определения количества фармацевтической композиции, необходимого для достижения благоприятного эффекта у пациента в болезненном состоянии, выбранном из болезненных групп состояний, отраженных в табл. 16. В другом варианте осуществления вышеуказанный фармацевтический режим, используемый для лечения пациента, включает назначение пациенту фармацевтической композиции двух или более эффективных доз, при этом результаты такого назначения по меньшей мере на 10, или 20, или 30, или 40, или 50, или 60 или 70 или 80 или 90% повышают улучшение по меньшей мере одного, двух или трех параметров, связанных с болезненным состоянием у не лечившегося пациента.

В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается конъюгат какого-либо из осуществлений конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, описанного в данном тексте для применения при получении лекарственного препарата для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в табл. 16. В некоторых реализациях в данном изобретении предлагаются способы выбора комбинации нагрузочных веществ, присоединенных к полипептиду XTEN как лечебные агенты, этот метод включает использование библиотеки полипептидов XTEN, содержащую множество последовательностей XTEN, в которой каждая из упомянутых XTEN-последовательностей присоединена, по меньшей мере, к первому нагрузочному веществу и, по меньшей мере, к второму нагрузочному веществу, которое отличается от первого нагрузочного вещества; из упомянутой библиотеки выбирается XTEN-последовательность как лечебный агент, если он вызывает улучшение параметров *in vitro* или *in vivo* по сравнению с такими комбинациями: (1) последовательность XTEN присоединена только к первому нагрузочному веществу; и (2) последовательность XTEN присоединена только к второму нагрузочному веществу. В другом варианте осуществления данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество являются терапевтически эффективными для облегчения общего заболевания (например, заболевания, против которого нацелены оба первое и второе нагрузочные вещества). В одном варианте осуществления данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество являются терапевтически эффективными для лечения разных симптомов общего заболевания. В одном варианте осуществления данного способа общее заболевание выбирается из таких: рак, противораковая поддерживающая терапия, сердечно-сосудистое заболевание, заболевание центральной нервной системы, эндокринное заболевание, желудочно-кишечное заболевание, заболевание мочеполовой системы, заболевание системы крови, ВИЧ-инфекция, гормональное заболевание, воспаление, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, заболевание обмена веществ, заболевание костно-мышечной системы, нефрологические расстройства, офтальмологические заболевания, боли и респираторные заболевания. В одном варианте реализации данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество проявляют свой терапевтический эффект через обычный биологический механизм. В одном варианте данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество является разными лекарственными веществами и выбираются из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11, 18 и 21. В одном варианте данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество является разными биологически активными белками и выбираются из группы, состоящей из белков из табл. 12, 18 и 21. В одном варианте данного способа первое нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбираемым из группы, состоящей из лекарственных веществ, отображенных в табл. 11, 18 и 21, а второе нагрузочное вещество является биологически активным белком, выбранным из группы, состоящей из белков, отображенных в табл. 12, 18 и 21.

В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается изолированный полипептид, содержащий расширенный рекомбинантный полипептид, который присоединен к маркеру аффинной очистки через сайт протеолитического расщепления, имеющий последовательность, выбранную из SASRSA или SASXSA, где X является R или K. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается изолированный полипептид, содержащий полипептид, включающий XTEN, который присоединен своим N-концом к первому маркеру аффинной очистки через сайт протеолитического расщепления, имеющий последовательность, выбранную из SASRSA или SASXSA, где X является R или K, а C-концом присоединен к второму маркеру аффинной очистки через сайт протеолитического расщепления, имеющий последовательность выбранную из SASRSA или SASXSA, где X является R или K.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения болезненного состояния пациента с помощью конъюгационной композиции XTEN-нагрузочное вещество. В одном варианте осуществ-

вления в данном изобретении предлагается способ лечения болезненного состояния субъекта, включающий назначение эффективного количества данного конъюгата какого-либо из осуществлений ХТЕН-нагрузочного вещества, описанных в данном тексте, нуждающемуся в нем пациенту. В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается способ лечения болезненного состояния пациента, включающий назначение эффективного количества данного конъюгата из набора конъюгатов, отраженных в табл. 21, нуждающемуся в нем пациенту. В вышеуказанных осуществлениях данного параграфа болезненное состояние, которое требует лечения, включает, помимо прочих, болезненные состояния, отраженные в табл. 13. В другом варианте реализации в данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат какого-либо из осуществлений конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество, описанных в данном тексте, и фармацевтически приемлемый носитель для применения в режиме лечения, данный режим включает назначение двух и более последовательных доз этой фармацевтической композиции. В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается использовать конъюгат какого-либо из осуществлений полипептида ХТЕН-нагрузочное вещество, описанных в данном тексте, для применения при получении лекарственного препарата для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в табл. 16. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в табл. 16, которая включает эффективное количество конъюгата какого-либо из осуществлений полипептида ХТЕН-нагрузочное вещество, описанных в данном тексте. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, обладающая структурой, отображенной на фиг. 117.

Специально предусмотрено, что осуществления конъюгатов могут выражать одну или большее количество любых комбинаций свойств, раскрытых в данном тексте. Кроме того, какая-либо из композиций ХТЕН, раскрытых в данном тексте, могут быть использованы в любом из способов, раскрытых в данном изобретении.

#### **Включение посредством ссылки**

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были бы указаны конкретно и отдельно для включения посредством ссылки.

#### **Краткое описание графических материалов**

Характерные черты и преимущества изобретения могут быть дополнительно разъяснены ссылкой на последующее подробное описание и сопровождающие графические материалы, которые отражают иллюстративные осуществления изобретения.

Фиг. 1 показывает схему ХТЕН-молекулы, подходящей для конъюгации с нагрузочными веществами. Фиг. 1А показывает немодифицированную ХТЕН-молекулу. Фиг. 1В показывает цистеин-сконструированную ХТЕН-молекулу с внутренним цистеином и боковой тиоловой цепью; ниже - ХТЕН-молекулу с реакционноспособной N-концевой аминогруппой; ниже - ХТЕН-молекулу с N-концевым цистеином с тиоловой реакционноспособной группой. Фиг. 1С показывает цистеин-сконструированную ХТЕН-молекулу с многочисленными внутренними остатками цистеина. Фиг. 1D показывает две вариации цистеин-сконструированных ХТЕН-молекул с внутренним цистеином и боковой тиоловой цепью; и реакционноспособной N-концевой аминогруппой; внизу показано цистеин- и лизин-сконструированные ХТЕН-молекулы с внутренними остатками цистеина и лизина.

Фиг. 2 показывает реакцию конъюгации с использованием NHS-эфиров и их водорастворимых аналогов сульфо-NHS-эфиров), реагирующих с первичной аминогруппой с получением стабильного амидного продукта ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 3 показывает реакцию конъюгации с использованием тиоловых групп и N-малеинимида. Малеинимидная группа специфически реагирует с сульфгидрильными группами при pH реакционной смеси между pH 6,5 и 7,5, с образованием стабильной тиоэфирной связи, которая не вращается.

Фиг. 4 показывает реакцию конъюгации с использованием галогенацетиллов. Чаще всего используются галогенацетильные реагенты, содержащие йодацетильную группу, которая реагирует с сульфгидрильными группами при физиологическом значении pH. Реакция йодацетильной группы с сульфгидрильной проходит путем нуклеофильного замещения йода с образованием стабильной тиоэфирной связи в молекуле ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 5 показывает реакцию конъюгации с использованием пиридилдисульфидных соединений. Пиридилдисульфидные соединения реагируют с сульфгидрильными группами в широком диапазоне pH (оптимальное pH составляет 4-5) с образованием дисульфидных связей, соединяющих ХТЕН с нагрузочными веществами.

Фиг. 6 показывает реакцию конъюгации с использованием кросс-линкеров нулевой длины, в которой кросс-линкеры используются для непосредственного конъюгирования с карбоксильными функциональными группами одной молекулы (такой как нагрузочное вещество) с первичным амином другой молекулы (такой как ХТЕН).

Фиг. 7 показывает различные типы конъюгирования ХТЕН-предшественников, которые являются мультифункциональными (или многовалентными) веществами, включая дендримеры. Примеры, не огра-

ничающие варианты применения трифункциональных линкеров, представляют "Y-форму" сульфгидрильного реакционноспособного TMEA (трис-(2-малеинимидоэтил)амин) и амин-реакционноспособного TSAT (трис-(сукцинимидиламинотриацетата). Для мультивалентного образования может быть разработана любая комбинация реакционноспособных функциональных групп с использованием поддерживающего полимера, линейного (с образованием конфигурации "гребенка") или разветвленного (с образованием конфигурации "дендримера").

Фиг. 8 показывает реакцию конъюгации с использованием 1,3-диполярного циклоприсоединения алкинов с азидами Хьюстена с образованием 1,4-дизамещенных-1,2,3-триазолов, как показано на фигуре.

Фиг. 9 показывает реакцию конъюгации с использованием клик-химии на основе тиоеновых соединений, которая может проходить с помощью свободно-радикальной реакции, названной тиоеновой реакцией или анионной реакцией, названной присоединением тиолов по Михаэлю.

Фиг. 10 показывает реакцию конъюгации с использованием методов клик-химии на основе реакций между гидразидами и альдегидами, которые приводят к проиллюстрированному образованию гидразонной связи в молекуле XTEN-нагрузочное вещество.

Фиг. 11 показывает реакцию между C-концевым ацилазидом и первичной аминогруппой, приводящей к образованию амидной связи.

Фиг. 12 показывает реакцию конъюгации с использованием нативного химического лигирования (NCL), вовлекающего C-концевой тиоэфир как электрофильное соединение и N-концевой цистеин как нуклеофильное соединение. Результатом этой реакции является образование нативной амидной связи в сайте лигирования композиции XTEN-нагрузочное вещество.

Фиг. 13 показывает реакцию конъюгации с использованием метода лигирования экспрессированного белка (EPL). Метод EPL базируется на сплайсинге белков - процессе, в котором белок претерпевает внутримолекулярную перегруппировку, приводящую к выбрасыванию внутренней последовательности (интеина) и соединению латеральных последовательностей (экстеинов). В этом методе белок слияния претерпевает N-S-сдвиг, при котором боковая цепь первого цистеинового остатка части интерина белка-предшественника нуклеофильно атакует пептидную связь остатка, находящегося рядом в восходящем направлении цепи (такую как, например, концевой остаток полипептида XTEN) с образованием промежуточного линейного тиоэфира с последующей перегруппировкой с образованием амидной связи между XTEN-кросс-линкером и нагрузочным веществом.

Фиг. 14 показывает реакцию конъюгации с использованием бесследового лигирования Штаудингеру, подобное нативному химическому лигированию (NCL), приводящую к образованию в сайте лигирования нативной амидной связи.

Фиг. 15 показывает реакцию конъюгации с использованием ферментного лигирования. Трансглутаминаза является ферментом, который катализирует образование изопептидной связи между  $\gamma$ -карбоксамидной группой глутамина нагрузочного пептида или белка и  $\epsilon$ -аминогруппы лизина в лизин-содержащей молекуле XTEN (или N-концевой аминогруппы), при этом образуются внутри- и межмолекулярные перекрестные связи между молекулой XTEN и нагрузочным веществом.

Фиг. 16 показывает образованные ферментами композиции XTEN-нагрузочное вещество с использованием транспептидазного фермента сорта А из *Staphylococcus aureus* для катализования реакции расщепления последовательности распознавания коротких 5-аминокислот LPXTG между остатками треонина и глицина белка1, который впоследствии переносит ацильный фрагмент на нуклеофильное соединение N-концевой олигоглицин белка1. Путем функционализации белка2 включением олигоглицина проводится ферментативная конъюгация двух белков сайт-специфическим связыванием, которое приводит к получению желаемой композиции XTEN-нагрузочное вещество.

Фиг. 17 показывает различные сегменты предшественников XTEN-кросс-линкеров, которые используются как реагенты для связывания с нагрузочными веществами или другими реагирующими с XTEN веществами. Фиг. 17А предназначена для демонстрации того, что группа 1В представляет собой оставшуюся реакционноспособную группу предшественников, расположенных справа. Фиг. 17В показывает подобные реакционноспособные предшественники с множественными (слева) или единственной (справа) молекулами нагрузочного вещества А, конъюгированно связанными с полипептидом XTEN.

Фиг. 18 показывает примерные переставляемые сегменты предшественников XTEN-кросс-линкеров с двумя реакционноспособными группами в кросс-линкерных молекулах или реакционноспособными группами внедренных аминокислот, которые используются как реагенты для связывания с нагрузочными веществами или другими реагирующими с XTEN веществами. Обозначения 1В и 2В представляют реакционноспособные группы, которые будут в других фигурах вступать в реакции с реакционноспособными с такими же номерами 1 с 1 и 2 с 2 и т.д.

Фиг. 19 предназначена для демонстрации примеров разных реагентов и перечня конфигураций, показанных в графических материалах. Фиг. 19А показывает разные формы предшественников реакционноспособных XTEN-сегментов, каждый с другой реакционноспособной группой на N-конце. Фиг. 19В показывает разные кросс-линкеры с 2, 3 или 4 реакционноспособными группами. В первом случае двухвалентный кросс-линкер является гетерофункциональным линкером, который реагирует с двумя разными

ми типами реакционноспособных групп, представленных под номерами "2" и "1". В случае трехвалентных и четырехвалентных кросс-линкеров каждый реагирует только с одним типом реакционноспособной группы, представленной под номером "1". Фиг. 19С иллюстрирует перечень продуктов реакции двух предшественников ХТЕН-сегментов. В верхней версии 1А прореагировал с 1В для образования димерной молекулы ХТЕН, связанной по N-концам, с остатком кросс-линкера, указанного как  $1A_R-1B_R$ , в то время как нижняя версия также является димерной молекулой ХТЕН, связанной по N-концам, с остатком кросс-линкера, указанного как  $2A_R-2B_R$ .

Фиг. 20 иллюстрирует получение разных сегментов ХТЕН-предшественников. Фиг. 20А показывает этапы создания ХТЕН-полипептида с последующей реакцией его N-конца с кросс-линкером с 2В-1А реакционноспособными группами 1А реагирует с N-концом 1В (например,  $\alpha$ -аминокислотой) для получения ХТЕН-предшественника 2 с реакционноспособной группой 2В. Фиг. 20В показывает последовательное добавление двух кросс-линкеров с реакционноспособными группами 2А к реакционноспособным группам 2В полипептидов ХТЕН, приводящее к получению ХТЕН-предшественника 4, который затем реагирует с кросс-линкером на N-конце между реакционноспособной группой 1В и группой 1А кросс-линкера, приводящее к получению ХТЕН-предшественника 5 с реакционноспособными группами 4В и 3В. В таком случае ХТЕН-предшественники 5 служат потом в качестве реагентов с двумя различными нагрузочными веществами или полипептидом ХТЕН.

Фиг. 21 иллюстрирует примеры многомерных конъюгатов. Фиг. 21А иллюстрирует каким образом три ХТЕН-молекулы с конъюгированным нагрузочным веществом А могут быть присоединены к трехмерному кросс-линкеру, что в результате приводит к образованию трехмерного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество с тремя нагрузочными веществами А. Фиг. 21В иллюстрирует каким образом три молекулы полипептида с нагрузочным веществом А могут быть присоединены к трехмерному кросс-линкеру, что в результате приводит к образованию трехмерного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество с тремя полипептидами с нагрузочными веществами А.

Фиг. 22 иллюстрирует примеры многовалентных ХТЕН-конъюгатов, которые происходят из ХТЕН-предшественников с одним цистеином. Аминогруппа ХТЕН-предшественника действует как реакционноспособная группа 2В, а тиоловая группа - как реакционноспособная группа 1В. ХТЕН-предшественник с помощью кросс-линкера, который может реагировать с группой 1В, может участвовать в прекрестном связывании. Валентность кросс-линкера ограничивает валентность получаемого промежуточного соединения. Это промежуточное соединение с кросс-линкером может реагировать с нагрузочным веществом, несущим реакционноспособную группу 2А, которая может реагировать с аминогруппой с образованием конъюгационной связи  $2A-B_R$ . Фиг. 22А представляет ХТЕН-предшественник с одной тиоловой группой. Фиг. 22В представляет двухвалентный конъюгат. Фиг. 22С представляет трехвалентный конъюгат. Фиг. 22D представляет тетрамерный конъюгат.

Фиг. 23 иллюстрирует примеры многовалентных ХТЕН-конъюгатов, которые происходят из ХТЕН-предшественников с одним цистеином. Аминогруппа ХТЕН-предшественника действует как реакционноспособная группа 1В, а тиоловая группа как реакционноспособная группа 2В. ХТЕН-предшественник с помощью кросс-линкера, который может реагировать с группой 1В, может участвовать в прекрестном связывании. Валентность кросс-линкера ограничивает валентность получаемого промежуточного соединения. Это промежуточное соединение с кросс-линкером может реагировать с нагрузочным веществом, несущим реакционноспособную группу 2А, которая может реагировать с тиоловой группой с образованием конъюгационной связи  $2A-B_R$ . Фиг. 23А иллюстрирует тиоловую группу, расположенную возле С-конца полипептида ХТЕН. В результате нагрузочное вещество располагается в конечном тримерном конъюгате дистально. Фиг. 23В иллюстрирует тиоловую группу, расположенную возле N-конца полипептида ХТЕН. В результате нагрузочное вещество располагается в конечном тримерном конъюгате проксимально, приводя к увеличению нагрузочного вещества, закрываемого ХТЕН-полипептидом.

Фиг. 24 иллюстрирует пример получения конфигурации "гребенка". Фиг. 24А представляет предшественник молекулы ХТЕН-нагрузочное вещество, включающий линкерную реакционноспособную группу 1А. Нагрузочное вещество может быть рекомбинантно соединено с полипептидом ХТЕН или соединено при конъюгировании. Фиг. 24В иллюстрирует ХТЕН-предшественник с гребенкоподобными кросс-линкерами. Это может быть молекула ХТЕН, которая несет множественные реакционноспособные группы В. Фиг. 24С показывает конечный продукт конфигурации "гребенка" с пятью нагрузочными веществами А. Валентность ограничивается количеством реакционноспособных групп гребенкоподобного предшественника.

Фиг. 25 иллюстрирует разные конфигурации биспецифических конъюгатов с двумя нагрузочными веществами. Фиг. 25А иллюстрирует конфигурации с одной молекулой, каждого из двух нагрузочных веществ, тогда как фиг. 25В иллюстрирует разные конфигурации с множественными копиями одного или обоих нагрузочных веществ.

Фиг. 26 иллюстрирует разные примеры конъюгатов с высокой валентностью. Сайты конъюгации нагрузочных веществ могут быть сгруппированы (фиг. 26А) или распределены (фиг. 26В).

Фиг. 27 иллюстрирует получение биспецифических конъюгатов из ХТЕН-предшественников, несущих обе аминокислотные и тиоловые группы, в которых могут использоваться много химических веществ, для

того, чтобы можно было варьировать присоединение нагрузочных веществ. Каждый может создавать линкер-конъюгат как предшественник. Фиг. 27А показывает создание одного ХТЕН-предшественника, к которому присоединены два разных нагрузочных вещества. Фиг. 27В показывает сегментарный подход, начинающийся из двух молекул ХТЕН-предшественников. Этот подход позволяет за один подход присоединить оба нагрузочных вещества к полипептиду ХТЕН с использованием одного типа линкерной химической реакции. В этом случае на фигуре показан тиол как группа, к которой присоединяются нагрузочные вещества, после чего N-конец каждого сегмента модифицируется кросс-линкером для обеспечения возможности конъюгации сегментов голова-к-голове, которая приводит к получению димерного биспецифического конъюгированного конечного продукта.

Фиг. 28 показывает примеры мновалентных конъюгатов, объединяющих антитело, полипептид ХТЕН и нагрузочное вещество. Такие конструкции могут обладать разными валентностями и представлять много преимуществ, в которых полипептид ХТЕН может нести расщепляемый линкер. Полипептид ХТЕН может обеспечивать растворимость такой композиции и он может позволить регулировать ввод лекарственных веществ посредством IgG и для упрощения производства ХТЕН может быть предварительно связан с лекарственным веществом.

Фиг. 28А иллюстрирует две молекулы ХТЕН, присоединенные к IgG по Cys-остаткам в шарнирной области. Фиг. 28В иллюстрирует четыре молекулы ХТЕН, присоединенные к IgG с использованием цистеина в шарнирной области. Фиг. 28С иллюстрирует полипептид ХТЕН, присоединенный за пределами шарнирной области. Что может быть получено вставкой Cys для контроля сайта конъюгации или случайной конъюгацией с боковыми цепями лизина.

Фиг. 29 показывает примеры конструкций конъюгатов, объединяющих антитело, полипептид ХТЕН и нагрузочное вещество. Такое антитело может обладать одной или многими реакционноспособными группами 1В. Молекула ХТЕН может быть конъюгирована с одним или многими нагрузочными веществами А. Кроме того, молекула ХТЕН может нести реакционноспособную группу 1А, которая преимущественно реагирует с реакционноспособной группой 1В антитела. Расположение реакционноспособных групп 1В в антителе контролируется количеством и расположением молекул ХТЕН, которые присоединяются к этому антителу, что приводит к образованию конечного продукта.

Фиг. 30 показывает примеры конъюгатов, объединяющих компонент мишени, полипептид ХТЕН и нагрузочное вещество. Компоненты мишени могут быть пептидами, пептоидами или лигандами рецепторов. Фиг. 30А показывает конъюгат 1x(1x3). Фиг. 30В показывает конъюгат 1x2(1x3). Фиг. 30С показывает конъюгат 3x1(1x3).

Фиг. 31 показывает примеры конъюгатов, объединяющих множественные разные компоненты мишени, полипептид ХТЕН и нагрузочное вещество. Компоненты мишени могут быть пептидами, пептоидами, лигандами рецепторов.

Фиг. 32 показывает примеры конъюгатов, объединяющих компонент мишени, полипептид ХТЕН и множественные нагрузочные вещества.

Фиг. 33 показывает примеры комбинированных ХТЕН-конъюгатов. Нагрузочные вещества А, В, С и D могут нести реакционноспособную группу 2А, которая реагирует с реакционноспособной группой 2В ХТЕН-предшественника. На следующем этапе нагрузочные вещества Е и F несут реакционноспособную группу 1А, которая реагирует с реакционноспособной группой 1В молекулы ХТЕН, что приводит к получению библиотеки разных комбинаций биспецифических конъюгатов. В этом случае реакционноспособные группы 1В и 2В являются соответственно тиоловыми и аминогруппами.

Фиг. 34 иллюстрирует пример создания комбинационной библиотеки ХТЕН-конъюгатов. Нагрузочные вещества А, В, С соединяются с молекулой ХТЕН, несущей реакционноспособную группу 1А, что приводит к получению одного набора сегментов ХТЕН-предшественников. Нагрузочные вещества Е, F и G соединяются с молекулой ХТЕН, несущей реакционноспособную группу 1В, что приводит к получению второго набора сегментов ХТЕН-предшественников. Эти сегменты подвергаются комбинационной конъюгации и после нее очищаются от реактантов. Это дает возможность получать комбинационные продукты, на которые могут непосредственно проводиться *in vitro* и *in vivo* испытания. В этом случае реакционноспособные группы 1А и 1В являются  $\alpha$ -аминогруппами молекулы ХТЕН с или без биспецифического кросс-линкера. В одном примере группа 1А является азидом, а группа 1В - алкином, или наоборот, в то время как нагрузочные вещества присоединяются к молекуле ХТЕН через тиоловые группы полипептида ХТЕН.

Фиг. 35 иллюстрирует пример создания комбинационной библиотеки ХТЕН-конъюгатов, в которой оптимизированно соотношение между двумя нагрузочными веществами. Каждый член библиотеки несет разное соотношение между нагрузочным веществом А и нагрузочным веществом Е.

Фиг. 36 иллюстрирует пример создания комбинационной библиотеки ХТЕН-конъюгатов, в которой создаются комбинации компонентов мишеней и нагрузочных веществ. Компоненты мишеней 1, 2 и 3 соединяются с молекулой ХТЕН, несущей реакционноспособную группу 1А. Нагрузочные вещества Е, F и G соединяются с молекулой ХТЕН, несущей реакционноспособную группу 1В. Эти сегменты подвергаются комбинационной конъюгации, обеспечивая возможность образования комбинационных продуктов, причем каждый элемент библиотеки включает компоненты мишеней и нагрузочные вещества. Все

XTEN-сегменты, несущие нагрузочные вещества и конъюгационные группы, могут быть очищены как комбинационные продукты, на которые могут непосредственно проводиться *in vitro* и *in vivo* испытания.

Фиг. 37 показывает пример XTEN-конъюгата, включающего нацеленные компоненты и нагрузочные вещества, которые оказывают избирательное действие на поверхность клетки-мишени, такой как раковая клетка. Специальная конструкция димерного XTEN-конъюгата содержит молекулы LHRH (рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона) и доксорубин. Этот конъюгат связывается с LHRH-рецептором, который сверхэкспрессируется во многих раковых клетках. Связывание рецептора приводит к интернализации комплекса с последующим протеолитическим расщеплением и внутриклеточным высвобождением доксорубина, который является токсичным для клетки.

Фиг. 38 представляет схематическую блок-схему характерных этапов сборки, синтеза и оценивания молекулы XTEN.

Фиг. 39 представляет схематическую блок-схему характерных этапов сборки конструкции полинуклеотида XTEN, кодирующего белок слияния. Отдельные олигонуклеотиды 501 ренатурируют в мотивы последовательностей 502, такие как мотив из 12 аминокислот ("12-мер"), которые лигируются с дополнительными мотивами последовательностей из библиотеки для получения пула, который охватывает требуемую длину XTEN 504, а также соединяется с меньшей концентрацией олигонуклеотидов, содержащих сайты рестрикции BbsI и KpnI 503. Результирующий пул продуктов лигирования проходит очистку гель-фильтрацией, при которой вырезается полоса с требуемой длиной XTEN, что приводит к изолированию XTEN-гена с стоп-последовательностью 505. XTEN-ген клонируют в спейсерном (лямбда) векторе. В этом случае вектор кодирует добавочную CBD-последовательность 506 и GFP-ген 508. Потом с помощью фермента BbsI/HindIII проводят расщепление для удаления последовательностей 507 и 508 и вставки стоп-кодона. Затем полученный продукт клонируют в расщепленном ферментом BsaI/HindIII векторе, что приводит к получению гена 500, кодирующего XTEN-последовательность.

Фиг. 40 представляет схематическую блок-схему характерных этапов гена, кодирующего XTEN-последовательность, ее экспрессию, конъюгацию с нагрузочным веществом и выделение в виде полипептида XTEN-нагрузочное вещество и его оценку в качестве вероятного препарата.

Фиг. 41 показывает обобщенные XTEN-полипептиды, в которых N- или C-концевые маркеры или N- и C-концевые последовательности оптимизированы для облегчения очистки с применением методов, показанных на фиг. 42.

Фиг. 42 показывает обобщенную схему очистки молекул XTEN, в этом иллюстративном осуществлении с двумя маркерами, для которых используется двухстадийная методика очистки для удаления первого маркера, потом второй маркер может быть использован для удаления укороченного XTEN-полипептида, полученного при ферментации, что в результате приводит к получению высокоочищенного целевого вещества XTEN.

Фиг. 43 показывает анализ в геле ПААГ с ДСН конструкций XTEN\_AE864 с сайтом CBD-TEV и XTEN\_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV, экспрессированным в клетках *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* и *E. coli* BL21 DE3 в культурах на встряхиваемых колбах, как описано в примере 10. Гелевые дорожки образцов с маркерами MM и экспрессированными белками из конструкций такие: 1) маркер MM; 2-5) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на *E. coli* BL21 DE3 экспрессировался гибридный белок XTEN\_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV; 6-9) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* экспрессировался гибридный белок XTEN\_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV; 10-13) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на *E. coli* BL21 DE3 экспрессировался гибридный белок CXTEN\_AE864 с сайтом CBD-TEV; 14-17) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* экспрессировался гибридный белок CXTEN\_AE864 с сайтом CBD-TEV. Пятна с полноразмерными белками проявились в пределах очерченного прямоугольника. Полосы с меньшей молекулярной массой являются белками клетки-хозяина.

Фиг. 44 показывает относительную флуоресценцию белка GFP конструкции XTEN\_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV, экспрессированной в клетках *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* и *E. coli* BL21 DE3 в культурах на встряхиваемых колбах, как описано в примере 10.

Фиг. 45 показывает анализ в геле ПААГ с ДСН конструкций CBD-R-C-XTEN\_AE864-RH8 (EC682) и CBD-R-XTEN\_AE864-RH8 (EC683), экспрессированным при ферментации *E. coli*, как описано в примере 17. Гелевые дорожки образцов с маркерами MM и экспрессированными белками из конструкций такие: 1) маркер MM; осветленные растворимые лизаты ферментации № EC682 *E. coli* в разные временные интервалы после инокулирования 2) 16 ч, 3) 24 ч, 4) 40 ч, 5) 45 ч; осветленные растворимые лизаты ферментации № EC683 *E. coli* в разные временные интервалы после инокулирования 6) 16 ч, 7) 24 ч, 8) 40 ч, 9) 45 ч; очищенный CBD-R-XTEN\_AE864-RH8 референсный стандарт 10) 1 мкг, 11) 2 мкг и 12) 4 мкг. В отношении осветленных растворимых лизатов ферментации *E. coli* на каждую дорожку помещали 3 мкл ферментированной культуры. Пятна с полноразмерными белками проявились в пределах очерченного прямоугольника. Полосы с меньшей молекулярной массой являются белками клетки-хозяина.

Фиг. 46 показывает данные хроматографии с гидрофобным взаимодействием на носителе Toyopearl Phenyl 650 M, как описано в примере 18.

Фиг. 47 показывает данные анализа в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН в невосстанавливающих усло-



виях фракций, полученных в ходе хроматографии с гидрофобным взаимодействием на носителе Toyopearl Phenyl 650 M, как показано на этой фигуре и описано в примере 18. Вещества, расположенные на дорожках, такие: дорожка 1: маркер; дорожка 2: загрузка 7,5 мкл; дорожка 3: элюат 1; дорожка 4: элюат 2; дорожка 5: фракция элюирования E1; дорожка 6: фракция элюирования E2; дорожка 7: фракция элюирования E3; дорожка 8: фракция элюирования E4; дорожка 9: фракция элюирования E5; дорожка 10: фракция элюирования E6; дорожка 11: фракция элюирования E7; дорожка 12: фракция элюирования E8.

Фиг. 48 показывает данные анализа 4-12% в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях в растворе бис-Трис-элюатов, промывок (фиг. 48А) и фракций элюирования (фиг. 48В) (невосстанавливающие условия) хроматографии IMAC на носителе Toyopearl, как описано в примере 18.

Фиг. 49 показывает данные анализа в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях расщепленного трипсином пула элюирования хроматографии IMAC, описанной в примере 18.

Фиг. 50 показывает профиль элюирования хроматографии MacroCap Q, описанной в примере 18.

Фиг. 51 показывает данные анализа в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в примере 18. Фиг. 51А, элюат, окрашивание Кумасси. Фиг. 51В, фракции элюирования, окрашивание Кумасси. Фиг. 51С, фракции элюирования, окрашивание серебром.

Фиг. 52 показывает данные ОФ ВЭЖХ на носителе C18 фракций элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в примере 18.

Фиг. 53 показывает данные ОФ ВЭЖХ на носителе C18 пула элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в примере 18.

Фиг. 54 показывает данные анализа в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций, полученных в ходе хроматографии с гидрофобным взаимодействием на носителе Toyopearl Phenyl 650 M, как описано в примере 19.

Фиг. 55 показывает данные анализа в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций, полученных в ходе хроматографии IMAC на носителе Toyopearl, как описано в примере 19.

Фиг. 56 показывает данные анализа в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях/окрашивание серебром фракций элюирования хроматографии MacroCap Q, описанной в примере 19.

Фиг. 57 показывает данные анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 фракций элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в примере 19.

Фиг. 58 показывает данные анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 пула элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в примере 19.

Фиг. 59 показывает SDS-PAGE анализ конструкций XTEN с экспериментальными метками после экспессии в *E.coli*, как описано в примере 20. Растворимые лизаты были внесены в 4-12% бис-Трис-полиакриламидном геле в количествах нанесения на одну дорожку, эквивалентным 36 мкл суспензии клеточной культуры. Гель был окрашен красителем Кумасси синим, используя стандартные методики.

Фиг. 60 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН RP11-XTEN-His8-конструкций, экспрессированных в клетках *E.coli*, как описано в примере 20. Обработанные нагреванием растворимые лизаты были внесены в 4-12% бис-Трис-полиакриламидном геле в количествах, эквивалентных 1 или 2 мкл суспензии клеточной культуры соответственно. Гель был окрашен красителем Кумасси синим. Анализ геля продемонстрировал, что в основном весь экспрессированный белок RP11-XTEN-His8 находился в фракции клеток.

Фиг. 61 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН очищенного с помощью хроматографии на носителе MacroCap SP полипептида RP11-XTEN-His8, описанного в примере 21. Фракции были проанализированы в 4-12% ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием Кумасси.

Фиг. 62 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН очищенного с помощью хроматографии IMAC полипептида RP11-XTEN-His8, описанного в примере 21. Фракции были проанализированы в 4-12% ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием Кумасси.

Фиг. 63 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН трипсинового расщепления белка RP11-XTEN-His8, очищенного двумя стадиями хроматографии (SP+IMAC), описанные в примере 21. Препараты были проанализированы в 4-12% ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием Кумасси (фиг. 63А) и серебром (фиг. 63В).

Фиг. 64 показывает результаты анализа реакции конъюгации белка ДБЦО-Mal с полипептидом 3xТиол-XTEN, как описано в примере 23. Фиг. 64А показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 реакционной смеси. Образец с белками 20 мкг был введен в колонку Phenomenex Jupiter C18 5мкм 300 А 4,6 мм × 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой. Фиг. 64В показывает очистку с помощью хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (НС) продукта реакции ДБЦО-XTEN. Фиг. 64С показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 очищенного с помощью НС продукта реакции ДБЦО-XTEN.

Фиг. 65 показывает результаты анализа расщепления трипсином дважды маркированного предшественника XTEN, как описано в примере 24. Фиг. 65А показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН при нагрузке 2 мкг на дорожку. Гель был окрашен красителем SimplyBlue

SafeStain компании Invitrogen. Фиг. 65В показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН при нагрузке 0,5 мкг на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain.

Фиг. 66 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН, очищенного с помощью хроматографии на носителе MacroCap Q, расщепленного трипсином дважды маркированного предшественника, как описано в примере 24. Фиг. 66А показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН при нагрузке 3 мкг на дорожку. Гель был окрашен красителем SimplyBlue SafeStain компании Invitrogen. Фиг. 66В показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН при нагрузке 0,5 мкг на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain. Фиг. 66С показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% бис-Трис-ПААГ с ДСН при нагрузке 0,5 мкг на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain.

Фиг. 67 показывает результаты испытаний с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе С18 для определения остаточной активности трипсина. Фиг. 67А представляет данные анализа синтетического [G2]GLP2-пептида в интактной форме. Фиг. 67В представляет данные анализа синтетического [G2]GLP2-пептида, расщепленного бычьим трипсином. Фиг. 67С представляет данные анализа белка XTEN\_AE869\_Am1, C2 с добавлением [G2]GLP2 и инкубированием в течение ночи при 37°C, как описано в примере 24.

Фиг. 68 показывает процесс приготовления конъюгата GLP2-XTEN из GLP2-Cys-пептида и 1хАмино-XTEN-полипептида, как описано в примере 26. Образцы с белками по 20 мкг были введены в колонку Phenomenex Jupiter C18 5мкм 300 А 4,6 мм × 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой и детектировали по поглощению при 214 нм (изображения слева А-С). Образцы с белками по 100 мкг были обессолены с использованием устройств для центрифугирования NanoSep 3К Omega (Pall Corp.). Растворы белков в 50% ацетонитриле и 0,5% муравьиной кислоты были введены в масс-спектрометр высокого разрешения при скорости потока 10 мкл/мин. Были получены спектры масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) в диапазоне 800-1600 а.е.м. и трансформированы в спектры нулевого заряда с использованием Программы для байесовой реконструкции белков (изображения справа А-С). Фиг. 68А: начальный белок 1хАмино-XTEN. Фиг. 68В: продукт реакции между белком 1хАмино-XTEN и кросс-линкером сульфо-СМЦК. Фиг. 68С: очищенный конъюгат GLP2-XTEN после проведения реакции между полипептидами GLP2-Cys и N-Mal-XTEN.

Фиг. 69 показывает процесс приготовления конъюгата GLP2-XTEN из GLP2-Mal-пептида и 1хТиол-XTEN-полипептида, как описано в примере 27. Образцы с белками по 20 мкг были введены в колонку Phenomenex Jupiter C18 5мкм 300 А 4,6 мм × 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой и детектировали по поглощению при 214 нм (изображения слева А, В). Образцы с белками по 100 мкг были обессолены с использованием устройств для центрифугирования NanoSep 3К Omega (Pall Corp.). Растворы белков в 50% ацетонитриле и 0,5% муравьиной кислоты были введены в масс-спектрометр высокого разрешения при скорости потока 10 мкл/мин. Были получены спектры масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) в диапазоне 800-1600 а.е.м. и трансформированы в спектры нулевого заряда с использованием Программы для байесовой реконструкции белков (изображения справа А, В). Фиг. 69А: начальный белок 1хThiol-XTEN. Фиг. 69В: продукт реакции между белком GLP2-Mal и 1хThiol-XTEN.

Фиг. 70 показывает результаты анализа очистки белка GLP2-XTEN с использованием препаративной ОФ ВЭЖХ на носителе С4, как описано в примере 27. Фиг. 70А показывает хроматограмму препаративной ОФ ВЭЖХ. Фракция на 56-62 минутах собирали и выпаривали под вакуумом. Фиг. 70В показывает анализ очищенного GLP2-XTEN с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе С18.

Фиг. 71 показывает результаты конъюгации белка ДБЦО-Mal с полипептидом 1хТиол-XTEN, как описано в примере 28. Фиг. 71А показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе С18 реакционной смеси. Образец с белками 20 мкг был введен в колонку Phenomenex Jupiter C18 5 мкм 300 А 4,6 мм × 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой. Фиг. 71В показывает очистку с помощью НИС белка ДБЦО-XTEN. Фиг. 71С показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе С18, очищенного с помощью НИС белка ДБЦО-XTEN.

Фиг. 72 показывает результаты аналитических исследований полипептида XTEN, связанного через кросс-линкер с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), как описано в примере 31. Фиг. 72А показывает совместную миграцию белков в геле, выявленную с помощью УФ-света, которая демонстрирует большую кажущуюся ММ FITC-содержащих конъюгированных белков, также обнаруженных методом ЭХ при ОП214 (поглощение белков) и ОП495 (поглощение FITC) на колонке для ЭХ, что указывает на успешную маркировку XTEN с минимальной контаминацией свободным красителем. Расположение веществ по дорожкам (слева направо, после стандартов ММ такие: меченый белок FITC-CL-CBD-XTEN; меченый белок FITC-CL-XTEN; очищенный белок FITC-CL-XTEN; очищенный белок FITC-CL-XTEN и очищенный белок FITC-CL-XTEN. Гель проявили в УФ-свете для демонстрации кажущейся ММ FITC в FITC-содержащих белках. Фиг. 72В показывает результаты анализа с помощью ЭХ полипептидов XTEN, конъюгированных с FITC, показывающих перекрытие получаемых веществ при ОП214 и ОП495 и также обладающих кажущимися большими молекулярными массами.

Фиг. 73 показывает результаты анализа с помощью ЭХ пиков фракций элюирования конъюгатов белка GFP, связанных через кросс-линкер с полипептидом XTEN и свободным белком GFP, как описано в примере 32. Кросс-линкерное связывание было подтверждено совместной миграцией белка с поглощением при ОП214 и GFP с поглощением при ОП395 в колонке ЭХ.

Фиг. 74 показывает результаты фармакокинетического анализа белков GFP-X-XTEN и FITC-X-XTEN испытанных на яванских макаках, как описано в примере 33.

Фиг. 75 показывает фармакокинетический профиль (концентрации в плазме) у яванских макаков после однократных доз разных композиций с зеленым флуоресцентным белком (GFP), присоединенных к неструктурированным полипептидам различной длины, назначенные подкожно или внутривенно, как описано в примере 33. Этими композициями были GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN\_AF576, GFP-Y576 и XTEN\_AD836-GFP. Были проанализированы образцы крови, отобранные в разное время после инъекции, и измерена концентрация белка GFP в плазме методом ИФА с использованием антител против GFP для улавливания и приготовления с помощью биотинилирования таких же поликлональных антител для выявления композиций. Результаты анализов представлены в виде зависимости концентрации в плазме от времени (ч) после дозирования, из которых видно, что особенно значительное увеличение периода полувыведения отмечено для белка XTEN\_AD836-GFP - композиции с наибольшей длиной последовательности XTEN. У конструкции с наименьшей длиной последовательности - GFP-L288 был наименьший период полувыведения.

Фиг. 76 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН образцов испытания на стабильность гибридного белка XTEN\_AE864, соединенного с N-концом белка GFP. Белок GFP-XTEN инкубировали в плазме яванских макаков и лизате крыс длительностью до 7 суток при 37°C, как описано в примере 55. Кроме того, также оценивали белок GFP-XTEN при его введении яванским макакам. Образцы отбирали на 0, 1 и 7-е сутки и анализировали с помощью ПААГ с ДСН с последующим детектированием с использованием вестерн-анализа и с применением антител против белка GFP.

Фиг. 77 показывает УФ-спектр кругового дихроизма белка E<sub>x4</sub>-XTEN\_AE864, проведенный как описано в примере 56.

Фиг. 78 показывает результаты анализа эксклюзионной хроматографии образцов конструкции глюкогон-XTEN, выполненные с применением белков-стандартов с известной молекулярной массой и графическим представлением результатов в виде зависимости поглощения от времени удерживания, как описано в примере 58. Конструкции глюкогон-XTEN следующие: 1) глюкогон-Y288; 2) глюкогон-Y144; 3) глюкогон-Y72 и 4) глюкогон-Y36. Результаты, приведенные на фиг. 79, являются схематическим изображением логической блок-схемы алгоритма SegScore (пример 59). На фигуре приведена следующая легенда: i, j - счетчики, использованные в контрольных циклах, которые проходят по всей подпоследовательности; HitCount - эта переменная является счетчиком, который подсчитывает сколько раз счетчики подпоследовательности учитывают количество идентичных подпоследовательностей в блоке; SubSeqX - эта переменная запоминает подпоследовательность, которая проверяется на избыточность; SubSeqY - эта переменная запоминает подпоследовательность, по сравнению с которой проверяется переменная SubSeqX; BlockLen - эта переменная запоминает определенную пользователем длину блока; SegLen - эта переменная запоминает длину сегмента. Программа жестко настроена для получения количеств подпоследовательностей с длинами 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; Block - эта переменная запоминает строковое значение длины BlockLen. Строковое значение состоит из букв входной XTEN-последовательности и определяются положением i-счетчика; SubSeqList - это список, в котором запоминаются полученные количества подпоследовательностей.

Фиг. 80 описывает применение алгоритма SegScore к гипотетической XTEN-последовательности из 11 аминокислот для определения повторяемости. XTEN-последовательность, состоящая из N-аминокислот, разделяется на N-S+1 подпоследовательностей длиной S (в данном случае S=3). Выполняется попарное сравнение всех подпоследовательностей и в результате рассчитывается среднее количество идентичных подпоследовательностей, в данном случае, число подпоследовательностей составляет 1,89.

Фиг. 81 представляет результаты количественного измерения флуоресцентного сигнала клонов RP11 от pSD0107 до pSD0118), как описано в примере 12. Результаты включают один положительный контроль (pLCW970) и два отрицательных контроля (pBr322 и pLCW970+10 мМ раствор фосфата). Уровень экспрессии белка GFP измерялся с использованием образцов, полученных на 2-3 колбах встряхивания на одну конструкцию.

Фиг. 82 показывает результаты скрининга библиотек LCW1157-1159. Фиг. 82A-C представляют гистограммы флуоресценции образцов LCW1157-1159, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала, как описано в примере 12. Средние значения флуоресценции отмечены на фигурах для отрицательного контроля (черная стрелка) и для положительного pSD0116 (белая стрелка). Фиг. 82D-F представляют корреляцию между значениями флуоресценции исходного испытания и повторных испытаний выбранных клонов.

Фиг. 83 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН 8 продуктов и контролей конструкций с наибольшей экспрессией в невосстанавливающих условиях, как описано в примере 12. Желаемый конеч-

ный продукт полноразмерного белка RP11-XTEN-GFP показан стрелкой, и полоса с большей массой является димером этого белка. Дорожки 1-8:8 конструкций с наибольшей экспрессией (уровни экспрессии расположены от большей к меньшей, основанные на данных определения флуоресценции при повторных испытаниях), 1. LCW1159.004, 2. LCW1159.006, 3. LCW1158.004, 4. LCW1157.040, 5. LCW1158.003, 6. LCW1157.039, 7. LCW1157.025, 8. LCW1157.038; C1-C3: контроли: C1. pSD0114, C2. pSD0116, C3. pCW1146 (отрицательный контроль).

Фиг. 84 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН эффективности связывания с носителем MacroCap SP 4 продуктов конструкций с наибольшей экспрессией в невозобновляющихся условиях, как описано в примере 12. Дорожки 1-4: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1159.004, 2. Дорожки 5-8: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1159.006. Дорожки 9-12: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1158.004. Дорожки 13-16: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1157.040. Дорожки 17-20 1-4: загрузка, элюат, промывка и элюирование отрицательного контроля. Неотмеченные дорожки принадлежат стандартам молекулярных масс.

Фиг. 85 показывает обобщенные результаты скрининга библиотеки LCW1163 со сравнением флуоресцентного сигнала 4 продуктов и контролей с наибольшей экспрессией при повторных испытаниях, как описано в примере 12. Каждый образец исследован в 4 повторностях, представленных на фиг. 4 отдельными точками.

Фиг. 86 показывает обобщенные результаты скрининга библиотеки LCW1160, как описано в примере 12. На фигурах показаны гистограммы флуоресценции образцов LCW1157-1159, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала; и отмечены средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка), pSD0116 (белая стрелка) и LCW1159.004 (кандидаты с высокой экспрессией скрининга LCW1157-1159, серая стрелка).

Фиг. 87 показывает данные анализа в 4-12% ПААГ с ДСН с окрашиванием серебром фракций хроматографии на носителе MacroCap Q, как описано в примере 14. Фиг. 87А: серия 2, дорожка 1: стандарт молекулярной массы; дорожки 2-5: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-4 соответственно; дорожки 6-16: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-11 соответственно. Фиг. 87В: серия 1, дорожка 1: стандарт молекулярной массы; дорожки 2-6: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-5 соответственно; дорожки 7-16: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-10 соответственно.

Фиг. 88 показывает результаты анализов промежуточных соединений и конечного продукта во время получения конструкции 1хДБЦО,3хLHRH-XTEN, как описано в примере 34.

Фиг. 89 показывает результаты анализов реакционных смесей при получении конъюгатов с конструкцией 1хАзид,3хММАЕ-XTEN, проанализированных с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 и масс-спектрографии, как описано в примере 35. Фиг. 89А представляет анализ исходного реактанта 1хАмино,3хТиол-XTEN. Фиг. 89В представляет анализ модификации белка ММАЕ-малеинимидом, демонстрирующий увеличение массы, которое соответствует модификации трех цистеиновых фрагментами ММАЕ-Mal. Фиг. 89С показывает результаты анализа модификации белка эфиром Азид-ПЭГ4-NHS (N-гидроксилсукцимид) с увеличением массы, соответствующем добавлению одного компонента азид-ПЭГ4.

Фиг. 90 показывает результаты анализов продуктов реакции конъюгатов 3хLHRH,3хММАЕ-XTEN, как описано в примере 36. Фиг. 90А: результат анализа в ПААГ с ДСН клик-конъюгата. На пластину 12% бис-Трис-NuPAGE минигеля (Life Technologies) было нанесено 0,5 мкг белков на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain (Thermo Scientific, № 24612 по каталогу). Дорожка 1, 1хАзид,3хММАЕ-XTEN; дорожка 2, 1хДБЦО,3хLHRH-XTEN; дорожка 3, продукты клик-реакции. Полоса продукта конъюгации указана стрелкой. Фиг. 90В: результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C4 реактантов и продуктов клик-конъюгации: (1) 1хДБЦО,3хLHRH-XTEN; (2) 1хАзид,3хММАЕ-XTEN; (3) продукты клик-реакции.

Фиг. 91 показывает блок-схему реакции во время получения конъюгатов 1хLHRH,3хММАЕ-XTEN, как описано в примере 37. Фиг. 91А: начальная конструкция 1хАмино,3хТиол-XTEN; фиг. 91В: модификация белка 2,2'-дипиридил-дисульфидом; фиг. 91С: модификация белка ДБЦО-сульфо-NHS; фиг. 91D: снятие защиты цистеиновых остатков с помощью TCEP; фиг. 91Е: модификация трех цистеиновых остатков с помощью ММАЕ-Mal; фиг. 91F: конъюгация LHRH-азид с N-концевым ДБЦО.

Фиг. 92 показывает блок-схему реакции во время получения конъюгатов реактантов 1хMal,3хРТХ-XTEN, как описано в примере 41. Фиг. 92А: начальная конструкция 1хАмино,3хТиол-XTEN; фиг. 92В: модификация белка с помощью РТХ-Mal; фиг. 92С: модификация белка с помощью сульфо-СМЦК.

Фиг. 93 показывает результаты анализов реакционных смесей при получении производных йодацетил-XTEN, как описано в примере 42. Фиг. 93А: результаты анализа с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 реакции 1хАмино-XTEN перед и после инкубации с 10х избытком SIA. Фиг. 93В: МС с ИЭР анализ конструкции 1хАмино-XTEN, модифицированной SIA. Фиг. 93С: образцы, проанализированные с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18. Нижняя хроматограмма - HCKFWW-пептид. Средний график - IA-XTEN. Верхняя хроматограмма - реакция IA-XTEN с 5х избытком HCKFWW-пептида.

Фиг. 94 показывает результаты скрининга библиотек образцов LCW1171, 1172, 1203 и 1204, как описано в примере 14. Фиг. 94А-D: гистограммы флуоресценции образцов LCW1171, 1172, 1203, 1204,

отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала. При скрининге образцов LCW1171-1172 на фиг. 94А и В были отмечены средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка), рSD0116 (белая стрелка). При скрининге образцов LCW1203-1204 на фиг. 94С и D были отмечены средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка), рSD0116 (белая стрелка) и контроль CBD (серая стрелка).

Фиг. 95 показывает результаты скрининга библиотек образцов LCW1208-1210, как описано в примере 12. На фиг. 95А-С показаны гистограммы флуоресценции образцов LCW1208-1210, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала; и отмечены средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка) и контроль CBD (серая стрелка).

Фиг. 96 иллюстрирует получение XTEN-сегментов из предшественника, содержащего три повторяющиеся копии полипептида XTEN с идентичной длиной и последовательностью. На фиг. 96А XTEN-предшественник включает три идентичные копии XTEN, которые фланкированы на концах идентичными сайтами расщепления протеазами. На фиг. 96В XTEN-предшественник дополнительно включает N- и C-концевые маркеры для аффинной очистки для облегчения процесса очистки полноразмерных молекул предшественников. После очистки предшественник расщепляется протеазами, которые действуют на внедренные расщепляемые последовательности для высвобождения из полипептида XTEN маркеров, которые при последующей очистке отделяются от отдельных молекул XTEN, что облегчает получение полипептидов XTEN с высоким выходом с отделением молекул с короткой и средней длинами от длинно-цепочечных молекул предшественников.

Фиг. 97 иллюстрирует разные варианты осуществления тримерных разветвленных конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, в которых показано, что все конъюгаты могут быть получены из идентичных XTEN-молекул посредством конъюгации с их N-концевой аминогруппой и функциональной группой, такой как тиол цистеина, локализованный близко к C-концу. Фиг. 97А и В иллюстрируют конъюгаты, несущие одну молекулу нагрузочного вещества, на фиг. 97А используется 4-концевой кросс-линкер, со всеми концами которого связаны полипептиды XTEN с близким расположением нагрузочного вещества, что приводит к значительному экранированию взаимодействия нагрузочного вещества с другими молекулами. Фиг. 97В иллюстрирует конфигурацию, в которой нагрузочное вещество конъюгационно связано с одним концом молекулы XTEN, которая с другого конца разветвляется, что приводит к снижению экранирования нагрузочного вещества по сравнению с конфигурацией фиг. 97А. Фиг. 97С иллюстрирует конъюгат с двумя нагрузочными веществами, что приводит к увеличению avidности или увеличению активности конструкций. Фиг. 97D и Е иллюстрируют конфигурации с тремя идентичными нагрузочными веществами, что приводит к дальнейшему увеличению активности и/или avidности. Фиг. 97F иллюстрирует конфигурацию с одним нагрузочным веществом А и двумя идентичными копиями нагрузочного вещества В для сильного avidного связывания или взаимодействия. Фиг. 97G иллюстрирует конфигурацию с 3 разными нагрузочными веществами, что позволяет включить в один XTEN-конъюгат три различные функции.

Фиг. 98 иллюстрирует схему синтеза конъюгата из разветвленного полипептида XTEN и одной молекулы нагрузочного вещества. В начале тиоловая группа полипептида XTEN блокируется при реакции с йодацетамидом (в другом варианте синтез может начинаться использованием полипептида XTEN, с недостающей тиоловой группой). Далее к альфа-аминогруппе XTEN добавляется ДБЦО-группа, после чего проходит реакция с тетрафункциональным кросс-линкером, который содержит йодацетильную группу и три азидные группы. Полученная молекула XTEN далее реагирует с нагрузочным веществом, которое несет свободную тиоловую группу, что приводит к получению конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

Фиг. 99 иллюстрирует схему синтеза конъюгата из разветвленного полипептида XTEN и одной молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получается при реакции полипептида XTEN с трифункциональным линкером, включающем две функционирующие азидные группы и функционирующую NHS-группу, с последующим добавлением нагрузочного вещества А, связываемым через тиоловую группу посредством реакции с малеинимидом (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается при реакции цистеина полипептида XTEN с йодацетамидом, что блокирует свободные тиоловые группы, с последующим добавлением ДБЦО к  $\alpha$ -аминогруппе, активированной NHS (порядок этих двух стадий может быть обратным). В дальнейшем две молекулы промежуточного вещества связываются с использованием клик-реакции, приводя к получению конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

Фиг. 100 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид XTEN и две идентичные молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получают добавлением ДБЦО-группы к  $\alpha$ -аминогруппе полипептида XTEN с помощью реакции с NHS. Второе промежуточное вещество получается при блокировании свободных тиоловых групп полипептида XTEN йодацетамидом добавлением трехфункционального кросс-линкера (2 N-малеинимидные группы и карбоксильная группа, активированная NHS) к  $\alpha$ -аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Две молекулы

промежуточного вещества реагируют с образованием разветвленного конъюгата, после чего с использованием клик-реакции присоединяются две молекулы нагрузочного вещества А, приводя к получению конечного продукта - конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 101 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид ХТЕН и три идентичные молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получают добавлением ДБЦО-группы к  $\alpha$ -аминогруппе полипептида ХТЕН с помощью реакции с NHS. Другое промежуточное вещество получают связыванием нагрузочного вещества А посредством N-малеинимидной функциональной группы с тиоловой группой полипептида ХТЕН. Три молекулы соединяются вместе посредством трехфункционального кросс-линкера, содержащего три азидные функциональные группы, приводя к получению конечного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 102 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид ХТЕН и три идентичные молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получают добавлением ДБЦО-группы к тиоловой группе полипептида ХТЕН с помощью реакции с N-малеинимидом. На следующей стадии нагрузочное вещество А связывается с  $\alpha$ -аминогруппой промежуточного вещества ХТЕН с помощью реакции с NHS. Три молекулы полученной молекулы ХТЕН соединяются посредством трехфункционального кросс-линкера, содержащего три азидные функциональные группы, приводя к получению конечного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 103 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид ХТЕН и две молекулы нагрузочного вещества А и одной молекулы нагрузочного вещества В в конъюгате. Промежуточное вещество получается при добавлении нагрузочного вещества А к тиоловым группам полипептида ХТЕН с использованием N-малеинимидной функциональной группы, с последующим добавлением трехфункционального кросс-линкера (две азидные группы и карбоксильная группа, активированная NHS) к  $\alpha$ -аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к  $\alpha$ -аминогруппам полипептида ХТЕН посредством NHS-активации с последующим добавлением нагрузочного вещества В свободным тиоловым группам полипептида ХТЕН с использованием N-малеинимидной группы (порядок этих двух стадий может быть обратным). Две молекулы второго промежуточного вещества реагируют с одной молекулой первого промежуточного вещества с образованием конечного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 104 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид ХТЕН и три различных нагрузочных вещества. Промежуточное вещество получается при добавлении нагрузочного вещества А к тиоловым группам полипептида ХТЕН с использованием N-малеинимидной функциональной группы, с последующим добавлением трехфункционального кросс-линкера (одна азидная группа, одна N-малеинимидная группа и одна карбоксильная группа, активированная NHS) к  $\alpha$ -аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается присоединением нагрузочного вещества В к  $\alpha$ -аминогруппе полипептида ХТЕН посредством реакции с NHS. Третье промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к  $\alpha$ -аминогруппам полипептида ХТЕН посредством NHS-активации с последующим добавлением нагрузочного вещества С к свободной тиоловой группе полипептида ХТЕН с использованием N-малеинимидной группы (порядок этих двух стадий может быть обратным). Три молекулы промежуточных веществ реагируют друг с другом с образованием конечного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 105 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего димерный или тетрамерный разветвленный полипептид ХТЕН и молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к тиоловым группам полипептида ХТЕН с использованием N-малеинимидной функциональной группы с последующим добавлением нагрузочного вещества А к аминогруппам полипептида ХТЕН, используя NHS-группу (порядок этих двух стадий может быть обратным). Впоследствии промежуточное вещество мультимеризуется при добавлении азидсодержащих кросс-линкеров. Использование двухвалентного кросс-линкера обеспечивает димерную конфигурацию, а четырехвалентный кросс-линкер - тетрамерную конфигурацию конечного продукта.

Фиг. 106 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид ХТЕН и три различных нагрузочных вещества. Промежуточное вещество получается при добавлении нагрузочного вещества А к тиоловым группам полипептида ХТЕН с использованием N-малеинимидной функциональной группы, с последующим добавлением трехфункционального кросс-линкера (одна азидная группа, одна N-малеинимидная группа и одна карбоксильная группа, активированная NHS) к  $\alpha$ -аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается присоединением нагрузочного вещества В к свободной тиоловой группе полипептида ХТЕН посредством N-малеинимидной функциональной группы. Третье промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к  $\alpha$ -аминогруппам полипептида ХТЕН посредством NHS-активации с последующим добавлением нагрузочного вещества С к свободной тиоловой группе с использованием N-малеинимидной группы (порядок этих двух стадий может быть обратным). Три молекулы промежуточных веществ реагируют друг с другом с образованием конечного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество.

Фиг. 107 показывает результаты анализов реакционных смесей при получении конъюгатов с конст-

рукцией 1хДБЦО,3хFA( $\gamma$ )-XTEN проанализованных с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 и масс-спектрографии, как описано в примере 38. Фиг. 107А представляет анализ исходного реактанта 1хАмино,3хТиол-XTEN Фиг. 107В представляет анализ модификации белка с фолат- $\gamma$ -малеинимидом, демонстрирующий увеличение массы, которое соответствует модификации трех цистеинов фрагментами FA( $\gamma$ )-Mal. Фиг. 107С показывает результаты анализа модификации белка эфиром ДБЦО-сульфо-NHS с увеличением массы, соответствующим добавлению одной функциональной части ДБЦО.

Фиг. 108 показывает результаты анализов ОФ ВЭЖХ на носителе С4 реактантов и продукта клик-конъюгата 3хFA( $\gamma$ ),3хММАЕ-XTEN, как описано в примере 39. (1) 1хДБЦО,3хFA( $\gamma$ )-XTEN (2) 1хАзид,3хММАЕ-XTEN; (3) продукты клик-реакции.

Фиг. 109 показывает результаты анализов конечного продукта 3хFA( $\gamma$ ),3хММАЕ-XTEN, очищенного с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ, как описано в примере 39. Фиг. 109А показывает результаты анализа эксклюзионной хроматографии (колонка Phenomenex BioSep-SEC-s4000 600  $\times$  7,80 мм, буферный раствор 50 мМ фосфат натрия рН 6,5 и 300 мМ NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, изократическое элюирование 70 мин). Фиг. 109В показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ (колонка Phenomenex Jupiter C18 5  $\mu$ М 300  $\text{Å}$  150 $\times$ 4,60 мм, буферный раствор А: 0,1% TFA в H<sub>2</sub>O, буферный раствор В: 0,1% TFA в SAN, скорость потока 1 мл/мин, градиент 5% - 50% В в течение 45 мин). Фиг. 109С показывает результаты анализа МС с ИЭР (QSTAR-XL, рассчитанная ММ 85085,4 Да, экспериментальная ММ 85091 Да).

Фиг. 110 показывает результаты определения мобилизационной активности рецептора GPCR Ca<sup>2+</sup> при действии рекомбинантного белка GLP2-2G-XTEN (закрашенные квадраты) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (закрашенные круги), выполненные как описано в примере 62.

Фиг. 111 показывает результаты определения стабильности в плазме человека *in vitro* рекомбинантного белка GLP2-2G-XTEN (закрашенные квадраты) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (закрашенные треугольники) в разные периоды времени при 37°C, выполненные как описано в примере 63.

Фиг. 112 показывает результаты определения у крыс фармакокинетических профилей рекомбинантного белка GLP2-2G-XTEN (закрашенные квадраты) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (закрашенные треугольники), выполненные как описано в примере 64.

Фиг. 113. Фиг. 113А показывает результаты ЭХ-ВЭЖХ анализа продуктов реакции между трис-[2-малеинимидоэтил]амином и 1хАмино,1хТиол-XTEN<sub>432</sub>; фиг. 113А - конъюгационная смесь: пик 1 - тримерный XTEN, пик 2 - димерный XTEN, пик 3 - непрореагировавший мономерный XTEN; фиг. 113В - контроль-линейный XTEN<sub>1296</sub>; фиг. 113С - контроль-линейный XTEN<sub>864</sub>; фиг. 113D - контроль-линейный XTEN<sub>432</sub>.

Фиг. 114. Фиг. 114А показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ конъюгации ДБЦО-сульфо-NHS с полипептидом 1хАмино-XTEN<sub>288</sub>, как описано в примере 65. Непрореагировавший полипептид XTEN элюировался на 19-й мин. 1хДБЦО-XTEN<sub>288</sub> элюировался на 27-й мин. Реагент ДБЦО-сульфо-NHS и продукт его гидролиза элюировались на 41,5-й и 38,5-й мин соответственно. Фиг. 114В показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 конъюгации эфира Азидо-ПЭГ4-NHS с трис(2-аминоэтил)амином. 3хАзид-ПЭГ4-ТАЕА был идентифицирован методами МС с детектированием MALDI-TOF и МС с ЭИР как продукт с ММ 966 Да.

Фиг. 115 показывает результаты ЭХ-ВЭЖХ анализа, как описано в примере 66, продуктов реакции между 3хАзид-ПЭГ4-ТАЕА и 1хДБЦО-XTEN<sub>288</sub>: (кривая А) конъюгационная смесь: пик 1 - тримерный XTEN, пик 2 - димерный XTEN, пик 3 - непрореагировавший мономерный XTEN; пик 4 - вещества с низкой молекулярной массой; (кривая В) - контроль-линейный XTEN<sub>864</sub>; (кривая С) - контроль-линейный XTEN<sub>576</sub>; (кривая D) - контроль-линейный XTEN<sub>288</sub>.

Фиг. 116 показывает результаты киллинг-анализа, демонстрирующий избирательную цитотоксичность белка 3хFA( $\gamma$ ),3хММАЕ-XTEN для КВ-клеток, как описано в примере 69. Кривая отклика на ингибирующие дозы показаны для групп без ММАЕ (закрашенные круги); 3хММАЕ-XTEN (закрашенные перевернутые треугольники) и 3хFA( $\gamma$ ),3хММАЕ-XTEN в присутствии (закрашенные треугольники) и отсутствии (заполненные квадраты) конкурента фолиевой кислоты в КВ-клетках.

Фиг. 117 показывает структуру XTEN-нагрузочное вещество конъюгата 3хFA( $\gamma$ ),3хММАЕ-XTEN. Фиг. 117А показывает два полипептида XTEN, связанных реакцией азидо 1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-овой кислоты, N-гидроксисукцинимидного эфира и алкина 6-(11,12-дидегидродибензо[b,f]азоцин-5(6Н)-ил)-6-оксогексановой кислоты, N-гидроксисукцинимидного (или N-гидроксисульфосукцинимидного) эфира. Фиг. 117В показывает остаток X модифицированного Суs с помощью фолат- $\gamma$ -аминопентил-малеинимида. Фиг. 117В показывает остаток X модифицированного Суs с помощью фолат- $\gamma$ -аминопентил-малеинимида. Фиг. 117С показывает остаток Z модифицированного Суs с помощью maleinimidoкапроил-валин-цитруллин-p-аминобензолкарбонил-монометилауристатин E.

#### Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием вариантов реализации настоящего изобретения следует понимать, что такие варианты реализации представлены только в качестве примера, и что описанные различные альтернативы вариантов реализации настоящего изобретения могут быть использованы при практическом осуществле-

нии настоящего изобретения. Специалистам в данной области многочисленны варианты, изменения и замещения, которые будут встречаться в данном описании, понятны без отклонения от идеи настоящего изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при осуществлении или проверке данного изобретения могут использоваться подобные или эквивалентные описанным в этом документе материалы и методы, ниже описаны приемлемые материалы и методы. В случае возникновения конфликта будет проверяться описание патента, включая определения. Кроме того, материалы, методы и примеры приводятся только с иллюстративной целью и не подразумеваются как ограничивающие реализацию данного изобретения. Специалистам в данной области многочисленны варианты, изменения и замещения, которые будут встречаться в данном описании, понятны без отклонения от идеи настоящего изобретения.

#### Определения

В контексте данной заявки на патент следующие термины несут значения, приписываемые им, если не указано иное.

Как используется во всем описании патента и формуле изобретения, термины в единственном и множественном числе используются в значении, которое обозначает "по меньшей мере один", "по меньшей мере, первый", "один или более" или "множество" упоминаемых компонентов или стадий, за исключением случаев, в которых после этого специально устанавливается верхний предел. Поэтому термин "нагрузочное вещество" в использовании в настоящем документе значит "по меньшей мере, первое нагрузочное вещество", но включает множество нагрузочных веществ. Действующие пределы и параметры комбинаций в отношении количеств какого-либо одного агента будут известны специалисту в данной области в свете настоящего раскрытия изобретения.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо в отношении полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться вставками из неаминокислот. Термины также охватывают аминокислотные полимеры, которые были модифицированы, например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, присоединением липидов, ацелированием, фосфорилированием или какой-либо другой манипуляцией, такой как конъюгация с меченным компонентом. Как используется в этом документе, термин "аминокислота" относится к природным и/или не встречающимся в природе или синтетическим аминокислотам, включая, помимо прочего, D- или L-оптические изомеры, аналоги аминокислот и белковоподобные вещества. Для обозначения аминокислот используются стандартные одно- или трёхбуквенные кодовые обозначения.

"Фармакологически активный" агент включает любое лекарственное средство, вещество, состав или смесь, которые необходимо назначить субъекту, например лекарственные агенты, диагностические агенты или агенты для доставки лекарственных средств, которые обладают или ожидаемо обладают фармакологическим, зачастую благоприятным действием, которое можно продемонстрировать в условиях *in vivo* или *in vitro*. Такие агенты могут включать пептиды, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, олигонуклеотиды и небольшие молекулы синтетических веществ или их аналоги.

Термин "природные L-аминокислоты" обозначает оптические изомерные L-формы глицина (G), пролина (P), аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), метионина (M), цистеина (C), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), лизина (K), аргинина (R), глутамина (Q), аспарагина (N), глутаминовой кислоты (E), аспарагиновой кислоты (D), серина (S) и треонина (T).

Термин "не встречающиеся в природе" применим к последовательностям и используется в настоящей заявке, обозначает полипептидные или полинуклеотидные последовательности, которые не имеют аналога или не комплементарны или не обладают высокой степенью гомологии с последовательностью дикого вида или встречающейся в природе последовательностью, обнаруженной у млекопитающих. Например, полипептид или фрагмент, не встречающиеся в природе, могут разделять не более 99, 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50% или даже менее идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с природной последовательностью при соответствующем выравнивании.

Термины "гидрофильный" и "гидрофобный" относятся к степени аффинности, которой обладает вещество по отношению к воде. Гидрофильное вещество обладает сильной аффинностью к воде, с тенденцией к растворению, смешиванию или смачиванию водой, в то время как гидрофобное вещество в основном обладает недостатком аффинности к воде, с тенденцией к отталкиванию и отсутствию абсорбции воды и с тенденцией не растворяться, не смешиваться и не смачиваться водой. Аминокислоты могут быть охарактеризованы на основе их гидрофобности. Было разработано несколько классификаций. Примером классификации является разработанная автором Levitt M. et al., J. Mol. Biol. (1976) 104:59, которая приведена в статье Норр Т.Р. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA (1981) 78:3824. Примерами "гидрофильных аминокислот" являются аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин и глутамин. Особый интерес имеют гидрофильные аминокислоты аспарагиновая, серин и глицин. Примерами "гидрофобных аминокислот" являются триптофан, тирозин, фенилаланин, метионин, лейцин, изолейцин и валин. Термин "фрагмент" при применении к биологически активному белку, является сокращенной формой биологиче-



ски активного белка, которая сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. Термин "вариант" при применении к биологически активному белку является белком с последовательностью, гомологичной к природному биологически активному белку, который сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. Например, вариант белка может разделять по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с референсным биологически активным белком. Как используется в данном тексте, термин "вариант биологически активного белка" включает белки специально модифицированные, например, в сайте, определяющем мутагенез, синтез кодирующего гена, инсерций или случайно измененные вследствие мутаций и сохраняющие активность.

Термин "вариант последовательности" обозначает полипептиды, которые были модифицированы по сравнению с их нативной или оригинальной последовательностью путем одной или более инсерций, делеций или замен. Инсерции могут быть локализованы на одном или обоих концах белка и/или могут быть размещены в пределах внутренних участков аминокислотной последовательности. Не ограничивающий реализацию этого изобретения пример представляет инсерцию ХТЕН-последовательности в последовательности биологически активного нагрузочного белка. Другой не ограничивающий пример представляет замену аминокислоты ХТЕН-последовательности другой аминокислотой. В вариантах с делециями один или более аминокислотных остатков удалены, как описано в данном тексте. Поэтому варианты с делециями включают все фрагменты несущей полипептидной последовательности. В вариантах с заменами один или более аминокислотных остатков удалены или замещены альтернативными остатками. В одном варианте замены являются консервативными по природе, и консервативные замены такого вида хорошо известны в этой области знаний.

Термин "компонент" обозначает составляющую часть большей композиции или такую часть, которая подразумевает включение в большую композицию, такая как функциональная группа молекулы лекарственного вещества или нацеленного пептида, соединенного с большим полипептидом.

Как используется в данном тексте, "концевая ХТЕН-последовательность" относится к ХТЕН-последовательностям, которые соединены с N- или С-концом несущей молекулы, при этом несущей молекулой является пептид или полипептид.

Термин "сайт высвобождения ХТЕН" относится к расщепляемой последовательности в молекуле, несущей ХТЕН, который может распознаваться и расщепляться протеазой, осуществляя высвобождение ХТЕН или части ХТЕН из полипептида ХТЕН-нагрузочного вещества. Как используется в данной заявке, "протеаза млекопитающих" обозначает протеазу, которая в нормальном состоянии присутствует в жидкостях организма, клетках или тканях млекопитающих. Сайты высвобождения ХТЕН могут быть сконструированы таким образом, чтобы расщепляться различными протеазами млекопитающих (известных как "высвобождающие ХТЕН протеазы") такие как трипсин, FXIa, FXIIa, калликреин, FVIIa, FVIIIa, FXa, FIIa (тромбин), эластаза-2, MMP-12, MMP-13, MMP-17, MMP-20 или любая протеаза, присутствующая у субъекта. Могут использоваться другие эквивалентные протеазы (эндогенные или экзогенные), которые способны распознавать определенные сайты расщепления. Сайты расщепления могут быть изменены и скорректированы к используемой протеазе.

Термин "в пределах", в отношении первого полипептида, связанного со вторым полипептидом, охватывает связывание, которое соединяет N-конец первого или второго полипептида с С-концом второго или первого полипептида соответственно, а также инсерцию первого полипептида в последовательность второго полипептида. Например, когда полипептид ХТЕН связан "в пределах" несущего полипептида, ХТЕН может быть связан с N-концом, С-концом или может быть вставлен между любыми двумя аминокислотами несущего полипептида. Термин "активность" применяется к форме(ам) композиции ХТЕН-нагрузочное вещество, представленной в данном тексте, относится к действию или эффекту, включающему, не ограничиваясь, рецепторное связывание, антагонистическую активность, агонистическую активность, клеточный или физиологический ответ или эффект, обычно известный для области применения нагрузочного вещества, при количественном измерении *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* или при определении клинического действия.

Как используется в данной заявке, термин "ELISA" относится к твердофазному иммуноферментному анализу, как описано в заявке или как иначе известно в этой области. Термин "клетка-хозяин" включает индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была реципиентом для векторов субъекта, какие описаны в данной заявке. Клетки-хозяин включают потомство единственной клетки-хозяин. Потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по геному всей ДНК) оригинальной родительской клетке из-за природной, случайной или намеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки после трансфекции в условиях *in vivo* с помощью вектора данного изобретения. Термин "изолированный", используемый для описания различных полипептидов, раскрываемых в данной заявке, обозначает полипептид, который был идентифицирован и выделен и/или восстановлен из составляющего его природного окружения. Контаминирующие компоненты его природного окружения - это вещества, которые как правило могут мешать диагностическому или терапевтическому использованию данного полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворимые вещества. Для специалистов в этой области очевидно, что не встречающийся в при-

роде полинуклеотид, пептид, белок, антитело или их фрагменты не требуют "изоляции" для отделения их от их встречающихся в природе аналогов. Кроме того, "концентрированный", "выделенный" или "разбавленный" полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты являются отделяемыми от их природно встречающихся аналогов в том, что концентрация или количество молекул в единице объема обычно больше, чем эти величины для встречающихся в природе аналогов. В общем, полипептид, созданный рекомбинантными методами и экспрессированный в клетке хозяина считается "изолированным".

"Изолированная" нуклеиновая кислота - это молекула нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и выделена по меньшей мере от одной контаминирующей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциируется в природном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Например, изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, отличается по форме или свойствам от найденной в природном состоянии. Поэтому молекулы изолированных кодирующих полипептидов нуклеиновых кислот отличаются от специфических молекул кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот, которые содержатся в природных клетках. Тем не менее, молекула изолированной кодирующей полипептид нуклеиновой кислоты включает молекулы кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот, содержащихся в клетках, которые обычно экспрессируют полипептиды, и в которых, например, молекула нуклеиновой кислоты является хромосомной или внехромосомной локализации, отличного от такой в природных клетках.

"Химерный" белок содержит по меньшей мере один гибридный полипептид, содержащий по меньшей мере один участок в другом расположении последовательности, чем встречается в природном состоянии. Участки могут обычно размещаться в отдельных белках и соединяются вместе в гибридном полипептиде или они могут естественно размещаться в одном и том же белке, но в гибридном полипептиде размещаться в другом расположении. Химерный белок может быть сконструирован, например, химическим синтезом или созданием и трансляцией полинуклеотида, в котором пептидные участки кодируются в желаемой взаимосвязи.

"Гибридный белок" и "белок слияния" используются в данной заявке взаимозаменяемо и относятся к соединению двух и более пептидных или полипептидных последовательностей рекомбинантными методами.

"Функционально связанные" обозначает, что ДНК-последовательности связаны последовательно и находятся в состоянии, доступном для считывания, или в рамке считывания. "Гибридный белок в рамке считывания" относится к двум и более открытым рамкам считывания (ОРС) для образования непрерывной большей ОРС, способом, который обеспечивает правильную рамку считывания с оригинальными ОРС. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью полипептида, если они влияют на транскрипцию полипептидной последовательности. Таким образом, результирующий рекомбинантный белок слияния - это один белок, содержащий два или более сегментов, которые соответствуют полипептидам, кодированным оригинальными ОРС (в которых сегменты соединяются не так, как обычно соединяются в природе).

"Сшивание", "конъюгирование", "связь", "связывание" и "соединение" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к ковалентному связыванию двух различных молекул с помощью химической реакции. Сшивание может происходить в результате одной или более химических реакций, как подробнее описано ниже.

Термин "конъюгационный участник", как используется в данной заявке, относится к отдельным компонентам, которые могут быть связаны в реакции конъюгации. Термин "конъюгат", предполагается, касается гетерогенной молекулы, образованной в результате ковалентного связывания конъюгационных участников друг с другом, например биологически активное нагрузочное вещество ковалентно связано с ХТЕН-молекулой или ковалентно присоединено кросс-линкером к реакционноспособной ХТЕН-молекуле. "Кросс-линкер", "линкер" и "поперечно-сшивающий агент" используются взаимозаменяемо и в их самом широком значении для обозначения химического вещества, которое используется для ковалентного соединения двух или более веществ. Например, кросс-линкер соединяет два, три, четыре или больше ХТЕН-молекул или соединяет нагрузочное вещество с ХТЕН, как и вещества, определенные в данном тексте. Кросс-линкер включает, но не ограничивается, продуктом реакции малой молекулы нулевой длины, кросс-линкерными гомо- или гетеробифункциональными и мультифункциональными веществами, продуктом реакции взаимодействия двух реагентов клик-реакции. Специалистам в этой области понятно, что кросс-линкер может относиться к продукту реакции ковалентного связывания, остающегося после поперечного сшивания реагентов. Кросс-линкер может также состоять из одного или более реагентов, которые еще не прореагировали, но способны реагировать с другим веществом. В контексте с полипептидами "линейная последовательность" или "последовательность" является порядком аминокислот в полипептиде в направлении amino- или карбоксильного конца, в котором остатки, соседствующие в последовательности друг с другом, являются последовательной первичной структурой полипептида. "Частичная последовательность" - это линейная последовательность части полипептида, который известен как содержащая дополнительные остатки в одном или двух направлениях.

Термин "гетерологичное" обозначает вещество, происходящее из генотипически отличного объек-

та, отличающегося от остальных компонентов этого объекта, с которыми оно сравнивается. Например, обогащенная глицином последовательность, удаленная из природной кодирующей последовательности и функционально связанная с кодирующей последовательностью, отличной от природной последовательности, является гетерологичной последовательностью, обогащенной глицином. Термин "гетерологичный", как применяется к полинуклеотиду, полипептиду, обозначает, что полинуклеотид или полипептид происходит из генотипически отличного объекта, отличающегося от остальных компонентов этого объекта, с которыми он сравнивается.

Термины "полинуклеотиды", "нуклеиновые кислоты", "нуклеотиды" и "олигонуклеотиды" используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их аналогов. Полинуклеотиды могут обладать трехмерной структурой и могут выполнять какую-либо роль, известную или неизвестную. Существуют следующие, не имеющие ограничительного характера, примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие участки гена или фрагмент гена, локусы (локус), определенные при анализе групп сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК с любой последовательностью, изолированная РНК с любой последовательностью, нуклеиновые кислоты-зонды и праймеры. Полинуклеотид может включать модифицированный нуклеотид, такой как метилированные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов. Модификации нуклеотидной структуры, если есть, могут быть внесены до или после образования полимера. Нуклеотидная последовательность может содержать ненуклеотидные компоненты. Полинуклеотид после полимеризации может быть дополнительно модифицирован, в частности конъюгированием с компонентом-маркером.

Термин "комплементарный полинуклеотид" обозначает полинуклеотидную молекулу, обладающую последовательностью или обращенной последовательностью из комплементарных оснований при сравнении с референсной последовательностью, таким образом, что может с полным соответствием гибридизироваться с референсной последовательностью. "Рекомбинантный", применимо к полинуклеотиду, обозначает, что полинуклеотид является продуктом разных комбинаций рекомбинантных методов, которые могут включать этапы клонирования, рестрикции и/или лигирования и другие операции, которые в результате приводят к экспрессии рекомбинантного белка в клетке-хозяине.

Термины "ген" и "фрагмент гена" используются в данной заявке взаимозаменяемо. Они относятся к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания, который после транскрипции и трансляции способен кодировать индивидуальный белок. Ген или фрагмент гена может быть геномным или к ДНК при условии, что полинуклеотид содержит по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая может охватывать весь кодирующий участок или его сегмент. "Гибридный ген" - это ген состоящий по меньшей мере из двух гетерологичных полинуклеотидов, которые соединены вместе.

"Гомологичность" или "гомологичный" или "идентичность последовательности" относится к сходству последовательностей или взаимозаменяемости двух или более полинуклеотидных последовательностей или двух или более полипептидных последовательностей. Для определения идентичности, сходства или гомологичности двух разных аминокислотных последовательностей при использовании такой программы как BestFit, для оптимизации подсчета идентичности, сходства или гомологичности последовательностей могут использоваться настройки по умолчанию или соответствующая матрица подсчета, такая как blosum45 или blosum80. Предпочтительно, чтобы гомологичными полинуклеотидами были те, которые в строгих условиях, описанных в данной заявке, гибридизируются и обладают по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно 95%, более предпочтительно 97%, более предпочтительно 98% и даже более предпочтительно 99% идентичности при сравнении с такими последовательностями. Гомологичные полипептиды преимущественно обладают идентичностью последовательностей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, даже более предпочтительно по меньшей мере 90% и даже более предпочтительно по меньшей мере на 95-99% идентичны. "Лигирование", применительно к нуклеиновым кислотам, относится к процессу образования фосфодиэфирных связей между фрагментами двух нуклеиновых кислот или генов, обеспечивающему их связывание. Для лигирования ДНК-фрагментов генов концы ДНК должны быть совместимыми. В некоторых случаях концы после эндонуклеазного расщепления непосредственно совместимы. Тем не менее, сначала может потребоваться превратить смещенные концы, обычно образующиеся после эндонуклеазного расщепления, в тупые концы, чтобы сделать их совместимыми для лигирования.

Термины "строгие условия" или "строгие условия гибридизации" включают ссылку на условия, в которых полинуклеотид гибридизируется со своей последовательностью-мишенью, в измеримо большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере с 2-кратным превышением фонового уровня). Обычно указывается точность условий гибридизации, частично с ссылкой на температуру и концентрацию соли, при которых выполняется стадия промывки. В основном, строгие условия должны быть такими, при которых концентрация соли составляет меньше чем около 1,5М раствор Na-ионов, обычная концентрация 0,01-1,0М Na-ионов (или других солей) при pH 7,0-8,3 и температура со-

ставляет по меньшей мере около 30°C для коротких полинуклеотидов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для длинных полинуклеотидов (например, больше 50 нуклеотидов). Например, "строгие условия" могут обеспечивать гибридизацию в растворе 50% формамида, 1M NaCl, 1% SDS при 37°C и три промывки, каждая в течение 15 мин в растворе 0,1xSSC/1% SDS от 60 до 65°C. Альтернативно, могут использоваться температуры около 65, 60, 55 или 42°C. Концентрация раствора SSC может варьировать от около 0,1 до 2xSSC с добавлением SDS в концентрации около 0,1%. Температура для промывок, в основном, выбирается такой, чтобы быть около от 5 до 20°C ниже, чем температура плавления для данной последовательности при определенной ионной силе и pH раствора.  $T_m$  - это температура (при определенной ионной силе и pH раствора), при которой 50% последовательности-мишени гибридизируется с идеально соответствующим зондом. Уравнение для расчета  $T_m$  и условий для гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны и могут быть найдены в публикации Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Как правило, для блокирования неспецифической гибридизации используют блокирующие агенты. Такие блокирующие агенты, к примеру, включают расщепленную и денатурированную ДНК спермы лосося в концентрации около 100-200 мкг/мл. В особых условиях, таких как РНК:ДНК гибридизации, также могут использоваться такие органические растворители как формамид в концентрации около 35-50% об./об. Для специалистов в этой области будут совершенно очевидными подходящие вариации таких условий промывки.

Термины "процентная идентичность", "процент идентичности последовательности" и "% идентичности", применимо к полинуклеотидным последовательностям, относится к проценту совпадений остатков между по меньшей мере двумя полинуклеотидными последовательностями, выровненными с использованием стандартизированного алгоритма. Такой алгоритм может вставлять стандартизированным и воспроизводимым способом пропуски в сравниваемые последовательности для того, чтобы оптимизировать выравнивание двух последовательностей и, таким образом, достичь более значимого сравнения этих двух последовательностей. Процентная идентичность может быть измерена для всей длины целой определенной полинуклеотидной последовательности или может быть измерена для меньшей длины, например для длины фрагмента, взятого из большей определенной последовательности, к примеру, фрагмент по меньшей мере 45, по меньшей мере 60, по меньшей мере 90, по меньшей мере 120, по меньшей мере 150, по меньшей мере 210 или по меньшей мере 450 последовательных остатков. Такие величины длины представлены исключительно для примера и понятно, что любая длина фрагмента подкреплена последовательностями, представленными в данном тексте, в таблицах, фигурах или перечне последовательностей, они могут использоваться для описания длины, для которой может измеряться процент идентичности. Процент идентичности последовательности рассчитывается сравнением двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определяющем количество совпавших положений (в котором идентичные остатки встречаются в обеих полипептидных последовательностях), разделяя количество совпавших положений на общее количество положений в окне сравнения (т.е. в размере окна) и умножая результат на 100, что в результате дает значение процента идентичности производительности. Когда необходимо сравнить последовательности различной длины, то меньшая последовательность определяет окно сравнения. При расчете идентичности последовательности консервативные замены не учитываются.

"Процент (%) идентичности последовательности" применительно к полипептидным последовательностям, представленным в данном тексте, определен как процент аминокислотных остатков в запрашиваемой последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам второй референсной полипептидной последовательности или ее части после выравнивания последовательностей с внесенными вставками, если необходимо для достижения максимального процента идентичности внесения и, не учитывая какие-либо консервативные замены в качестве части идентичности последовательности, при этом приводя в результате к получению оптимального выравнивания. Выравнивание, проводимое с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности, может быть проведено различными способами, которые определены специальными знаниями, к примеру, используя общедоступные компьютерные программы, такие как BLAST, BLAST-2, ALIGN, или программное обеспечение Megalign (DNASTAR). Специалисты в этой области знаний могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, требуемые для достижения оптимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Процентная идентичность может быть измерена для всей длины целой определенной полипептидной последовательности или может быть измерена для меньшей длины, например для длины фрагмента, взятого из большей определенной полипептидной последовательности, к примеру, фрагмент по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 150 последовательных остатков. Такие величины длины представлены исключительно для примера и понятно, что любая длина фрагмента подкреплена последовательностями, представленными в данном тексте, в таблицах, фигурах или перечне последовательностей, они могут использоваться для описания длины, для которой может измеряться процент идентичности.

"Повторяемость", используемая в контексте полинуклеотидных последовательностей, относится к

степени внутренней гомологичности таких последовательностей, как, например, частота идентичных нуклеотидных последовательностей данной длины. Повторяемость может, например, быть измерена анализом частоты встречаемости идентичных последовательностей. "Вектор" - это молекула нуклеиновой кислоты, преимущественно самореплицирующаяся в подходящем хозяине, которая переносит внедренную молекулу нуклеиновой кислоты в/или между клетками-хозяев. Этот термин включает внедрение векторов, которое главным образом обеспечивает функцию внедрения ДНК или РНК в клетку, репликацию векторов, которая главным образом обеспечивает функцию репликации ДНК или РНК и экспрессию векторов, которая главным образом обеспечивает функции транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также термином охвачены векторы, которые обеспечивают поддержание более одной из вышеперечисленных функций. "Вектор экспрессии" - это полинуклеотид, который после введения в подходящую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид(ы). "Система экспрессии" обычно подразумевает подходящую клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии, который может функционировать, синтезируя желаемый продукт экспрессии.

"Устойчивость к деградации в сыворотке", применительно к полипептиду, относится к способности полипептидов противостоять деградации в крови или в ее компонентах, которые как правило содержат протеазы в сыворотке или плазме. Устойчивость к деградации в сыворотке может измеряться соединением данного белка с сывороткой или плазмой человека (или мыши, крысы, обезьяны, если необходимо), обычно в течение нескольких дней (например, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 дней), обычно при температуре около 37°C. Образцы этих временных точек могут анализироваться методом вестерн-блоттинга, а белок определяться с помощью антитела. Это антитело может быть маркером белка. Если для белка обнаруживается одна полоса в вестерн-анализе, при этом размер белка идентичен размеру введенного белка, то деградация не происходит. В этом приведенном в качестве примера методе временная точка, в которой, по результатам вестерн-блоттинга или эквивалентных методик, деградировало 50% белка, является периодом деградации данного белка в сыворотке или "периодом нахождения в сыворотке". Термины " $t_{1/2}$ ", "период", "конечный период", "период полувыведения" и "период циркуляции" взаимозаменяемо используются в данном тексте и применимо к данной заявке обозначают конечный период, рассчитываемый как  $\ln(2)/K_{el}$ .  $K_{el}$  - константа конечной скорости элиминации, рассчитываемая с помощью линейной регрессии по конечному линейному участку кривой логарифмическая концентрация - время. Период обычно относится к времени, требуемому для того, чтобы половина назначенного количества вещества, внесенного в живой организм, метаболизировалась или элиминировалась в результате естественных биологических процессов. "Активный клиренс" обозначает механизмы, с помощью которых белок удаляется из русла циркуляции, отличные от фильтрации и которые включают удаление из русла циркуляции, опосредованное клетками, рецепторами, метаболизмом или деградацией белка. "Коэффициент кажущейся молекулярной массы" и "кажущаяся молекулярная масса" - связанные термины, относящиеся к измерению относительного увеличения или уменьшения кажущейся молекулярной массы, определяемой индивидуальной аминокислотной или полипептидной последовательностью. Кажущаяся молекулярная масса определяется с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ) или подобными методами, сравнением со стандартами глобулярных белков, и измеряется в единицах "кажущихся кДа". Коэффициент кажущейся молекулярной массы - это соотношение между кажущейся молекулярной массой и действительной молекулярной массой. Последняя вычисляется сложением на основании аминокислотного состава, рассчитанной молекулярной массы каждого типа аминокислот в составе или оценкой при сравнении стандартов молекулярной массы в геле для электрофореза с SDS. Определение кажущейся молекулярной массы и коэффициента кажущейся молекулярной массы для представленных белков описано в примерах.

Термины "гидродинамический радиус" или "радиус Стокса" касаются эффективного радиуса ( $R_h$  в нм) молекулы в растворе, измеренного при предположении, что объект движется через раствор и испытывает сопротивление из-за вязкости раствора. При вариантах осуществления данного изобретения измерения гидродинамических радиусов ХТЕН-полипептидов коррелирует с "коэффициентом кажущейся молекулярной массы", который является более наглядным показателем. "Гидродинамический радиус" белка влияет на скорость его диффузии в водном растворе, а также на его способности мигрировать в макромолекулярных гелях. Гидродинамический радиус белка определяется его молекулярной массой, а также его структурой, включающей форму и компактность. Методы определения гидродинамических радиусов хорошо известны в этой области знаний, такие как методы с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ), описанные в патентах США №№ 6406632 и 7294513. Большинство белков имеет глобулярную структуру, которая является наиболее компактной трехмерной структурой, которой может обладать белок с наименьшим гидродинамическим радиусом. Некоторые белки принимают случайную и открытую неструктурированную или "линейную" конформацию, что в результате приводит к получению намного большего гидродинамического радиуса по сравнению с типичными глобулярными белками сходной молекулярной массы.

"Физиологические условия" относятся к набору условий в живом хозяине, а также в условиях *in vitro*, включающем температуру, концентрацию солей, pH, которые имитируют условия живого субъекта. Для использования при анализах в условиях *in vitro* были установлены соответствующие физиологиче-

ские условия. Как правило, физиологический буферный раствор содержит физиологическую концентрацию солей и pH, скорректированное до нейтрального, в диапазоне от около 6,5 до около 7,8 и предпочтительно от около 7,0 до около 7,5. Разнообразные физиологические буферные растворы перечислены в книге Sambrook et al. (2001). Диапазоны температур, соответствующие физиологическим условиям, находятся в пределах от около 25 до около 38°C и предпочтительно от около 35 до около 37°C.

"Одноатомный остаток нагрузочного полипептида" обозначает нагрузочного полипептида, который химически связан с XTEN после прохождения реакции с испытуемым XTEN или с XTEN-линкерными композициями, обычно это атом серы, кислорода, азота или углерода. Например, атомный остаток нагрузочного вещества может быть серосодержащим остатком цистеин-триоловой реакционноспособной группы нагрузочного полипептида, азотсодержащая молекула реакционноспособной аминокислотной группы пептида или полипептида или небольшой молекулы нагрузочного вещества, углерод- или кислородсодержащим остатком или реакционноспособной карбоксильной или альдегидной группой пептида, белка или небольшой молекулы или синтетическим органическим лекарственным веществом.

"Реакционноспособная группа" - это химическое соединение, которое может связываться со второй реакционноспособной группой. Примерами реакционноспособных групп являются аминокислотные группы, карбоксильные группы, сульфгидрильные группы, гидроксильные группы, альдегидные группы и азидные группы. Некоторые реакционноспособные группы для облегчения конъюгации со второй реакционноспособной группой могут быть активированы непосредственно или через перекрестный линкер. Как используется в данном тексте, реакционноспособная группа может быть частью молекулы XTEN, кросс-линкером, азидных/алкиновым реагентом клик-химии или нагрузочным веществом, при условии, что оно обладает способностью принимать участие в химической реакции. После завершения реакции конъюгационное взаимодействие связывает остатки нагрузочного вещества, кросс-линкера или веществ, реагирующих с полипептидами XTEN.

"Агент контролируемого высвобождения", "агент медленного высвобождения", "образование депо" и "агент замедленного высвобождения" используются взаимозаменяемо в отношении агента, способного продлевать длительность высвобождения полипептида данного изобретения относительно длительности высвобождения полипептида, назначаемого в отсутствие этого агента. Разные варианты осуществления настоящего изобретения могут иметь разные скорости высвобождения, приводящие к применению разных терапевтических дозировок. Термин "нагрузочное вещество" используется в данном тексте относительно любого белка, пептидной последовательности, небольшой молекулы, лекарственного вещества или композиции веществ, которые обладают биологической, фармакологической или терапевтической активностью или благоприятным действием при назначении пациенту или при демонстрации в условиях *in vitro*. Нагрузочное вещество также включает молекулу, которая может быть использована для визуализации при диагностических исследованиях *in vivo*. Примеры нагрузочного вещества включают, но не ограничиваются, веществами: цитокинами, ферментами, гормонами, факторами свертывания крови и ростовыми факторами, химиотерапевтическими агентами, противовирусными веществами, токсинами, противораковыми лекарственными веществами, радиоактивными веществами и контрастирующими агентами, а также пептидами-мишенями, белками, антителами, фрагментами антител или веществами, используемыми для связывания рецепторов или лигандов.

Термины "антиген", "антиген-мишень" и "иммуноген" используются в данном тексте взаимозаменяемо в отношении такой структуры или детерминанта связывания, что фрагмент антител или лекарственное средство на основе фрагментов антител обеспечивает с ним связывание или специфично к нему.

Термин "антагонист", как используется в данном тексте, включает любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида, раскрываемого в данном тексте. Методы идентификации антагонистов могут включать контакт нативного полипептида с молекулой вероятным антагонистом и измерение выявляемого изменения одного или более видов биологической активности, обычно связанной с данным нативным полипептидом. В контексте настоящего изобретения антагонисты могут включать белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, антитела или какие-либо другие молекулы, которые снижают действие биологически активного полипептида. "Среда определенного состава" относится к среде, отвечающей питательным и гормональным требованиям, необходимым для выживания и/или роста клеток в культуре, таким что компоненты данной среды являются известными. По традиции, среда определенного состава разрабатывается добавлением питательных и ростовых факторов, необходимых для роста и/или выживания. Как правило, среда определенного состава обеспечивает содержание по меньшей мере одного или более компонентов из следующих категорий: а) все незаменимые аминокислоты и обычно основной набор двадцати аминокислот плюс цистеин; б) источник энергии обычно в форме такого углевода, как глюкоза; в) витаминов и/или других органических веществ, требуемых в низких концентрациях; г) свободные жирные кислоты; е) микроэлементы, при этом микроэлементы определяются как неорганические вещества или встречающиеся в природе элементы, которые, как правило, требуются в очень низких концентрациях, обычно микромолярного диапазона содержания. Среда определенного состава может также дополнительно содержать один или большее количество компонентов из следующих категорий: а) один или большее количество митогенных агентов; б) соли и буферные вещества, как, например, кальция, магния

и фосфатов; с) нуклеозиды и азотистые основания, например, такие как аденозин и тимидин, гипоксантин, и d) белок и гидролизаты тканей.

Термин "антагонист" используется в широком контексте и включает любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида, раскрываемого в данном тексте. Подходящие молекулы-агонисты, в частности, включают антитела-агонисты или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотных последовательностей нативных полипептидов, небольших органических молекул и т.д. Методы идентификации агонистов могут включать контакт нативного полипептида с молекулой вероятным агонистом и измерение выявляемого изменения одного или более видов биологической активности, обыкновенно связанной с данным нативным полипептидом.

"Константа ингибирования" или "K<sub>i</sub>" используются взаимозаменяемо и обозначают константу диссоциации фермент-ингибиторного комплекса или обратную величину аффинности связывания ингибитора с ферментом.

Как используется в данном тексте, понятия "лечение", или "получение лечения", или "ослабление симптомов", или "улучшение состояния" используются взаимозаменяемо и обозначают назначение лекарства или биологического препарата с целью достижения терапевтической пользы, для устранения или снижения тяжести существующего болезненного состояния или достижения профилактической пользы, предупреждения или снижения вероятности проявления или тяжести возникновения болезненного состояния. По терапевтической пользе определяют ликвидацию или улучшение причины, которая подлежит лечению, или один или большее количество физиологических симптомов, связанных с причиной, при которых у субъекта наблюдается улучшение, несмотря на то, что субъект все еще может находиться под влиянием причины заболевания.

"Терапевтическое действие" или "терапевтическая польза", как используется в данном тексте, относится к физиологическому действию, включающему, не ограничиваясь, смягчение, ослабление или предупреждение заболевания у людей и животных или иное улучшение физического или ментального благополучия людей или животных, получаемого в результате назначения полипептида этого изобретения, отличного от возможности индуцирования образования антител против антигенного эпитопа, который несет биологически активный белок. Для профилактической пользы эти композиции могут назначаться субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома заболевания (например, кровотечение у субъекта с диагностированной гемофилией А) или субъекту с жалобой на один или большее количество физиологических симптомов заболевания даже в том случае, когда не мог быть поставлен диагноз этого заболевания.

Термины "терапевтически эффективная дозировка" и "терапевтически эффективная доза", как используется в данном тексте, относится к количеству лекарственного вещества или биологически активного белка, самого по себе или как части полипептидной композиции, которая обеспечивает получение какого-либо обнаруживаемого полезного действия на какой-либо симптом, аспект, измеряемый параметр или особенности свойства или состояния болезни после назначения субъекту одной или повторных доз. Для проявления пользы такой эффект не должен быть окончательным. Определение терапевтически эффективной дозировки полностью находится в пределах квалификации специалистов в этой области, особенно в свете подробного раскрытия информации, представленного в данном документе.

Термин "режим терапевтически эффективного дозирования", как используется в данном тексте, относится к графику последовательного многократного приема доз (т.е. по меньшей мере двух и более) биологически активного белка, самого по себе или как части полипептидной композиции, при котором дозы применяются при терапевтически эффективных дозировках, в результате приводящем к устойчивому благоприятному действию на какой-либо симптом, аспект, измеряемый параметр или особенности свойства или состояния болезни.

#### 1). Общие методики.

Применение на практике настоящего изобретения вовлекает, если не указано иное, общепринятые методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, геномики и методов рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах возможностей специалиста в этой области. См. публикацию Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3<sup>rd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; "Current protocols in molecular biology", F.M. Ausubel, et al. eds., 1987; the series "Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA.; "PCR 2: a practical approach", M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., Oxford University Press, 1995; "Antibodies, a laboratory manual" Harlow, E. and Lane, D. eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 11<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill, 2005; и Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", 4<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000 содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Клетки-хозяева могут культивироваться в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дюльбекко среда Игла (DMEM, Sigma) пригодны для культивирования эукариотических клеток. Кроме того, клетки животных могут выращиваться на среде определенного состава без сыворотки, но с добавлением гормонов, ростовых факторов и других факторов, необходимых для выживания

и/или роста определенного типа клеток. Поскольку среда определенного состава, поддерживая выживание клеток, обеспечивает способность к размножению, морфологию, способность к обмену веществ и, потенциально, способность клеток дифференцироваться, среда определенного состава, стимулируя рост клеток, обеспечивает всеми химическими веществами, необходимыми для пролиферации и размножения клеток. Основные параметры, регулирующие выживание и рост клеток млекопитающих в условиях *in vitro*, хорошо обоснованы в этой области знаний. Физико-химические параметры, которые могут контролироваться в разных системах клеточных культур, являются, к примеру: pH,  $pO_2$ , температура и осмолярность. Требования к питанию клеток обычно обеспечиваются стандартными составами сред, разработанными для обеспечения оптимального окружения клеток. Питательные вещества могут быть разделены на несколько категорий: аминокислоты и их производные, углеводы, сахара, жирные кислоты, сложные липиды, производные нуклеиновых кислот и витамины. Кроме питательных веществ для поддержания клеточного метаболизма большинство клеток также нуждается в одном или большем количестве гормонов по меньшей мере из одной из следующих групп: стероиды, простагландины, факторы роста, гипофизарные гормоны и пептидные гормоны для обеспечения пролиферации в среде без сыворотки (Sato, G.H., et al. в "Growth of Cells in Hormonally Defined Media", Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982). Помимо гормонов клеткам может требоваться транспортные белки, такие как трансферин (белок транспорта железа в плазме), церулоплазмин (белок транспорта меди) и липопротеины высокой плотности (переносчик липидов) для выживания и роста в условиях *in vitro*. Этот набор оптимальных гормонов и транспортных белков будет варьировать в зависимости от типа клеток. Большинство из этих гормонов или транспортных белков добавляются извне или, в редких случаях, найдены мутантные клеточные линии, которые не требуют определенного фактора. Специалист в этой области должен знать о других факторах, требуемых для поддержания культуры клеток без проведения дополнительного эксперимента.

Питательная среда для выращивания прокариотических клеток-хозяев включает питательные бульоны (жидкая питательная среда) или среду ЛБ (Лурия-Бертани). Подходящая среда включает среду определенного и неопределенного составов. Как правило, среда содержит источник углерода, такой как глюкоза, необходимый для роста бактерий, воду и соли. Среда также может содержать источник аминокислот и азота, например экстракт говяжьего мяса или дрожжей (в среде неопределенного состава) или определенные количества аминокислот (в среде определенного состава). В некоторых осуществлениях изобретения питательная среда является бульоном ЛБ, например бульон ЛБ Миллера или ЛБ бульон Леннокса. Бульон ЛБ содержит пептон (продукт ферментативного расщепления казеина), экстракт дрожжей и хлорид натрия. В некоторых осуществлениях изобретения используется селективная среда, которая содержит антибиотик. В этой среде будут расти только требуемые клетки, обладающие устойчивостью к данному антибиотику.

II). Белковый полимер ХТЕН и конъюгационные композиции.

Настоящее изобретение частично относится к в основном гомогенным композициям, содержащим расширенные рекомбинантные полипептиды (ХТЕН). В первом аспекте данного изобретения предложены ХТЕН-композиции, которые в основном гомогенны по длине молекул. Такие композиции пригодны как реагирующие конъюгационные участники для получения промежуточных веществ ХТЕН-кросс-линкер и композиций ХТЕН-нагрузочное вещество. Кроме того, объектом настоящего изобретения является предоставление способов получения в основном гомогенных ХТЕН-композиций. Настоящее изобретение также представляет способы получения таких в основном гомогенных ХТЕН-композиций с высоким выходом. Во втором аспекте данное изобретение предлагает полипептид ХТЕН. Например, полипептиды ХТЕН способны связываться с одним или более участниками конъюгации - нагрузочных веществ, приводя к получению конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество, которые специально сконструированы для включения определенного количества реакционноспособных аминокислот для присоединения к нагрузочным веществам непосредственно, через кросс-линкеры или азидные/алкиновые реактанты. Настоящее изобретение также предлагает способы получения таких сконструированных полимеров ХТЕН, которые используются в получении конъюгатов с интересующими нагрузочными агентами в виде композиций с расширенными фармацевтическими свойствами, включающими расширенные фармакокинетические и фармакологические свойства, а также пониженную токсичность.

В другом аспекте в данном изобретении предложены в основном гомогенные ХТЕН-полимеры, состоящие из определенных количеств кросс-линкеров или азидных/алкиновых реактантов в виде реагирующих участников конъюгации в мономерных и мультимерных конъюгациях и методы получения таких реактантов. ХТЕН-производные, содержащие кросс-линкеры или азидных/алкиновых реактантов, используются как реактанты для конъюгации с агентами нагрузочных веществ для получения конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество, проявляющего требуемые физические, фармацевтические и фармакологические свойства. В другом аспекте в данном изобретении предложены композиции ХТЕН-нагрузочное вещество, в которых один или больше полипептидов ХТЕН химически присоединены к одному или большему количеству нагрузочных веществ, включая комбинации различных нагрузочных веществ, в определенных количествах в мономерных или мультимерных конфигурациях для образования композиций с расширенными фармацевтическими, фармакокинетическими и фармакологическими свойствами. Эти композиции, присоединенные к таким нагрузочным веществам, могут применяться при назначении



пациенту для предупреждения, лечения или облегчения течения заболеваний или болезненных состояний, благодаря фармакологическому или биологическому действию нагрузочного вещества.

#### 1. ХТЕН: расширенные рекомбинантные полипептиды.

В одном аспекте в данном изобретении предложены композиции в основном гомогенных полипептидов ХТЕН, которые используются как участники конъюгации для присоединения к одному или большому количеству нагрузочных веществ непосредственно или через кросс-линкер реактанта, обеспечивая получение конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество. ХТЕН - полипептиды с не встречающимися в природе в основном неповторяющимися последовательностями, обладающими низкой степенью структурирования или без вторичной или четвертичной структуры в физиологических условиях. Обычно полипептид ХТЕН содержит от около 36 до около 3000 аминокислот, из которых большинство или полностью все являются небольшими гидрофильными аминокислотами. Как используется в данном документе, в полипептиде "ХТЕН" специально исключены целые антитела или фрагменты антител (например, одноцепочечное антитело или Fc-фрагмент). Полипептиды ХТЕН применяются как участники конъюгации в том, что они служат в различных ролях, обеспечивающих требуемые свойства при присоединении к нагрузочному веществу. Получаемые конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество обладают расширенными свойствами, такими как расширенные фармакокинетические, физико-химические, фармакологические и фармацевтические свойства по сравнению с соответствующим нагрузочным веществом, не связанным с полипептидом ХТЕН, что делает их полезными при лечении определенных состояний, в которых, как известно в этой области, это нагрузочное вещество используется.

Неструктурированные характеристики и физико-химические свойства ХТЕН частично получаются из всего набора аминокислот, которые непропорционально ограничены 4-6 типами гидрофильных аминокислот, связывания аминокислот в количественно определяемую конструкцию без повторений и длины полипептида ХТЕН. Преимущественной чертой, обычной для полипептида ХТЕН, но не обычной для природных полипептидов, является то, что свойства ХТЕН, раскрываемые в данном тексте, не связаны с основными первичными аминокислотными последовательностями, как свидетельствует разнообразие примерных последовательностей табл. 2, что во многом из варьирования диапазонов длины, обладания подобных свойств задокументировано в примерах. Поэтому полипептид ХТЕН обладает свойствами больше сходными с небелковыми гидрофильными полимерами, чем свойствами, присущими белкам. Полипептид ХТЕН настоящего изобретения выявляет одно или большее количество следующих преимущественных свойств: конформационная гибкость, снижение образования или отсутствие вторичной структуры, высокая степень растворимости в воде, высокая степень устойчивости к протеазам, низкая иммуногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающих, определенная степень заряда и увеличенные гидродинамические (или стоковские) радиусы; свойства, которые сходны со свойствами определенных гидрофильных полимеров (например, полиэтиленгликоль), что делает их особенно полезными в качестве участников конъюгации. Компонент(ы) ХТЕН представленных конъюгатов сконструированы для их поведения в физиологических условиях как денатурированные пептидные последовательности, несмотря на увеличенную длину этого полимера. Термин "денатурированный" описывает состояние пептида в растворе, которое характеризуется большой конформационной свободой пептидного остатка. Большинство пептидов или белков принимают денатурированные конформации в присутствии высоких концентраций денатурирующих веществ или повышенной температуры. Пептиды в денатурированной конформации обладают, например, характерными спектрами кругового дихроизма (КД) и характеризуются отсутствием дальнедействующих взаимодействий, определяемых методом ЯМР. Термины "денатурированная конформация" и "неструктурированная конформация" используются в данном тексте как синонимы. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены ХТЕН-последовательности, которые в физиологических условиях напоминают денатурированные последовательности, которые преимущественно лишены вторичной структуры. В других случаях ХТЕН-последовательности в основном лишены вторичной структуры в физиологических условиях. Термин "преимущественно лишен", как используется в этом контексте, обозначает, что менее чем 50% аминокислотных остатков ХТЕН с последовательностью ХТЕН вносят вклад в создание вторичной структуры, что измерено или определено методами, описанными в данном тексте. Термин "в основном лишен", как используется в этом контексте, обозначает, что по меньшей мере около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%, или около 95%, или около 97%, или около 99% аминокислотных остатков ХТЕН с последовательностью ХТЕН не вносят вклад в создание вторичной структуры, что измерено или определено методами, описанными в данном тексте.

В этой области знаний известны методы и анализы для определения физико-химических свойств представленного полипептида ХТЕН. Такие свойства включают, помимо прочего, вторичную или третичную структуру, растворимость, агрегацию белков, стабильность, действительную и кажущуюся молекулярную массу, чистоту и однородность, свойства плавления, загрязнение и содержание воды. Методы измерения таких свойств включают аналитическое центрифугирование, ЭПР, ионнообменную ВЭЖХ, эксклюзионную хроматографию (ЭХ) ВЭЖХ, ВЭЖХ с обращенными фазами, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресценция, ионнообменную ВЭЖХ, эксклюзионную ВЭЖХ, ИК-, ЯМР-, Раман-спектроскопию, рефрактометрию и

спектроскопию в УФ/видимом свете. В частности, вторичная структура может быть определена спектрофотометрически, например спектроскопией кругового дихроизма в "дальней УФ" спектральной области (190-250 нм). Элементы вторичной структуры, такие как  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -слой, каждый дает повышение характерной формы и интенсивности КД-спектров, так же как и отсутствие этих структурных элементов. Вторичная структура также может быть рассчитана для полипептидной последовательности с помощью компьютерных программ или алгоритмов, таких как хорошо известный алгоритм Чоу-Фасмана (Chou, P.Y., et al. (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) и алгоритм Гарниера-Осгуторпа-Робсона ("GOR-алгоритм") (Gamier J., Gibrat J.F., Robson B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 266:540-553), как описано в публикации заявки на патент США № 20030228309 A1. Для данной последовательности эти алгоритмы могут предсказывать существуют ли определенные вторичные структуры или их нет совсем, что выражается как общее количество и/или процентное содержание остатков последовательности, которая образует, к примеру,  $\alpha$ -спирали или  $\beta$ -слои, или процентное содержание остатков последовательности рассчитывается для получения вероятности образования статистического клубка (в котором отсутствует вторичная структура). Полипептидные последовательности могут быть проанализированы с применением алгоритма Чоу-Фасмана использованием сайтов из интернета, например, [fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_www.cgi?rm=misc1](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1) и GOR-алгоритм на сайте [npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) (доступ к обоим сайтам получен 5 сентября 2012 г.). Дополнительные методы раскрыты в публикации Arnau et al., *Prot Expr and Purif* (2006) 48, 1-13.

В одном варианте осуществления последовательности XTEN, используемые в предлагаемых конъюгатах, обладают процентным содержанием  $\alpha$ -спирали в диапазоне от 0 до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана. В другом варианте осуществления последовательности XTEN обладают процентным содержанием  $\beta$ -слоя в диапазоне от 0 до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана. В одном варианте осуществления последовательности XTEN-конъюгатов обладают процентным содержанием  $\alpha$ -спирали в диапазоне от 0 до меньше чем около 5% и процентным содержанием  $\beta$ -слоя в диапазоне от 0 до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана. В одном варианте осуществления последовательности XTEN конъюгатов обладают процентным содержанием  $\alpha$ -спирали меньше чем около 2% и процентным содержанием  $\beta$ -слоя меньше чем около 2%. XTEN-последовательности конъюгационных композиций имеют высокую степень процентного содержания статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В некоторых вариантах осуществления изобретения XTEN-последовательность обладает по меньшей мере около 80%, преимущественно по меньшей мере около 90%, преимущественно по меньшей мере около 91%, преимущественно по меньшей мере около 92%, преимущественно по меньшей мере около 93%, преимущественно по меньшей мере около 94%, преимущественно по меньшей мере около 95%, преимущественно по меньшей мере около 96%, преимущественно по меньшей мере около 97%, преимущественно по меньшей мере около 98% и наиболее преимущественно по меньшей мере около 99% статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В одном варианте осуществления XTEN-последовательностей конъюгационных композиций обладают процентным содержанием  $\alpha$ -спирали в диапазоне от 0 до меньше чем около 5% и процентным содержанием  $\beta$ -слоя в диапазоне от 0 до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана и по меньшей мере около 90% статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В другом варианте осуществления XTEN-последовательностей раскрытых композиций обладают процентным содержанием  $\alpha$ -спирали меньше чем около 2% и процентным содержанием  $\beta$ -слоя меньше чем около 2% при по меньшей мере около 90% статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В другом варианте XTEN-последовательностей этих композиций в них в основном отсутствует вторичная структура при измерении методом кругового дихроизма.

Выбор критериев для присоединения полипептида XTEN к нагрузочному веществу, используемых для получения конъюгационных композиций, обычно относится к атрибутам физико-химических свойств и конформационной структуры полипептида XTEN, который, в свою очередь, используется для сообщения этим композициям расширенных фармацевтических, фармакологических и фармакокинетических свойств.

#### 1. Неповторяющиеся последовательности.

Специально предусмотрено, что предложенные XTEN-последовательности, включающие предлагаемые варианты осуществления конъюгационных композиций, в основном не содержат повторов. В общем, повторяющиеся аминокислотные последовательности имеют склонность к агрегации или образованию структур высшего порядка, примерами которых являются природные последовательности с повторениями, такие как коллагены и лейциновые застезки. Эти повторяющиеся аминокислоты также могут стремиться к образованию контактов, которые приводят к формированию кристаллических или псевдокристаллических структур. В противоположность этому низкая склонность не повторяющихся последовательностей к агрегации дает возможность разрабатывать полипептиды XTEN с длинными последовательностями с относительно низкой частотой встречаемости заряженных аминокислот, которые, наоборот, с большей вероятностью агрегировали, если бы эти последовательности были повторяющиеся. Не-

повторяющиеся предлагаемые последовательности ХТЕН могут обнаруживаться оценкой одной или большого количества следующих особенностей. В одном осуществлении в основном неповторяющаяся ХТЕН-последовательность не имеет трех последовательных аминокислот в последовательности, которые являются аминокислотами идентичных типов, если только аминокислота не серин, в таком случае не более трех последовательных аминокислот являются сериновыми остатками. В другом осуществлении, описанном подробнее внизу, в основном неповторяющаяся ХТЕН-последовательность, в которой 80-99% этой последовательности содержит мотивы из от 9 до 14 аминокислотных остатков, при этом данные мотивы состоят из 3, 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбираемых из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), и при этом последовательность любых двух последовательных аминокислотных остатков в каком-либо мотиве не повторяется более двух раз в мотиве последовательности.

Степень повторяемости полипептида или гена может измеряться с помощью компьютерных программ или алгоритмов или с помощью других средств, известных в этой области знаний. Согласно данному изобретению алгоритмы должны использоваться для расчета степени повторяемости отдельных полипептидов, таких как ХТЕН, раскрываемых в данном тексте и представленных в виде примеров последовательностей, проанализированных с помощью алгоритмов (см. примеры ниже). В одном осуществлении повторяемость полипептида определенной длины может рассчитываться (в дальнейшем "число подпоследовательностей") согласно формулы, отраженной в уравнении I

$$\text{Число подпоследовательностей} = \frac{\sum_{i=1}^m \text{Count}_i}{m} \quad \text{I}$$

где  $m = (\text{количество аминокислот полипептида}) - (\text{количество аминокислот подпоследовательности}) + 1$ ;  
и

$\text{Count}_i$  (счетчик  $i$ ) = совокупное количество каждой уникальной подпоследовательности в пределах последовательности.

Алгоритм, названный "SegScore", был разработан для применения вышеуказанного уравнения для количественного учета повторяемости полипептидов, таких как ХТЕН, обеспечивая получение числа подпоследовательностей, при этом подпоследовательности из определенного количества аминокислот "n" анализируются на повторяемость вычислением количества раз ("счетчик") встречаемости на установленной длине последовательности уникальной подпоследовательности длиной "s", деленной на общее число подпоследовательностей в пределах определенной длины последовательности. Фиг. 79 описывает логическую блок-схему алгоритма SegScore, в то время как фиг. 80 изображает схему того, как значение числа подпоследовательностей получается из воображаемого пептида ХТЕН из 11 аминокислот и длиной подпоследовательности в 3 аминокислотных остатка. Например, определенный полипептид длиной 200 аминокислотных остатков несет 192 перекрывающиеся подпоследовательности из 9 аминокислот и 198 3-мерных подпоследовательностей, но это число подпоследовательностей любого полипептида будет зависеть от общего числа уникальных подпоследовательностей и частоты встречаемости каждой уникальной подпоследовательности (в значении разных аминокислотных последовательностей) на определенной длине этой последовательности.

В контексте настоящего изобретения "число подпоследовательностей" обозначает сумму значений встречаемости каждого уникального 3-мерного блока среди 200 последовательных аминокислот из общего полипептида ХТЕН, разделенную на общее число уникальных 3-мерных подпоследовательностей в пределах последовательности из 200 аминокислот. Примеры таких чисел подпоследовательностей, полученных для полипептидов с повторениями и без повторений из 200 последовательных аминокислот, представлены в примере 45. В одном осуществлении в данном изобретении предложены полипептиды ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащие один полипептид ХТЕН, в котором последовательность ХТЕН имеет число подпоследовательностей меньше 12, предпочтительно меньше 10, предпочтительно меньше 9, предпочтительно меньше 8, предпочтительно меньше 7, предпочтительно меньше 6 и наиболее предпочтительно меньше 5. В другом осуществлении в данном изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-кросс-линкер, содержащие полипептид ХТЕН, в котором последовательность ХТЕН имеет число подпоследовательностей меньше 10, предпочтительно меньше 9, предпочтительно меньше 8, предпочтительно меньше 7, предпочтительно меньше 6 и наиболее предпочтительно меньше 5. В другом осуществлении в данном изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-соединений клик-химии, содержащие полипептид ХТЕН, в котором последовательность ХТЕН имеет число подпоследовательностей меньше 10, предпочтительно меньше 9, предпочтительно меньше 8, предпочтительно меньше 7, предпочтительно меньше 6 и наиболее предпочтительно меньше 5. В еще одном осуществлении в данном изобретении предложены конъюгационные композиции полипептидов ХТЕН, содержащие по меньшей мере два соединенных полипептида ХТЕН, в которых каждая индивидуальная подпоследовательность ХТЕН имеет число подпоследовательностей меньше 10, или меньше 9, или меньше 8, или меньше 7, или меньше 6, или меньше 5, или меньше. В еще одном осуществлении в данном изобретении предложены конъюгационные композиции полипептидов ХТЕН, содержащие по меньшей мере три соединенных полипептида ХТЕН, в которых каждая индивидуальная подпоследовательность ХТЕН имеет число подпоследователь-

ностей меньше 10, или меньше 9, или меньше 8, или меньше 7, или меньше 6, или меньше 5, или меньше. В этих описанных в данном тексте композициях ХТЕН последовательность ХТЕН с числом подпоследовательностей, равном 10 или меньше (например, 9, 8, 7 и т.д.), характеризуется как в основном неповторяющаяся.

В одном аспекте особенностью неповторяющихся последовательностей ХТЕН настоящего изобретения вместе с особыми типами аминокислот, которые доминируют в полипептидах ХТЕН, более чем полная первичная последовательность обеспечивает одну или большее количество расширенных физико-химических и биологических свойств полипептидов ХТЕН и приводит к получению конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество. Эти расширенные свойства включают большую степень экспрессии белка ХТЕН в клетке-хозяине, большую генетическую стабильность гена, кодирующего белок ХТЕН, большую растворимость, меньшую тенденцию к агрегации и расширенные фармакокинетические свойства полученного конъюгата по сравнению с нагрузочными веществами, неприсоединенными к белку ХТЕН, или нагрузочным веществам, присоединенным к белкам с повторяющимися последовательностями. Эти расширенные свойства позволяют проводить более рентабельное производство, большую однородность конечного продукта, сниженную цену продукции и/или облегчение составления рецептуры, ХТЕН-содержащих фармацевтических препаратов, включающих очень высокие концентрации белка, в некоторых случаях превышающих 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления полипептидные последовательности ХТЕН-конъюгатов сконструированы для обеспечения низкой степени внутренней повторяемости для того, чтобы снизить или в основном исключить иммуногенность при введении млекопитающим. Полипептидные последовательности составляют из коротких, повторяющихся мотивов, преимущественно ограниченных только тремя аминокислотами, такими как глицин, серин и глутаминовая кислота, что может привести к относительно высоким титрам антител при введении млекопитающим, несмотря на отсутствие рассчитанных эпитопов Т-клеток в этих последовательностях. Такой эффект может быть обусловлен природой повторений в полипептидах, так как было показано, что иммуногены с повторяющимися эпитопами, включая белковые агрегаты, перекрестно связанные иммуногены и повторяющиеся углеводы являются высоко иммуногенными и могут, к примеру, привести к перекрестному связыванию рецепторов В-клеток, это приводит к активации В-клеток. (Johansson, J., et al. (2007) *Vaccine*, 25 :1676-82; Yankai, Z., et al. (2006) *Biochem Biophys Res Commun*, 345 :1365-71; Hsu, C.T., et al. (2000) *Cancer Res*, 60:3701-5; Bachmann M.F., et al. *Eur. J. Immunol.* (1995) 25(12):3445-3451).

## 2. Типичные мотивы последовательностей.

Настоящее изобретение охватывает полипептиды ХТЕН, используемые как участники конъюгации, которые содержат многочисленные блоки меньших последовательностей или мотивов, в которых аминокислотные последовательности этих мотивов в основном неповторяющиеся. Свойство последовательности без повторений может достигаться даже при использовании подхода "строительных блоков" с применением библиотеки мотивов последовательностей, которые мультимеризуются для получения ХТЕН-последовательностей, как показано на фиг. 18-19. Хотя ХТЕН-последовательность может состоять из многих блоков по крайней мере четырех разных типов мотивов последовательностей, так как эти мотивы сами по себе обычно состоят из неповторяющихся аминокислотных последовательностей, вся ХТЕН-последовательность сконструирована для получения в основном неповторяющейся последовательности.

В одном варианте осуществления полипептид ХТЕН обладает неповторяющейся последовательностью большей чем от около 36 до около 3000, или от около 100 до около 2000, или от около 144 до около 1000 аминокислотных остатков, при этом по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99%, или около 100% ХТЕН-последовательностей содержат неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых каждый из мотивов несет около 9-36 аминокислотных остатков. Как используется в данном тексте, термин "неперекрывающийся" обозначает индивидуальные мотивы, которые не делят аминокислотные остатки, но, в основном, слиты с другими мотивами или аминокислотными остатками в линейной форме. В других осуществлениях по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99%, или около 100% ХТЕН-последовательностей содержат неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых каждый из мотивов несет около 9-14 аминокислотных остатков. В оставшихся других осуществлениях по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99%, или около 100% ХТЕН-последовательностей содержат неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых каждый из мотивов несет 12 аминокислотных остатков. В этих осуществлениях преимущественно мотивы последовательностей состоят из в основном (например, на 90% или больше) или исключительно небольших гидрофильных аминокислот таких, что вся последовательность обладает неструктурированным и гибким качеством. Примерами аминокислот, которые включаются в полипептид ХТЕН, являются, например, аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин, глутамин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин и глицин. В одном варианте осуществления ХТЕН-последовательности несут от четырех до шести преобладающих

типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) или пролина (P), которые расположены в виде в основном неповторяющейся последовательности, в которой около от 36 до около 3000, или около от 100 до около 2000, или около от 144 до около 1000 аминокислотных остатков по длине последовательности. В некоторых осуществлениях ХТЕН-последовательность составлена из 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных из группы, состоящей из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) или пролина (P). В некоторых вариантах осуществления полипептид ХТЕН обладает последовательностью большей чем от около 36 до около 1000, или от около 100 до около 2000, или от около 400 до около 3000 аминокислотных остатков, при этом по меньшей мере около 80% этой последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, в которых каждый из мотивов состоит из 9-36 аминокислотных остатков, и при этом по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97% или 100% каждого из мотивов состоит из 4-6 типов аминокислот, выбираемых из: глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), и при этом содержание какого-либо типа аминокислот в полноразмерном полипептиде ХТЕН не превышает 30%. В других вариантах осуществления по меньшей мере около 90% ХТЕН-последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, в которых каждый из этих мотивов несет 9-36 аминокислотных остатков, при этом данные мотивы состоят из 4-6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), и при этом содержание какого-либо типа аминокислот в полноразмерном полипептиде ХТЕН не превышает 40%, или около 30%, или 25%, или около 17%, или около 12%, или около 8%. В других вариантах осуществления по меньшей мере около 90% ХТЕН-последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, в которых каждый из этих мотивов несет 12 аминокислотных остатков, состоящих из 4-6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), и при этом содержание какого-либо типа аминокислот в полноразмерном полипептиде ХТЕН не превышает 40%, или 30%, или около 25%, или около 17%, или около 12%, или около 8%. В других вариантах осуществления по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99%, или около 100% ХТЕН-последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, в которых каждый из этих мотивов несет 12 аминокислотных остатков, состоящих из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P).

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предлагаются конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-реактант клик-химии, содержащие один, два, три, четыре или больше в основном неповторяющейся(ихся) ХТЕН-последовательности(ей) от около 36 до около 1000 аминокислотных остатков или суммарно от около 100 до около 3000 аминокислотных остатков, при этом по меньшей мере от около 80%, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99%т или до около 100% этой последовательности состоит из множества блоков из четырех или более неперекрывающихся мотивов последовательностей, выбранных из аминокислотных последовательностей табл. 1, при этом вся последовательность остается без повторений. В некоторых вариантах осуществления данный полипептид ХТЕН включает неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% или около 100% этой последовательности состоит из множества блоков из неперекрывающихся последовательностей, выбранных из одного семейства мотивов, выбранных из табл. 1, что приводит к получению семейственной последовательности. Семейство, применимое к мотивам, обозначает, что ХТЕН-последовательность несет мотивы, выбранные из одной категории мотивов из табл. 1; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD. В других осуществлениях ХТЕН-последовательность содержит множество блоков мотивов последовательностей из двух или более семейств мотивов из табл. 1, выбираемых для достижения требуемых физико-химических характеристик, включающих такие свойства, как суммарный заряд, гидрофильность, недостаток вторичной структуры или недостаток повторяемости, которые могут быть обусловлены аминокислотной композицией этих мотивов, более полно описанных ниже. В этих вышеуказанных осуществлениях, описанных в этом параграфе, мотивы или части мотивов, включенных в ХТЕН-последовательность, могут быть выбраны или подобраны с использованием способов, описанных в данном тексте, для получения полипептида ХТЕН от около 36, около 42, около 72, около 144, около 288, около 576, около 864, около 1000, около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков или промежуточных веществ любой длины. Не ограничивающие применение примеры семейства ХТЕН-последовательностей, пригодных для включения в предлагаемые конъюгаты, представлены в табл. 2. Подразумевается, что определенная последовательность, упомянутая касательно табл. 2, имеет последовательность, отраженную в табл. 2, тогда как обобщенная ссылка, например, на последовательность AE144 подразумевает включение любой последовательности AE, обладающей 144 аминокислотными остатками; например AE144\_1A, AE144\_2A и т.д., или обобщенная ссылка, например, на последо-

вательность AG144 подразумевает включение любой последовательности AG, обладающей 144 аминокислотными остатками; например AG1441, AG144\_2, AG144\_A, AG144\_B, AG144\_C и т.д.

Таблица 1

Мотивы XTEN-последовательности из 12 аминокислот и семейства мотивов

Семейство мотивов*	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОТИВА
AD	GESPGGSSGSES
AD	GSEGSSGPGESS
AD	GSSEGSSEGGP
AD	GSGGEPSESGSS
AE, AM	GSPAGSPTSTEE
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP
AF, AM	GSTSESPSGTAP
AF, AM	GTSTPESGSASP
AF, AM	GTSPSGESSTAP
AF, AM	GSTSSTAESPGP
AG, AM	GTPGSGTASSSP
AG, AM	GSSTPSGATGSP
AG, AM	GSSPSASTGTGP
AG, AM	GASPGTSSTGSP
AQ	GEPAGSPTSTSE
AQ	GTGEPSSTPASE
AQ	GSGPSTESAPTE
AQ	GSETPSGPSETA
AQ	GPSETSTSEPGA
AQ	GSPSEPTEGTSA
BC	GSGASEPTSTEP
BC	GSEPATSGTEPS
BC	GTSEPSTSEPGA
BC	GTSTEPSEPGSA
BD	GSTAGSETSTEA
BD	GSETATSGSETA
BD	GTSESATSESGA
BD	GTSTEASEGSAS

\* Отмечены индивидуальные мотивы, которые при использовании вместе в разных перестановках, приводят к получению "семейства последовательности".

## Полипептиды ХТЕН

Название ХТЕН	Аминокислотная последовательность
AE42	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE42_1	TEPSEGSAPEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS
AE42_2	PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
AE42_3	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP
AG42_1	GAPSPASSTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSPGP
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASP
AG42_3	SPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA
AG42_4	SASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG
AE48	MAEPAGSPTSTEEGTGPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTGS
AM48	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AF144	GTSTEPSEGSASPGTSPGESSTAPGTSPGESSTAPGTSSTAESPGPGTSPGESSTAPGTSSTAESPGGTSPGESSTAPGTSSTAESPGGTSPGESSTAP
AG144_1	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASP
AG144_2	PGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASS
AG144_A	GASPGTSTGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSP





	GSSEGGPGESEGGSSGSESGESPGGSSGSESGESGSPGGSSGSESGESGSPGGSSGSESGES PGGSSGSESGSSESSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGGSSGPESSGSSSESSESSEGGPGS GGEPSESGSSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESGSSGSESGESGSPGGSSGSESGES GSSSESSEGGPGSGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESG SSGESPPGGSSGSESGESGSSGPESSGSSSESSEGGPGSGGEPSESGSSGPESS
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF576	GSTSTAESP GPGTSTSTAESP GPGTSTSESPGTAPGTTSTAESP GPGTSTSTAESP PGTSTEPSEGSAPGTTSESPGTAPGTTSPGSSSTAPGTTSESPGTAPGTTSESPGT APGTTSPGESSTAPGTTSESPGTAPGTTSESPGTAPGTTSPGESSTAPGTTSESPG TAPGTTSESPGTAPGTTSESPGTAPGTTSTEPSEGSAPGTTSESPGTAPGTTSTEP SASPSTSTAESP GPGTSTSTAESP GPGTSTEPSEGSAPGTTSTEPSEGSAPGTTSESP GTAPGTTSTEPSEGSAPGTTSTEPSEGSAPGTTSESPGTAPGTTSESPGTAPGTTSESP SGTAPGTTSTAESP GPGTSTEPSEGSAPGTTSTEPSEGSAPGTTSESPGTAPGTTSESP PSGTAPGTTSTEPSEGSAPGTTSESPGTAPGTTSESPGTAPGTTSTEPSEGSAPGTTSP GESSTAPGTTSTAESP GPGTSPGESSTAPGTTSTAESP GPGTSTEPSEGSAPGTTSP ESPGTAPGTTSTAESP GPGTSTEPSEGSAPGTTSTEPSEGSAP
AG576	PGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSP ASSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGSSSTPSGATGSPGSSSTP SGATGSPGASPGTSTTSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGTPGSGTASSPG ASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGASPGTSTTSPGTPGSGTASSSP GSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATG SPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTTSPGTPGSGTA SSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTTSPG SSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTTSPG
AE624	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTTSPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AD836	GSSSEGGPGGSSSESSEGGGEPGSSGSESGSGGEPSESGSSGEPGSSGSS ESGESPGGSSGSESGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGES GSESGEPGSSGSESGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSES SEGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSE GSSGSESSEGGGSSGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSG GEPSESGSSGSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSGGEPSESGSSGEPGSSGSESSES GGEPSESGSSGGEPSSESSESSESSEGGGPGSGGEPSESGSSGGEPSSESSESSES GSEGGSPGESSGSPGSSGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPG SSGSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGG ESSGESPPGSSGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSGGEPSESGSSGEPGSSG GSEGGSPGESSGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSES ESGESPPGSSGSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSE GGPSSSESSESSEGGGPGSSESSESSEGGGPGSSESSESSESSEGGGPGSSESSESSES

	SGSESGGGEPSESGSSGSESSESSEGGPGESPGSSGSESGGGEPSESGSSGSESPG GSSGSESGGGEPSESGSS
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAS PGTSTEPSEGSASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGT APGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESPGGTSPSGESSTAPGTSPSGES TAPGTSSSTAESPGGTSTEPSEGSASPGTSTEPSEGSASPGTSESPSGTAPGTSPSGE GTAPGTSTEPSEGSASPGTSSSTAESPGGTSTEPSEGSASPGTSESPSGTAPGTSPSGE SSTAPGTSSSTAESPGGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSASPGTSSSTAESPGGTSSST AESPGGTSSSTAESPGGTSSSTAESPGGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSE SPSGTAPGTSTEPSEGPXXXGASASGAPSTXXXSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSS ESPGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASPGT PSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESPGGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSASPG TSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASPG TSTEPSEGSASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASPGTSSSTAESPGGTSESPSGTAP GTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESPGGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAS PGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESPGGTSSSTAES PGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP
AG864_2	GASPGTSSSTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTSGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSSGTA SSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGT STGSPGTGSGGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTP GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGT SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGT GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSP TPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGGTASS SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGGT SSSPGSSTPSGATGSPGTGSGGTASSSPGSSTPSGATGSPGTGSGGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSG GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS GTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGT GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSP
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSSTAESPGGTSTEPSEGS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASPGTSTEPSEGSASPGSEPAATSGE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTGSGGTASSSPGSSTP GATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGTTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSSSTAESPGGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTGSGGTASSSPG STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSET STSSSTAESPGGTSSSTAESPGGTSPSGESSTAPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSET GTSTEPSEGSAPGSSSTAESPGGTSTEPSEGSASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGS

	PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPPGTSTEPSEGSAS PGSTSESPGTAPGTSSESPGTAPGTSTEPSEGSASPGTSTEPSEGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTGPGTASSSPGSSTPS GATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGPEPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPPGTSTEPSESPGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPGTAPGTSSESPGTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASAGAP STGGTSPSGESSTAPGTSSTAESPPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTSTEP GSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSESPGTAPGTSSESPGTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGST PSGATGSPGASPGTSTGSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSESPGTAPGTSPSGESSTAPGT SSTAESP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTGPGTASSSPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP
BC 864	GTSTEPSEGSAGTSTEPSEGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTE PSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSG TEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEP EPGSAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGGASEPTSTEPGTSTEP STSEPGAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSG ASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGT STEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTST EPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPT STEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEP EPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEP PSEPGSAGTSTEPSEPGAGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSE TEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSG SEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA
BD864	GSETATSGSETAGTSESATSESGAGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGSETATSGS ETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETAT SGSETAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSE TATSGSETAGTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGS ETAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESA TSESGAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSE TATSGSETAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGA GSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGSASGSTAGSET TEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSTEA SEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSE TATSGSETAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSAS GSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSE SGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSESA TSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSE TATSGSETA
AE948	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPES

	<p>GPGESEATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS SAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGP</p>
AE1044	<p>GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTST</p>
AE1140	<p>GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP EGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA</p>
AE1236	<p>GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSE</p>

	<p>ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSP                  AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT                  SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG                  TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE                  GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET                  PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP                  TPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG                  SETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP                  EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP</p>
AE1332	<p>GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET                  PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES                  GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS                  ETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP                  ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEP                  EGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT                  SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES                  ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA                  GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGT                  TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS                  EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG                  TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP                  GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE                  EGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE                  TPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESEG                  SAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPT                  STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESAT                  PESGPGTSTEPSEGSAPGTST</p>
AE1428	<p>GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG                  PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS                  APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE                  SGPSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSE                  GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT                  PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP                  SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAG                  SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPA                  GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGT                  ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT                  SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG                  TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP                  GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET                  PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS                  APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSE                  SAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE                  GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP                  TSTEEGTSESATPESGPGSPA</p>
AE1524	<p>GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE                  EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES                  GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE                  SAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT                  STEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT                  PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEP                  SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAG                  SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSE                  SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE                  PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS                  EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG                  SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP                  GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS</p>

	PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPA
AE1620	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTST
AE1716	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSE
AE1812	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT TTEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT TTEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP

AE1908	<p>GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPE                  SGPPTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP                  TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES                  ATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG                  ESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG                  SESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG                  TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESG                  PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST                  EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE                  SGPPTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE                  ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSP                  TSTEEGTSESATPESGPGSEPAT</p>
AE2004A	<p>GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET                  PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS                  APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPT                  TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPE                  ESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP                  TSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPAT                  SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES                  ATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE                  ATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT                  ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG                  EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG                  TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP                  GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP                  PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  APGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS                  ETPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE                  GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE                  GSPAGTSESATPESGPGTSE</p>
AG948	<p>GSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPASTGTGPGTGPSTGSSGTA                  SPGTGSGTASSSPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGTGPSTGSSPASTG                  TGPSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASP                  STGSPGASPGTSSTGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPSTGSPGSSPSA                  STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSTGSPGTGSPGSSPASTG                  SGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPSTGSPGSS                  PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPG                  SSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPASTGSPGSSPASTGSPGSSSTPSGATGSPGASP                  GSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPSTG                  SPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPSTGSPGSSSTPSGAT                  GSPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPSTGSPGASPSTGSPGSS                  TGPSTGSGTASSSPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPSTG                  SGTGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTGPSTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGAS                  PGTSSTGSPGTGSGTASSSPGTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPG                  ASPGTSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSP                  GSSSTPSGATGSP</p>
AG1044	<p>GTPGSGTASSSPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGTGPSTGSSGTA                  SPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPSTGSPGASPSTGSPGSSP                  GSPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTGPSTG                  ASSSPGTGSGTASSSPGASPSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGTGPSTG                  TASSSPGASPSTGSPGTGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPSTG                  TSSSTGSPGASPSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGSSP</p>

	SASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGAT GSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPG TSSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG GTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSST
AG1140	GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASS SSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSG ATGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPS GATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSST PSGATGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGA SPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSST
AG1236	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPGTSS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGASPG TSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSST PSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSS PSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSP GASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASS SSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSSTGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPG GTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASP
AG1332	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSG ATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG GTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSP GASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATG SPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGT



	<p>ASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA                  STGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPS                  ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTP                  GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPG                  TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP                  GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT                  GPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG</p>
AG1428	<p>GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS                  SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTG                  TPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSS                  STGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPG                  TSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS                  GTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG                  GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPG                  ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG                  GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG                  SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA                  SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS                  STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSS                  GTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS                  PSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGAS                  SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP                  GTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT                  GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP</p>
AG1524	<p>GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATG                  SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA                  SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT                  ASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS                  GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG                  SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS                  PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPG                  ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP                  GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP                  SPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTA                  SSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSAS                  TGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPS                  ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGAS                  PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG                  ASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP                  GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG                  SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSST                  GSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPG</p>
AG1620	<p>GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS                  SPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSST                  GSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST                  GTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPS                  GATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS                  ASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS                  PGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG                  ASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP                  GASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG                  SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSST                  GSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA                  TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS                  TGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG                  TSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS                  SASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTP                  PGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG</p>

	SSTPSGATGSPGASPGTSTGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS
AG1716	GASPGTSTGSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSPAST TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSPASTGTGPG GASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSG SPGTPGSGTASSSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPAST GTGPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGASPG GTSSTGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPASTG TGPASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPG
AG1812	GSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSA GSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPA STGTGPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGAS PGTSSGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPG GSSPASTGTGPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSS GSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPAST GTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPAST TGTGPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSPASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSS PASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGASP
AG1908	GSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPASTGT GPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSPGSSPASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSS PASTGTGPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPG TPGSGTASSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSS GSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPAST GTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPG SSGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSP SGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS SASTGTGPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSP
AG2004A	GSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT SPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSPGSSTPSG

	ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPG TSSGTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSS PSGATGSPGASPGTSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPG ASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTGSPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGT PGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG
AE72B	SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPG
AE72C	TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPG
AE108A	TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS
AE108B	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE ATS
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSE
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG

	TSESAT
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPS
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPAT
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEP
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG

	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS SAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTE
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSEIPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES
AE792A	EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT

	STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES AT
AG72A	GPSSPSASTGTGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASS
AG72B	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSG SPGTGSGTASSP
AG72C	SPSASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGA
AG108A	SASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASP
AG108B	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSS
AG144A	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSS
AG144B	PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASP
AG180A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPG TPGS
AG216A	TGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASP GTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG
AG252A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPG
AG288A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGS
AG324A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASP

	<p>                     GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP                      GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG                      ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP                      GASPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG                      SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP                 </p>
AG360A	<p>                     TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASP                      GTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS                      TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG                      SPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP                      GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT                      GPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA                      TGSPGASPG                 </p>
AG396A	<p>                     GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG                      SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP                      GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS                      STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSP                      GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG                      SPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTG                      TPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT                 </p>
AG432A	<p>                     GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS                      PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP                      PGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG                      TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP                      GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG                      SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSST                      GSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSAST                      GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS                 </p>
AG468A	<p>                     TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASP                      GTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS                      TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPG                      ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP                      GASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                      SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG                      TPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST                      GTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG                 </p>
AG504A	<p>                     TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASP                      GTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS                      TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPG                      ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP                      GASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                      SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG                      TPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST                      GTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGT                 </p>
AG540A	<p>                     TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASP                      GTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTP                      GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG                      ASPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP                      GASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS                      SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG                      TPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST                      GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS                      TGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS                      GATGSPGASPG                 </p>
AG576A	<p>                     TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSP                      SASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGS                      STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP                      GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG                      SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSST                 </p>

	GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSS SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG
AG612A	STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG GTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS
AG648A	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS GSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSA TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TP
AG684A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG PGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTG TPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS PGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPG PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG
AG720A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSP ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT TGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGT STGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPG
AG756A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA



	SSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGAS GTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPG
AG792A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS SASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGAS GTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG
AG828A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS SASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGAS GTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTP
AE869	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT'S TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGR
AE144_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTESASR
AE288_R1	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT'S TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASR

AE432_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGETPGSEPATSGETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESASR
AE576_R1	SAGSPTTEGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPG SEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSAPGSPSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGETPGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGSAPGSPS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGETPGSEPATSGETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP EGSAPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASR
AE864_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGETPGSEPATSGETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESG PGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSAPGSPSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP SGPSEPATSGETPGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGSAPGSPS TTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGETPGSEPATSGETPGSAPGSPSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST PEGSAPGSEPATSGETPGTSESATPESGPGTESASR
AF864_R1	SAGSPGTSSTAESPGPGTSSTAESPGGTSSESPTSAPTSTSTAESPGGTSST AESPGPGTSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSESSTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTS SPSGTAPGTSSESSTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTS ESPGTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTS TPESGASPGTSSTAESPGPGTSSTAESPGPGTSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSES TSESPTAPGTSSTEPSEGSAPGTSSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTS STSESPTAPGTSSTAESPGPGTSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPT GTSSESPTAPGTSSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSES PGTSSESPTAPGTSSTAESPGPGTSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSES SPGPGTSPGESSTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTS GTAPGTSSESPTAPGTSSTEPSEGSAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTSSESPTAPGTS SGTAPGTSSTAESPGPGTSPGESSTAPGTSSESASR
AG864_R1	SAGSPGASPTSTGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTSGGATSSPSSPST GATGSPGSSPASTGTGPGASPTSTGSPGTSGGATSSPSSPSTGATGSPGTPG SGTASSPSPAGPSTSTGSPGASPTSTGSPGTSGGATSSPSSPSTGATGSPGAS PSTSTGSPGTSGGATSSPSSPSTGSPGASPTSTGSPGTSGGATSSPSSPSTGATGSPG STPSGATGSPGSSPSTGSPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGSSPSTG GTPGSGTASSPSPAGPSTSTGSPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGSSPSTGATGSPG GPGTSGGATASSPSPAGPSTSTGSPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGSSPSTGATGSPG TSPGSSPSTGATGSPGASPTSTGSPGTSGGATSSPSSPSTGATGSPGSSPSTG ATGSPSSPSTGATGSPGSSPASTGTGPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGSSPSTGSPGTPG GTASSPSPAGPSTSTGSPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGASPTSTGSPGSSPSTGSPGT GSGTASSPSSPSTGATGSPGTSGGATSSPSSPSTGATGSPGTPGSGTASSPSSPSTG STPSGATGSPGSSPSTGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPTSTGSP GTPGSGTASSPSSPSTGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPTSTG SPGASPTSTGSPGSSPSTGATGSPGSSPASTGTGPGASPTSTGSPGSSPASTG TGPGTSGGATSSPSSPSTGATGSPGSSPSTGATGSPGSSPASTG

В некоторых осуществлениях, в которых в полипептиде XTEN меньше 100% аминокислот, состоит из 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных их глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), или меньше 100% последовательности состоит из мотивов последовательностей из табл. 1 или XTEN-последовательности из табл. 2, 3 и 22-25 других аминокислотных остатков полипептида XTEN выбраны из любых других 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно выбраны из гидрофильных аминокислот таких, что XTEN-последовательность содержит по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Отдельная аминокислота или короткая последовательность аминокислот, отличных от глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), могут быть включены в полипептид XTEN для получения необходимого свойства, такого как обеспечение внедрения в сайт рестрикции путем кодирования нуклеотидов или для облегчения присоединения к компоненту нагрузочного вещества или для внедрения в расщепляемую последовательность. В качестве типичного осуществления, описанного более полно ниже, в данном изобретении предлагается полипептид XTEN, который содержит от 1 до около 20, или от 1 до около 15, или от 1 до около 10, или от 1 до 5 остатков лизина, при этом реакционноспособные лизиновые остатки используются для присоединения к кросс-линкерам или нагрузочным веществам, как описано в данном тексте. В другом осуществлении, описанном более полно ниже, данный полипептид XTEN включает от 1 до около 20, или от 1 до около 15, или от 1 до около 10, или от 1 до 5 остатков цистеина, при этом реакционноспособные цистеиновые остатки используются для присоединения к кросс-линкерам или нагрузочным веществам, как описано в данном тексте. В другом осуществлении данный полипептид XTEN включает от 1 до около 20 остатков цистеина и лизина, при

этом реакционноспособные лизиновые и цистеиновые остатки используются для присоединения к различным кросс-линкерам или нагрузочным веществам, как описано в данном тексте. В другом осуществлении данный полипептид XTEN включает 1, 2, 3, 4, 5 или больше остатков аргинина, за которыми не следуют остатки пролина для обеспечения расщепляемых последовательностей, которые могут разрушаться трипсином для создания XTEN-сегментов, описанных более полно в данном тексте ниже. Аминокислоты полипептидов XTEN, которые не являются глицином (G), аланином (A), серином (S), треонином (T), глутаминовой кислотой (E) и пролином (P), либо расположены рассредоточено по всей длине XTEN-последовательности либо расположены в пределах или между последовательностями мотивов, или сконцентрированы в одном или большем количестве коротких участков XTEN-последовательности, таких как на N- или C-концах или около них. Поскольку гидрофобные аминокислоты придают полипептиду структуру, то в данном изобретении предложено то, что содержание гидрофобных аминокислот в полипептидах XTEN, используемых в конъюгационных конструкциях, обычно будет меньше чем 5%, или меньше чем 2%, или меньше чем 1% гидрофобных аминокислот от общего содержания. Гидрофобные остатки, которые менее желательны в конструкции XTEN, включают триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Кроме того, каждый может разработать XTEN-последовательности с содержанием меньше чем 5%, или меньше чем 4%, или меньше чем 3%, или меньше чем 2%, или меньше чем 1%, или с отсутствием следующих аминокислот: метионин (для предотвращения окисления), аспарагина и глутамина (для предотвращения дезамидирования). В других осуществлениях аминокислотное содержание метионина и триптофана в XTEN-составляющих, используемых в конъюгационных конструкциях, обычно меньше чем 5%, или меньше чем 2%, или наиболее предпочтительно меньше чем 1%. В других осуществлениях полипептид XTEN из предлагаемых XTEN-конъюгатов будет обладать последовательностью, которая содержит меньше чем 10% аминокислотных остатков с положительным зарядом, или меньше чем около 7%, или меньше чем около 5%, или меньше чем около 2% аминокислотных остатков с положительным зарядом, суммарное содержание остатков метионина и триптофана будет меньше чем 2% и суммарное содержание остатков аспарагина и глутамина будет меньше чем 5% всей XTEN-последовательности.

### 3. Цистеин- и лизин-сконструированные XTEN-последовательности.

В другом аспекте в данном изобретении предложены полипептиды XTEN с определенными количествами с внедренными цистеиновыми и лизиновыми остатками соответственно "цистеин-сконструированные XTEN" и "лизин-сконструированные XTEN". Объектом данного изобретения является предложение полипептидов XTEN с определенными количествами цистеиновых и/или лизиновых остатков для обеспечения конъюгации между тиоловой группой цистеина или эписилон-аминогруппы и реакционноспособной группой нагрузочного вещества или кросс-линкера, которые должны присоединяться к остову молекулы XTEN. В одном варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN этого изобретения содержит от около 1 до около 100 лизиновых остатков, или от около 1 до около 70 лизиновых остатков, или от около 1 до около 50 лизиновых остатков, или от около 1 до около 30 лизиновых остатков, или от около 1 до около 20 лизиновых остатков, или от около 1 до около 10 лизиновых остатков, или от около 1 до около 5 лизиновых остатков, или от 1 до около 3 лизиновых остатков, или в другом варианте только один лизиновый остаток. В другом варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN этого изобретения содержит от около 1 до около 100 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 70 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 50 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 30 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 20 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 10 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 5 цистеиновых остатков, или от 1 до около 3 цистеиновых остатков, или в другом варианте только один цистеиновый остаток. В другом варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN этого изобретения содержит от около 1 до около 10 лизиновых остатков и от около 1 до около 10 цистеиновых остатков. С использованием вышеуказанных лизин- и/или цистеин- сконструированных полипептидов XTEN могут быть сконструированы конъюгаты, которые включают полипептид XTEN, дополнительный кросс-линкер плюс нагрузочное вещество, пригодное для лечения болезненного состояния пациента, при этом максимальное количество молекул агента нагрузочного вещества присоединяется к XTEN-компоненту по определенному количеству остатков лизина, цистеина или других аминокислот с реакционноспособной группой (например, концевая аминокислота или тиоловая группа), внедренных в полипептид XTEN. В одном варианте осуществления в этом изобретении предлагаются цистеин-сконструированные последовательности XTEN, в которых нуклеотиды, кодирующие одну или большее количество аминокислот полипептида XTEN, замещены аминокислотой цистеином для создания цистеин-сконструированного гена XTEN. В другом варианте осуществления в этом изобретении предлагаются цистеин-сконструированные последовательности XTEN, в которых нуклеотиды, кодирующие одну или большее количество аминокислоты цистеина, вставлены в ген, кодирующий полипептид XTEN, для создания цистеин-сконструированного гена XTEN. В других случаях олигонуклеотиды, кодирующие один или большее количество мотивов, от около 9 до около 14 кодирующих аминокислоты кодонов, кодирующих один или большее количество цистеиновых остатков, связаны в блоке с другими олигонуклеотидами, кодирующими XTEN-мотивы или полноразмерные XTEN-последовательности для создания цистеин-сконструированного гена XTEN. В одном вышеуказанном

осуществлении, в котором один или большее количество цистеиновых остатков вставлены в ХТЕН-последовательность при создании гена ХТЕН, нуклеотиды, кодирующие цистеин, могут быть присоединены к кодонам, кодирующим аминокислоты, используемые в полипептиде ХТЕН для создания мотива цистеин-ХТЕН, с цистеином(ами) в определенных положениях, используя способы, описанные в данном тексте (см. пример 61 и фиг. 40-41), или с помощью стандартных техник молекулярной биологии и такие мотивы впоследствии встраивают в ген, кодирующий полноразмерный цистеин-сконструированный полипептид ХТЕН. В таких случаях, в которых, например, кодирующие один цистеин нуклеотиды добавляются в ДНК, кодирующую мотив, выбранный из табл. 1, получаемый мотив может нести 13 аминокислот, тогда как внедрение двух остатков цистеина приведет к получению мотива, несущего 14 аминокислот и т.д. В других случаях цистеинсодержащий мотив может быть создан de novo и иметь определенную длину и количество аминокислот цистеинов путем присоединения нуклеотидов, кодирующих цистеин, к нуклеотидам, кодирующим один или большее количество аминокислотных остатков, используемых в полипептиде ХТЕН (например, G, S, T, E, P, A) в определенном положении, а данные кодирующие мотивы впоследствии встраивают путем гибридизации с другими ХТЕН-кодирующими последовательностями мотивов в ген, кодирующий полноразмерный полипептид ХТЕН, как описано в данном тексте и проиллюстрировано на фиг. 7-8. В случаях, когда лизин-сконструированный полипептид ХТЕН используется для получения конъюгатов этого изобретения, описанные выше подходы должны применяться с кодонами, кодирующими лизин вместо цистеина. Таким образом, принимая вышесказанное, может быть создан новый ХТЕН-мотив, который может содержать около 9-14 аминокислотных остатков и содержать одну или большее количество реакционноспособных аминокислот; т.е. цистеин или лизин. Не ограничивающие осуществления примеры мотивов, подходящие для использования в конструируемых полипептидах ХТЕН, содержащих один остаток цистеина или лизина, такие

GGSPAGSCTSP  
 GASASCAPSTG  
 TAEAAGCGTAEAA  
 GPEPTCPAPSG  
 GGSPAGSKTSP  
 GASASKAPSTG

Однако данное изобретение подразумевает для включения в ХТЕН-последовательности использование мотивов различной длины, такие как описаны в табл. 5 и 11. В таких случаях, в которых ген, кодирующий полипептид ХТЕН с одним или более мотивов с цистеином и/или лизином, должен собираться из существующих ХТЕН-мотивов или сегментов, это ген может быть сконструирован и построен соединением существующих "строительных блоков" полинуклеотидов, кодирующих короткие и длинные полипептиды ХТЕН; например AE48, AE144, AE288, AE432, AE576, AE864, AM48, AM875, AE912, AG864, или нуклеотиды, кодирующие 36-меры из примеров 1-4, и табл. 22-25, которые гибридизируются в блоке с нуклеотидами, кодирующими цистеин- и/или лизинсодержащие мотивы, или, альтернативно, эти цистеин- и/или лизинкодирующие нуклеотиды могут быть превращены с помощью ПЦР в имеющуюся ХТЕН-последовательность (как более полно описано ниже и в примерах), с использованием, к примеру, нуклеотидов, кодирующих группы из табл. 4 и 5, для построения сконструированных полипептидов ХТЕН, в которых реакционноспособные остатки цистеина и/или лизина размещены в одном или большем количестве предусмотренных в последовательности положении в требуемом количестве. Примеры, не ограничивающие осуществление таких сконструированных полипептидов ХТЕН, представлены в табл. 3. Таким образом в одном варианте осуществления данного изобретения ХТЕН-последовательность содержит по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% идентичной последовательности или является идентичной последовательности или фрагменту последовательности, выбранных из табл. 3, при проведении оптимального выравнивания. Однако применение методологии с цистеин- или лизин-сконструированными последовательностями для создания полипептидов ХТЕН, включающих цистеиновые или лизиновые остатки, не означает наложение ограничения на четко определенные композиции или гамму видов композиций вышеуказанных осуществлений. Специалист в этой области оценит выгоду того, что точное расположение и количество внедренных остатков цистеина и лизина в полипептиды ХТЕН могут варьировать без отступления от сути данного описанного изобретения.



	ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEA GCGTAEEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCG TAEAAAR
Seg 5	ATAEAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEA AGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE EGSAPTAEEAAGCGTAEEAAR
Seg 6	ATAEAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTETAEEAAGCGTAEEAAPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSTAEAAAGCGTAEEAAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSTAEAAAGCGTAEEAAPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATTAEEAAGCGTAEEAAPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAR
Seg 7	ATAEAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPTAEAAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEA AGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSET GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEA EAAGCGTAEEAAGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEEAAR
Seg 8	ATAEAAGCGTAEEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTAEAAAGCGTAEEAESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS

	<p>APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS                  PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSTAEAAGCGTAEAAEGSAPGTSTEPSEGS                  APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET                  PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSTAEAAGCGTAEAA                  APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP                  GTTAEAAGCGTAEAASTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE                  EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP                  GTSESATPESGPGSEPATAEAAGCGTAEAAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS                  PGPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE                  GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPETAEAAGCGTAEAAAGSPTSESATPESG                  PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAE                  AR</p>
Seg 9	<p>ATAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST                  EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET                  PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE                  GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG                  SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG                  AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST                  EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG                  SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT                  SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT                  STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG                  ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST                  EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE                  EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET                  GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG                  TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR</p>
Seg 10	<p>AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE                  TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT                  STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT                  STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE                  SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE                  PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP                  EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP                  ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT                  TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES                  GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG                  PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG                  SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT                  STEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAAR</p>
Seg 11	<p>ATAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST                  EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET                  PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE                  GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG                  SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG                  AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST                  EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG                  SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE                  SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG                  SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT                  PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE                  GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST                  TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES                  GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS                  APGTSTEPSEGSAPR</p>

Seg 12	<p>AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP          GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG          TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT          STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE          SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST          PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTTAEAAAGCGTAEAAEPSEGSAPGSPA          GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATTAEEAAAGCGTAEAAAGSETPGT          ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA          GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES          ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP          SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP          TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP          ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE          SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR</p>
Seg 13	<p>AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP          GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG          TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT          STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE          SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST          PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS          EGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT          SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP          TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG          SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST          EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST          EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP          GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG          TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAR</p>
Seg 14	<p>AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP          GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG          TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT          STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE          SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST          PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS          EGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT          ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA          GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES          ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA          TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE          GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS          ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES          GPGTSTEPSEGSAPR</p>
Seg 15	<p>AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS          EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT          STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS          APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE          PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE          GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG          TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT          STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT          ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA          GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES          ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA          TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE          GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS          ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES          GPGTSTEPSEGSAPR</p>



	GPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 16	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 17	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGKPGGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 18	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 19	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEEGKPG PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGGKPGAPGSPSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATGGKPGPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP

	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 20	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGGKPGG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGKPGGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 21	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSGGKPGESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTGGKPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAAGGKPGTSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGKPGSPTSTEPSEGSAPGT TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 22	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPR
Seg 23	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP

	GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGGKPGR
Seg 24	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 25	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTGGKPGEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATGGKPGGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 26	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PSESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 27	AEATTAAGGAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS

	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 28	AEATTAAGGATAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 29	AEATTAAGGATAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAA AR
Seg 30	AEATTAAGGATAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP TAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 31	ATGTATSEGSPEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP

	ESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPES GPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS PAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPG SEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 32	ATGTATSEGSPETAEEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSE PGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGT SESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSE ESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGTSESA TPESG PGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEAAR
Seg 33	ATGTATSEGSPETAEEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSE PGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGT SESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGTAEAAGTSESA TPESGPGSE PATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TP ESGPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPTAEEAAGCGT AEAAR
Seg 34	ATGTATSEGSPETAEEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSE PGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGT SESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSE ATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEP SEGSAPTAEEAAGCGTAEAAGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA PESGPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APTAEEAAGCGTAEAAR
Seg 35	EPTAATTGESAGGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPG AGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGSPAGS TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGSPAGS

	PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PAGSPTSSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 36	EPTAATTGESAGTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 37	EPTAATTGESAGTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGT AEAAAR
Seg 38	EPTAATTGESAGTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 39	AEATTAAGGAEESGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP

	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 40	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 41	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR
Seg 42	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE

	GSAPTAEAAGCGTAEAAAR
Seg 43	ATGTATSEGSPEEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 44	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAAR
Seg 45	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAAR
Seg 46	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE



	PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPTAEAAGCGTAEAAAR
Seg 47	AEATTAAGGAEETGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPRRPRRPRP
Seg 48	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAARPRRPRP
Seg 49	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAARPRRPRP
Seg 50	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT

	ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAGCGTAEAARPRRPRP
Seg 51	AEATTAAGGAEIEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 52	AEATTAAGGAEIEEAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 53	AEATTAAGGAEIEEAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR
Seg 54	AEATTAAGGAEIEEAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR

	<p>GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAGCGTAEAAR</p>
Seg 55	<p>AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPT AEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGK GR</p>
Seg 56	<p>AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGGKPR</p>
Seg 57	<p>AEATTAAGGAEETGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR</p>
Seg 58	<p>AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE</p>





	PGR
Seg 74	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGKPKGR
Seg 75	AGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPG PGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP TSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPST SSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSST SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGASP TSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG SPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPR
Seg 76	ATAEAAGCGTAEAAGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG PGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG GSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPG TPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGASP TSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG SPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG
Seg 77	ATAEAAGCGTAEAAGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG PGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG GSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPG TPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPG PGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPG GSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS PSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPG GTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPST SSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG
Seg 78	ATAEAAGCGTAEAAGASPSTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG PGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG GSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPG AEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPG GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG STPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTP GSGTASSSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGASPSTSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG

	AGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEEAAG CGTAEAAAR
Seg 79	ATAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPTAEAAAGCGTAE AAGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG PGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SPGTPSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 80	ATAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG PGASPGTAEAAAGCGTAEAAATSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG GSSPSASTGTTAEAAAGCGTAEAAAGPPTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGTTAEAAAGCGTAEAAAPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG GSSPSASTGTGPGASPGTAEAAAGCGTAEAAAGTSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 81	ATAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGT SSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGT EAAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG PGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGSSTPSG GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG PTAEAAAGCGTAEAAAGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 82	ATAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASTAEAAAGCGTAEAAAPGSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT SSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGTAEAAAGCGTAEAAATGSPGASPGTSS

	<p>STGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSS                  TGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGTAEEAAGCGTAE                  EAASPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS                  TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTG                  TGPATAEAAAGCGTAEAAASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS                  TGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA                  TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPAEAAAGCGTAEASGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG                  ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGT                  ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTAEAAAGCGTAEAAATGPGASPGT                  SSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPAST                  TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGTAEEAAGC                  GTAEAAAR</p>
Seg 83	<p>ATAEEAAGCGTAEAAAGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTAS                  SSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                  SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                  PGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTG                  GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPG                  TPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGT                  PGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSS                  TPGATGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS                  PSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPG                  TSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPG                  GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG                  ATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA                  TGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGAT                  GSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                  SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPR</p>
Seg 84	<p>AGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP                  GSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG                  ASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPG                  PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS                  TPGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPG                  GTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG                  TSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT                  SSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGT                  TGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSS                  TGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS                  SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGT                  GPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTG                  PGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPG                  GASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG                  ASPGTSSGSPAEAAAGCGTAEAAAR</p>
Seg 85	<p>ATAEEAAGCGTAEAAAGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTAS                  SSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                  SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG                  PGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTG                  GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPG                  TPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGT                  PGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSS                  TPGATGSPGASPGTSSGSPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG                  SSGSPGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPG                  PGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTP                  GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS                  PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPG                  GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGT                  SSGSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGT                  ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPR</p>
Seg 86	<p>AGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP                  GSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG</p>



	<p>ASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTGSPGT  PGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS  TPSGATGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGASPG  GTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGASPG  TSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSTAEAAAGCGTAEAAAPSGATGSPGSST  PSGATGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSTAEAAAGCGTAEAAAGATGSPGSS  TPSGATGSPGSSPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPG  SGTASSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGS  GTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPS  GATGSPSSPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSG  TASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGT  STGSPGSSPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA  SSPGSSTPSGATGSPGSSPSGATGSPGASPGTSTGSPR</p>
Seg 87	<p>AGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSP  GSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPG  ASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTGSPGT  PGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS  TPSGATGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGASPG  GTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGASPG  TSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSGATGSPGSSPSGATGSPGASPGT  SSTGSPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSGATGSPGSSSTP  SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGASPG  TSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPS  GATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSG  ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGA  TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSGAT  GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATG  SPGSSSTPSGATGSPGASPGTSTGSPAEAAAGCGTAEAAAR</p>
Seg 88	<p>AGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSP  GSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPG  ASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSTGSPGT  PGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS  TPSGATGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGASPG  GTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGASPG  TSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSGATGSPGSSPSGATGSPGASPGT  SSTGSPGKPGGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSS  SPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGASPGTSTGSPGAS  PGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPG  SGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSGATGSPGSSPS  ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSA  STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSGATGSPGSSPSAS  TGTGPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSGA  TGSPGASPGTSTGSPR</p>
Seg 89	<p>AGGKPGGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPS  GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSG  TASSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGT  STGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSGA  TGSPGSSPSGATGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTAS  SSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS  SPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSGATGSPGSSPSGATGSP  PGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSGATGSPGSSPSGATGSP  GSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGASPGTSTGSPG  ASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGT  PGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSGATGSPGSS  PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSP  SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGASPGTSTGSPGSSPSGATGSPGSSPS  ASTGTGPGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPS  GATGSPGASPGTSTGSPGKPGR</p>
Seg 90	<p>AGGKPGGASPGTSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPS</p>

	GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS TGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSSTGSPGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGKPGR
Seg 91	AGGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGKPGGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGKPGGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGKPGR
Seg 92	AGGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGKPGGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSSTGSPGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGK PGGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGKPGR
Seg 93	AGGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGGG KPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGKPGG GTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGT STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGKPGR

Seg 94	<p>AGGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPS          GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSG          TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG          ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS          STPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGG          KPGGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGT          GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGS          PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSG          ATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT          ASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGGTP          GSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSST          PSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPG          GTASSSPGSSSTPSGATGSPGGKPGGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSP          GASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPG          TPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGR</p>
Seg 95	<p>AGGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPS          GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSG          TASSSPGASGGKPGPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG          ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS          STPSGATGSPGSSSTPSGGKPGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSST          GSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGT          GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSGGKPGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPS          GATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSG          ATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAGGKPGSPGTPSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGT          PGGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP          GSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPGGKPGSGATGSPGTPGSGTASS          SPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGS          PGTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGGGKPGTGPASPGT          SSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSAS          TGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGR</p>
Seg 96	<p>AGGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPS          GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSG          TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGASPGT          STGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGA          TGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS          SSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS          SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATG          PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSP          GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPG          ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGT          PGGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSS          PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSP          SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPS          ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPS          GATGSPGASPGTSSSTGSPR</p>
Seg 97	<p>AGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSP          GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG          ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGT          PGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSS          TPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP          GTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG          TSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGT          SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSAS          TGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS          TGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTAS          SSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGT          GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG          PGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG          GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPG</p>

	ASPGTSSSTGSPGGKPGR
Seg 98	AGGKPPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPR
Seg 99	AGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPG PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS GTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGAS TSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPGKPGPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGGKPGGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPR
Seg 100	AGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPG PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS GTSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGAS TSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS SSTGSPGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPG PGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA TGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGR
Seg 101	AEATTAAGGAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGAS GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP ATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG



	TASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGT ASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPR
Seg 106	ATGTATSEGPETAEEAAGCGTAEEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSS GSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEAAGCGTAEEAAR
Seg 107	ATGTATSEGPETAEEAAGCGTAEEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSS GSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGAS TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSAST TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEAAGCGT AEAAR
Seg 108	ATGTATSEGPETAEEAAGCGTAEEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSS GSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPGTSSSTGSPTAEAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGAS TSSTGSPTAEAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS STGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPTAEAAGCGTAEEAAR
Seg 109	EPTAATTGESAGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGS

	GATGSPGASPGTSSPTSAAEAAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 110	EPTAATTGESAGTAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 111	EPTAATTGESAGTAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS TASSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPAEAAAGCGT AEAAAR
Seg 112	EPTAATTGESAGTAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPA SPGTSSTGSPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP TSSTGSPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSS PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPTAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 113	AEATTAAGGAE EEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSP ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS

	STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTGP SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSG GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPR
Seg 114	AEATTAAGGAEETAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSG GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS TSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 115	AEATTAAGGAEETAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSP SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPG SPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPAEAAAG GTAEAAAR
Seg 116	AEATTAAGGAEETAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPG GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPG STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGAS GTSSTGSPGAEAAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSSTGSPGAEAAAGCGTAEAAAR
Seg 117	ATGATSEGSPEEEEGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS



	SSPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTG GSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG GTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGT SSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPR
Seg 118	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGSSPAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGT GPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP GSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG STPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP SGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSST SGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSG GTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGT SSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG CGTAEAAR
Seg 119	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGSSPAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGT GPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG GSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPG GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSP STGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGT CGTAEAAR
Seg 120	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGSSPAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGT GPGSSPASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG GSPGASPGTSSSTGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG GSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPG SSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGG SSPASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGAS

	PGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 121	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTP SGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPS GATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT TASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS STGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT SSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPRPRRPRP
Seg 122	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGS TASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSG ATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEAAGCGTAEAARPRRPRP
Seg 123	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPG SSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGA SPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGA PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTAEAAGC GTAEAARPRRPRP
Seg 124	AEATTAAGGAEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPG STPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS

	TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPTEAAGCGTAEARPRRPRP
Seg 125	AEATTAAGGAEIEGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSSTGSPTEAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG SSTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPG GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPR
Seg 126	AEATTAAGGAEIEEAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTEAAGCGTAEAAAR
Seg 127	AEATTAAGGAEIEEAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTEAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGAS PGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPTEAAGC GTAEAAAR
Seg 128	AEATTAAGGAEIEEAEAAAGCGTAEAAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPPTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPTEAAGCGTAEAAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGS

	<p>STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS            PGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPG            TSSSTGSPGTAEEAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS            TPGSATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP            SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS            ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG            TSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT            SSGSPTAEEAAGCGTAEEAAR</p>
Seg 129	<p>AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG            TPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASS            SPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASS            PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG            GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG            ASPGTSSSTGSPGGKPGGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS            TSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS            GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATG            SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG            PGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSP            TAEAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATG            SPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG            PGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG            GASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSP            SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPG            KPGR</p>
Seg 130	<p>AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG            TPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASS            SPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASS            PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG            GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG            ASPGTSSSTGSPGTAEEAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTG            GASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG            ASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGS            TTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGAS            PGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGAS            GTSSTGSPGTAEEAAGCGTAEEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGSS            TPGSATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP            SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP            ASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG            TSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT            SSGSPGKPGR</p>
Seg 131	<p>AEATTAAGGAEEEGKPGGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGS            GTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSG            GATGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSG            ATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST            GTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS            GSPGGKPGGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPS            ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTP            SATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG            ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGT            ASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGKPGGT            GSGTASSPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGSSTP            PSATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSG            GTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGT            SSGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT            ASSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTAEEAAGCGTAEEAAR</p>
Seg 132	<p>AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEEAAGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG            TPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASS            SPGSSTPSGATGSPGTGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASS            PGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG            T</p>





Seg 148	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGGKPGR
Seg 149	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 150	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGA SASCAPSTGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG
Seg 151	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 152	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGPEPTCAPS GGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP

	ESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPE SGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGP GTSTEPSEGSAPG
Seg 153	GTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGGSPAGSCTSPGGTSESA ATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGTSESA TP ESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE SAPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGGSPAGSCTSPGGTSESA TPE SGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGP GSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 154	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGGASASCAPST GGGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGT ESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGGASASCAPSTGGGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSEPA T GSETPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSE GSAPG
Seg 155	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGGSPAGSCTS PGGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTEPSEGS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPG TSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSE ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP EGSAPGASASGAPSTGGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAES PGPGTSESPSGTAPGTSPGESSTAPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSEPA TSGSETPGTSTAESPGGTSSTAESPG PGTSPGESSTAPGSEPA TSGSETPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAESPG GTSTEPSEGSASPSTSEPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPG PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTSESA TPESGPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 156	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGASASCAPST GGGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTEPSEGS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPG TSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSE ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP EGSAPGPEPTGPAPSGGSEPA TSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPE



	<p>SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST          EEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAP          GTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG          TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT          SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST          EPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSST          SGATGSPGASPGTSTGSPGASASGAPSTGGTSPSGESSTAPGTSSSTAESPGPGTSPSGE          SSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGA          TGSPGASPGTSTGSPGTSTEPSEGSASPSTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPES          GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASP          GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG          SEPATSGSETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSTSESPGTAPGT          SPSGESSTAPGTSSSTAESPGGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTGPGSTASSSPGSP          AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG</p>
Seg 157	<p>MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGGPEPTCPAPS          GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSSTAESPGPGTSTEPSEGSAS          PGSTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASPSTSTEPSEGSASPSEPATSGSETPG          TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT          STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT          ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP          ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTST          PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP          EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSSTAES          PPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGT          GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSSSTAESPGGTSSTAESPG          PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAESPGP          GTSTEPSEGSASPSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG          SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS          PAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTSESATPESGPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG</p>
Seg 158	<p>MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGGPEPTCPAPS          GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSSTAESPGPGTSTEPSEGSAS          PGSTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSASPSTSTEPSEGSASPSEPATSGSETPG          TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT          STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT          ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP          ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTST          PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP          EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSSTAES          PPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGT          GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSSSTAESPGGTSSTAESPG          PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAESPGP          GTSTEPSEGSASPSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG          SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS          PAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTSESATPESGPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGPEPTCPAPSGGMAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPG          SSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPG</p>
Seg 159	<p>GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG          SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS          EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGSPAGSKTSPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT          STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE          ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST          PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP          EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT          ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE          SGPSTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS          APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET          PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP          GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG</p>

Seg 160	<p>MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE          GTSSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG          TSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT          ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST          EPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGSEPA          TSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP          EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEATP          ESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSE          SAPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSEATPES          GPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSE          TSEATPESGPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT          TSEATPESGPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT          TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGGA          SASKAPSTGGGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT          TSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE          SATPESGPGSEPAATSGSETPGTSTEPSEGSAPG</p>
Seg 161	<p>GSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG          TSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT          SEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT          TSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTST          EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES          ATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP          SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP          EGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATP          ESGPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT          TEEGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSEATPESGPGSEPAATSG          ETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST          EGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST          EGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGSEPAATSGSET          GSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPG          TSEATPESGPGTSTEPSEGSAPG</p>
Seg 162	<p>MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASASKAPST          GGGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS          A          PGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEE          GTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG          TSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGT          STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGT          ESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST          EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST          PSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSE          ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGS          TSTEEGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATP          ESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSEATPE          SGPGEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS          APGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSET          PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGP          GTSTEPSEGSAPG</p>
Seg 163	<p>GTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPG          TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSP          AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSE          SATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST          PSEGSAPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSES          ATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEP          SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGS          TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSEATP          ESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE          SAPGSEPAATSGSETPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSEATPE</p>

	SGPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEATSGSETPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 164	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGGSPAGSKTS PGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT ESATPESGPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST PSEGSAPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGSEATSGSETPGTSESAT PESGPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEATSGSETPGSEATSG SETPGSEATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSTEPSEGS APG
Seg 165	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGGGSPAGSKTS PGGTSTEPSEGSAPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTEPESGSAS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGSASPGTSTEPESGSASPGSEATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAES PGPGTSESPSGTAPGTSPGESSTAPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSSTAESPGPGTSSSTAESPG PGTSPGESSTAPGSEATSGSETPGSEATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAESPGP GTSTEPESGSASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSEATSGSETPGTSESATPESGPG PAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 166	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGGASASKAPST GGTSTEPSEGSAPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTEPESGSAS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGSASPGTSTEPESGSASPGSEATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGPEPTGPAPSGGSEATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSSTAESPGPGTSESPSGTAPGTSPGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAP GTSPGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEATSGSETPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SPGESSTAPGTSPGESSTAPGTSPGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPG SGATGSPGASPGTSSSTGSPGASASGAPSTGGTSPGESSTAPGTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSSTPSG TGSPGASPGTSSSTGSPGTSTEPESGSASPGTSPGESSTAPGTSPGESSTAPGTSESATPES GPGSEATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGSASP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEATSGSETPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGTSESPSGTAPGT SPGESSTAPGTSSTAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTTPGSGTASSPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
Seg 167	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGGASASKAPST

	GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTEPESGAS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSTEPESGASAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAES PGPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSSSTAESPGPGTSSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAESPGP GTSTEPESGASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTSESATPESGPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 168	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGASASKAPST GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTEPESGAS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSTEPESGASAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAES PGPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSSSTAESPGPGTSSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSSTAESPGP GTSTEPESGASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTSESATPESGPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASASKAPSTGGMAEPAGSPTSTEEGASPGTSSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG
Seg 169	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 170	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGGSPAGSCTS PGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGG SPAGSCTSPGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPG

Seg 171	<p>MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGGGSPAGSKTS                  PGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP                  GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG                  SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS                  EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGG                  SPAGSKTSPGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS                  TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE                  SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGSEPATSGSETPGTSE                  SATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPA                  TSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP                  EGSAPG</p>
Seg 172	<p>SAGSPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP                  SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT                  PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG                  SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESAT                  PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE                  GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGS                  ETGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT                  AEAASASR</p>
Seg 173	<p>SAGSPGSPSTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP                  GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG                  TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET                  PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPTKPGTSPSTTEE                  GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG                  TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT                  STEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG                  TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT                  SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE                  ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTST                  ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST                  EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA                  TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAG                  CGTAEAASASR</p>
Seg 174	<p>SAGSPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS                  PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT                  GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT                  STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES                  GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG                  PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP                  GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG                  SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETP                  GTSSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG                  SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT                  SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS                  TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA                  GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES                  ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP                  SEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAASASR</p>
Seg 175	<p>SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE                  GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS                  TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS                  APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET                  PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE                  GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG                  TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT                  STEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP                  GTAEAAGCGTAEAASSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGC</p>

	GTAEAAAPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEEAAGCGTAEAAASET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTTAEAAAGCGTAEAAAGSPTSSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESTAEAAAGCGTAEAAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE PGSEPATSGTAEAAAGCGTAEAAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PTAEAAAGCGTAEAAASASR
Seg 176	SAGSPTAEAAAGCGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAAGCGT AEAAASASR
Seg 177	SAGSPTAEAAAGCGTAEAAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTAE AAGCGTAEAAASTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAAGCGTAE AASPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEEAAGCGTAEAAASETPTGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTTAEAAAGCGTAEAAAGSPTSSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESTAEAAAGCGTAEAAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGTAEAAAGCGTAEAAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAE AAGCGTAEAAASASR
Seg 178	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASR
Seg 179	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGR
Seg 180	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPTAEAAAGKPGTAEAAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGK
Seg 181	SAGSPTAEAAAGCGTAEAAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG



Seg 186	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT EPSEGSAPTAEAAGKPGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGK
Seg 187	SAGSPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
Seg 188	SAGSPTTEGTSTEPSEGSAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGTAEAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPTAEAAGCGTAEAASASR
Seg 189	SAGSPTPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAE AASASR
Seg 190	SAGSPTGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT AEAASASR
Seg 191	SAGSPTPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGTA EAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT AEAASASR
Seg 192	SAGSPGTSSTAESPGPGTSSSTAESPGPGCTSESPSGTAPGTSSTAESPGPGTSSSTAES PGPGTSTEPSEGSAPGTSSTSCSPSGEAPGTSPSGESSTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTA



	PETSPSGESCTAPGSTSASR
Seg 193	SAGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGCAGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTCSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTACSSPGSSASR
Seg 194	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAATSGSETPGTSESATPES GPGTESASK
Seg 195	SAGSPTGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASR
Seg 196	SAGSPTGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSASASR
Seg 197	SAGSPGSCAGSPTSTEEGTSESACPEGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTCTEPSE GSAPGTSTEPSCSAPGTSESATPESCPGSEPAATSGSETPGSCPAATSGSETPGSPAGSCTS TEEGTSESATPESCPGTSESASR
Seg 198	SAGSPTGCGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSCGSPASASR
Seg 199	SAGSPTGCGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGGSESA PESGPGSEPAATSGSETPGSEPAATSGSETCGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GCAPGSEPAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSCGSPASASR

В другом осуществлении в данном изобретении предложены инсерции, обеспечивающие вставки лизина в виде части более длинной последовательности, определяемой как лизиновый участок. Примеры лизиновых участков показаны в табл. 4. Преимущество фланкирования всех лизиновых участков в полипептиде XTEN по отношению к подобным или идентичным последовательностям в том, что это приводит к более однородной химической реакционной способности каждого лизинового остатка. Другое преимущество приводит к получению возможности выполнять пептидное картирование для измерения степени связывания нагрузочных веществ. Примеры включают участки I\_L6, I\_L7 и I\_L8 в табл. 4. Эти участки содержат остатки глутаминовой кислоты, которые облегчают пептидное картирование с использованием GluC-протеазы. В другом осуществлении в данном изобретении предложены инсерции, обеспечивающие вставки цистеина в виде части более длинной последовательности, определяемой как цистеиновый участок. Примеры цистеиновых участков показаны в табл. 5. Преимущество фланкирования всех цистеиновых участков в полипептиде XTEN по отношению к подобным или идентичным последовательностям в том, что это приводит к более однородной химической реакционной способности каждого цистеинового остатка. Другое преимущество приводит к получению возможности выполнять пептидное картирование для измерения степени конъюгации нагрузочных веществ. Примеры включают участки I\_C4, I\_C7, I\_C8 и I\_C9 в табл. 5. Эти участки содержат остатки глутаминовой кислоты, которые облегчают пептидное картирование с использованием GluC-протеазы. Эти участки могут быть внедрены в конструкции, кодирующие имеющиеся полипептиды XTEN с помощью традиционных методов ПЦР, как описано выше и в примерах. Олигонуклеотиды, кодирующие эти участки могут быть внедрены в конструкции, кодирующие имеющиеся полипептиды XTEN с помощью традиционных методов ПЦР. Например, в одном осуществлении, в котором имеющийся ген полноразмерного полипептида XTEN должен быть модифицирован с помощью нуклеотидов, кодирующих один или большее количество остатков цистеина или лизина, олигонуклеотид может быть создан таким, что кодирует цистеин или лизин и таким, который проявляет частичную гомологию и может гибридизоваться с одной или более коротких последовательностей полипептида XTEN, что приводит к акту рекомбинации и замещению имеющегося кодона цистеина или лизина данного гена XTEN (см., например, примеры 6 и 7 касательно описания общих методов). В одном иллюстративном осуществлении такая рекомбинация приводит к замещению в аминокислотной последовательности GGSPAGSCTSP участка I\_C1. Тем не менее эти олигонуклеотиды могут быть сконструированы для замещения цистеина (или лизина) в разных положениях мотива или для включения в мотив второго цистеина (или лизина). Цистеин- или лизинкодирующие олигонуклеотиды могут быть сконструированы для гибридизации с заданным сегментом последовательности в разных

точках вдоль известной ХТЕН-последовательности для обеспечения их внедрения в ген, кодирующий полипептид ХТЕН. Таким образом, в данном изобретении подразумевается, что множественные генные конструкции полипептидов ХТЕН могут быть созданы с помощью внедрения в разные положения в пределах ХТЕН-последовательности остатков цистеина или лизина путем выбора сайтов рестрикции в пределах ХТЕН-последовательности и с помощью конструкции олигонуклеотидов, пригодной для получения заданного положения и кодирующей цистеин или лизин, включая использование сконструированных олигонуклеотидов, что приводит к получению многократных инсерций в такие же ХТЕН-последовательности. Принимая во внимание конструкцию, выбор одного или более таких олигонуклеотидов с известной последовательностью полипептида ХТЕН и надлежащее применение способов этого изобретения может быть оценено и потом подтверждено секвенированием конечного гена полипептида ХТЕН потенциального количества замещенных реакционноспособных остатков цистеина или лизина, внедренных в полноразмерный полипептид ХТЕН.

Таблица 4

Примеры лизиновых участков	
Обозначение	Аминокислотная последовательность
I L1	GGSPAGSKPTSP
I L2	GASASKPAPSTG
I L3	PKP
I L4	PPKPP
I L5	GGKPG
I L6	EGGKPGES
I L7	EGGSPAGSKPTSPE
I L8	EGASASKPAPSTGE

Таблица 5

Примеры цистеиновых участков	
Обозначение	Последовательность
I C1	GGSPAGSCTSP
I C2	GASASCAPSTG
I C3	GPEPTCPAPSG
I C4	TAEAAGCGTAEAA
I C5	GECEP
I C6	GRPCRП
I C7	GETSPAGSCTSPТЕТ
I C8	TESGRPCRПSET
I C9	GPEPTCPAPSEG

Полипептид ХТЕН может быть сконструирован так, чтобы включать оба вида остатков лизина и цистеина для конъюгации, показанной на фиг. 1D. Что дает полипептиду возможность для конъюгации двух различных нагрузочных веществ с таким же ХТЕН-полимером, используя способы конъюгации, направленные на реакцию с функциональными группами или линкерами, присоединенными к цистеину или лизину. Такие смешанные нагрузочные вещества могут обладать адитивным и/или синергическим фармакологическим действием при назначении пациенту в виде одной композиции. Альтернативно, смешанные нагрузочные вещества могут быть комбинацией нацеленного компонента и активным нагрузочным веществом для того, чтобы доставить фармакофор в требуемую зону у пациента. Контролируя количество и положение остатков лизина и цистеина, каждый разработчик может контролировать количество и положение присоединенных нагрузочных веществ. Это дает возможность разработчику регулировать относительную активность и селективность нагрузочных веществ в получаемом конъюгате ХТЕН-нагрузочное вещество.

Структура, выбор и способы получения веществ данного изобретения дают возможность создания сконструированных полипептидов ХТЕН, которые проявляют реакционную способность с электрофильной функциональностью. Эти способы создания предлагаемых конъюгатов, представленных в этом тексте, дают возможность создавать конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, конъюгаты полипептид ХТЕН-кросс-линкер и конъюгаты полипептид ХТЕН-азидные/алкиновые реактанты с линкерными молекулами или молекулами нагрузочных веществ, добавляемых в определенных сайтах, как схематически показано на фиг. 1. Нагрузочные вещества, кросс-линкеры и азидные/алкиновые реактанты могут быть сайт-специфическими и эффективно соединяться с N- или C-концами полипептида ХТЕН, с цистеинсодержащими полипептидами ХТЕН с тиоловыми реакционноспособными группами или с лизинсодержащими полипептидами ХТЕН данного изобретения с реакционноспособными аминогруппами и с  $\alpha$ -аминогруппами N-конца полипептида ХТЕН, как более полно описано ниже, а потом очищаться и характеризоваться, как схематически показано на фиг. 40, применяя, к примеру, помимо прочих методы, более подробно описанные в примерах.

#### 4. Длина последовательности.

В другом аспекте в данном изобретении предлагаются ХТЕН-последовательности различной длины для внедрения в эти композиции, при этом длина ХТЕН-последовательности(ей) выбирается на основе определенных свойств или функций, которые требуется достичь для этой композиции. В зависимости от предполагаемого свойства или функции эти конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество включают ХТЕН-последовательности короткой или промежуточной длины или более длинные ХТЕН-последовательности, или мультимеры коротких, промежуточных или длинных полипептидов ХТЕН, которые могут служить переносчиками. В то же время не предполагая ограничений, данный полипептид ХТЕН или фрагменты полипептида ХТЕН состоят из коротких сегментов из от около 6 до около 99 аминокислотных остатков, промежуточные длины от около 100 до около 399 аминокислотных остатков и большие длины от около 400 до около 1000 и вплоть до около 3000 аминокислотных остатков. Поэтому данные полипептиды ХТЕН, используемые как участники конъюгации для внедрения в предложенные конъюгаты, включают полипептиды ХТЕН или фрагменты полипептидов ХТЕН с длинами около 6, или около 12, или около 36, или около 40, или около 48, или около 72, или около 96, или около 144, или около 288, или около 400, или около 432, или около 500, или около 576, или около 600, или около 700, или около 800, или около 864, или около 900, или около 1000, или около 1500, или около 2000, или около 2500, или вплоть до около 3000 аминокислотных остатков по длине. В других случаях данные ХТЕН-последовательности могут быть от около 6 до около 50, от около 50 до около 100, от около 100 до 150, от около 150 до 250, от около 250 до 400, от около 400 до около 500, от около 500 до около 900, от около 900 до 1500, от около 1500 до 2000, или от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков по длине. Точная длина ХТЕН-последовательностей, внедренных в предложенные конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, могут варьировать без негативного влияния на биологическую активность таких конъюгатов. В одном осуществлении одна или большее количество последовательностей ХТЕН могут быть выбраны из одного из семейств ХТЕН-последовательностей; например AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD. В некоторых вариантах осуществления изобретения данные последовательности ХТЕН, используемые для создания предложенных конъюгатов, включают последовательности ХТЕН, выбранные из каких-либо последовательностей из табл. 2, 3 и 22-25, которые могут быть присоединены к компоненту нагрузочного вещества непосредственно или через кросс-линкеры, раскрытые в данном тексте. В других вариантах один или большее количество последовательностей ХТЕН, используемые для создания предложенных конъюгатов, включают ХТЕН-последовательность, обладающую по меньшей мере около 80% идентичностью последовательности или в других случаях 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностями ХТЕН, выбранными из табл. 2, 3, 22-25, или их фрагментов при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В некоторых вариантах осуществления предложенные конъюгаты состоят из 2, 3, 4 или более ХТЕН последовательностей, отличающихся тем, что суммарная длина остатков ХТЕН-последовательностей больше чем от около 100 до около 3000, или от около 400 до около 2000, или от около 800 до 1000 аминокислотных остатков и ХТЕН-последовательности могут быть идентичными или они могут отличаться по набору или длине последовательности. Как используется в данном тексте, под термином "суммарная длина" подразумевается объединение общей длины в аминокислотных остатках, когда в конъюгат включено более одного полипептида ХТЕН.

Более подробно описанные ниже способы, в которых раскрывают конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, разработаны путем выбора длины полипептида ХТЕН и способа соединения его с реактантом кросс-линкера или с нагрузочным веществом для приобретения физико-химического свойства (например, стабильности или растворимости) или для получения целевого периода полувыведения или сохранения активности, когда конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество вводится пациенту.

Полипептиды ХТЕН используются в композициях как переносчики, данное изобретение использует преимущество открытия, которое увеличивает длину неповторяющихся неструктурированных полипептидов, улучшающее неструктурированность полипептидов ХТЕН и соответственно улучшающее физико-химические и фармакокинетические свойства конструкций, содержащих ХТЕН-носитель. В общем полипептиды ХТЕН в виде мономеров или мультимеров с суммарными длинами больше чем около 400 остатков, внедряясь в конъюгаты, приводят к продлению периода полувыведения по сравнению с более короткими суммарными длинами последовательностей, например короче чем около 280 остатков. Как более полно описано ниже в примерах, пропорциональные увеличения длины полипептидов ХТЕН, даже если они получены путем повторений одного семейства мотивов последовательностей (например, четыре мотива AE из табл. 1), приводит к получению последовательности с большим процентным содержанием структуры статистического клубка при определении с помощью GOR-алгоритма или пониженным содержанием  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -слоев при определении с помощью алгоритма Чоу-Фасмана, по сравнению с более короткими длинами полипептидов ХТЕН. Кроме того, увеличение длины неструктурированного полипептидного участника гибридизации, как описано в примерах, приводит к получению конструкции с непропорциональным увеличением конечного периода полувыведения по сравнению с полипептидами, взаимодействующими с неструктурированными полипептидными участниками с более короткими длинами. В некоторых вариантах осуществления, в которых полипептид ХТЕН служит главным образом

переносчиком, данное изобретение охватывает конъюгационные композиции XTEN, состоящие из двух, трех, четырех или более полипептидов XTEN, при этом суммарная длина XTEN-последовательности этих белков XTEN больше чем от около 100, 200, 400, 500, 600, 800, 900 или 1000 до около 3000 аминокислотных остатков, при этом такая конструкция выявляет улучшенные фармакокинетические свойства при введении пациенту по сравнению с нагрузочным веществом, неприсоединенным к полипептиду XTEN и назначаемому в сравнимой дозе. В одном варианте вышеуказанного осуществления каждая из двух или более XTEN-последовательностей выявляет по меньшей мере около 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 98% или больше идентичности к последовательности, выбранной из какой-либо последовательности из табл. 2, 3 или 22-25, а оставшаяся последовательность(и) носителя, если такая есть, содержит по меньшей мере 90% гидрофильных аминокислот и меньше чем около 2% всей последовательности состоит из гидрофобных или ароматических аминокислот или цистеина. Улучшенные фармакокинетические свойства конъюгата XTEN-нагрузочное вещество в сравнении с нагрузочным веществом, не соединенным полипептидом XTEN, более полно описаны ниже.

##### 5. Сегменты XTEN из предшественников полипептидов XTEN.

В другом аспекте в данном изобретении предлагаются способы создания XTEN-последовательности из фрагментов короткой или промежуточной длины из более длинных "донорских" XTEN-последовательностей, при этом более длинная донорская XTEN-последовательность является укороченной на N-конце или C-конце или представляет сегменты, полученные путем протеолиза полипептидов XTEN, содержащих последовательности действия протеаз, приводя таким образом к получению коротких или промежуточных фрагментов XTEN. В примерах, не ограничивающих осуществление, производительность AG864 из 864 аминокислотных остатков может быть фрагментирована для получения последовательностей AG144 из 144 остатков, AG288 из 288 остатков, AG576 из 576 остатков или других фрагментов промежуточных длин, в то время как производительность AE864 может быть фрагментирована для получения нескольких последовательностей AE144, производительности AE288 или последовательности AE576 из 288 или 576 остатков или других фрагментов более коротких или промежуточных длин. Подобным образом, можно манипулировать с молекулой ДНК, кодирующей более длинные "донорские" последовательности для внедрения остатков цистеина или лизина, которые предполагается использовать в конъюгатах с короткими или промежуточными длинами последовательностей XTEN. Специально предусмотрено, что такой подход может быть использован с любым из осуществлений полипептидов XTEN, описанных в данном тексте, или с любыми последовательностями, перечисленными в табл. 2, 3, 21 и 22, для получения полипептида XTEN требуемой длины.

В другом аспекте в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с расщепляемыми последовательностями, внедренными внутрь последовательности через определенные интервалы, такие, чтобы полипептид XTEN мог процессироваться расщеплением на 2, 3, 4, 5 или 6 более коротких пептидов XTEN однородной длины. Как показано на фиг. 96А, мономерный полипептид XTEN сконструирован с двумя внутренними расщепляемыми последовательностями так, чтобы обрабатываться протеазой в условиях, эффективных для обеспечения расщепления всех расщепляемых последовательностей, что приводит к получению трех XTEN-сегментов однородной длины. Кроме того, этот полипептид XTEN сконструирован с такой последовательностью, что также приводит к получению XTEN-сегментов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность, включая остаточную расщепляемую последовательность. В одном варианте в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с определенной последовательностью, содержащей 1, 2, 3, 4 или 5 аргининовых (R) остатков внутри XTEN-последовательности и разделенных однородными интервалами вдоль XTEN-последовательности, соединяющими идентичные XTEN-сегменты, при этом обработка трипсином приводит к расщеплению полипептида XTEN на XTEN-сегменты, имеющие идентичную длину и последовательность. В вышеуказанных осуществлениях остатки аргинина не присоединены к остаткам пролина в соседнем P1' положении. Таким образом, обработкой вышеуказанных полипептидом трипсином полипептид XTEN с 1 внутренним аргининовым остатком в результате разделится на 2 идентичных XTEN-сегмента, полипептид XTEN с 2 внутренними аргининовыми остатками в результате разделится на 3 идентичных XTEN-сегмента и т.д. В другом варианте каждый аргининовый остаток вышеуказанных осуществлений замещается лизиновыми остатками. В другом варианте в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с определенной последовательностью, содержащей 1, 2, 3, 4 или 5 последовательностей, расщепление внутри XTEN-последовательности и разделенных однородными интервалами вдоль XTEN-последовательности, при этом каждая расщепляемая последовательность представляет собой SASRSA, и обработка трипсином приводит к расщеплению полипептида XTEN на XTEN-сегменты, имеющие идентичную длину и последовательность. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN по меньшей мере с около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 6. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN по меньшей мере с около 90%, или по меньшей мере около 91%, или

по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 6. При этом полипептид ХТЕН дополнительно включает первый и второй аффинный маркер, в котором каждый из аффинных маркеров присоединены к ХТЕН с помощью расщепляемой последовательности к N- и С-концам ХТЕН соответственно, при этом каждая расщепляемая последовательность способна расщепляться трипсином, и при этом первый аффинный маркер отличается от второго аффинного маркера и каждый независимо выбран из группы, состоящей из аффинных маркеров, отраженных в табл. 7. Вышеприведенный вариант осуществления показан на фиг. 96В, при этом обработка протеазой полипептида ХТЕН с двумя внутренними расщепляемыми последовательностями и N-концевым и С-концевым аффинным маркером, каждый из которых присоединен к полипептиду ХТЕН через расщепляемую последовательность, приводит к расщеплению конструкции на три ХТЕН-сегмента одинаковой длины и высвобождению двух аффинных маркеров, полученный препарат этого варианта в последствии может быть процессирован в основном в гомогенный полипептид ХТЕН, как описано в данном тексте ниже. В данном изобретении предусмотрены вариации полипептидов ХТЕН, содержащие такие однообразные расщепляемые последовательности и их распределение в этой последовательности.

Таблица 6

## ХТЕН-предшественники с внутренними расщепляемыми последовательностями

Название ХТЕН	Аминокислотная последовательность
AE864_R2 (2x AE432_R1 )	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTESASR
AE864_R3 (3x AE288_R1 )	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASRSAGSPTGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASRSAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSE ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE

	PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE ESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
AE864_R6 (6x AE144_ R1)	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASRSAGSPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSE ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTE SASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASR
Seg 200 (3x Seg 195)	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASRSAGSPTGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASRSAGSPTGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTACSEGSAPSASR
Seg 201 (3x Seg 196)	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSCASASRSAGSPTGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSCASASRSAGSPTGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSCASASR

#### 6. Суммарный заряд.

В других вариантах осуществления полипептиды XTEN обладают неструктурированным характером, обусловленным внедрением аминокислотных остатков со свободным зарядом и содержащие низкое процентное содержание или не содержащие гидрофобные аминокислоты в XTEN-последовательности. Общий суммарный заряд и плотность суммарного заряда контролируется модификацией содержания заряженных аминокислот в XTEN-последовательностях на положительный или отрицательный с получением суммарного заряда, обычно представляемого как процентное содержание аминокислот в полипептиде, которые вносят вклад в состояние заряда за пределами этих остатков, которое аннулируется остатком с противоположным зарядом. В некоторых вариантах осуществления плотность суммарного заряда конъюгата полипептида XTEN может составлять выше +0,1 или ниже -0,1 заряда на остаток. Термином "суммарная плотность заряда" белка или пептида в данном тексте обозначается суммарный заряд, деленный на общее количество аминокислот в белке. В других вариантах суммарный заряд полипептида XTEN может составлять около 0, около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, или около 20% или больше. Благодаря суммарному заряду некоторые полипептиды XTEN имеют изоэлектрическую точку (pI), равную 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 или даже 6,5. В одном варианте полипептид XTEN будет иметь изоэлектрическую точку между 1,5 и 4,5 и нести в физиологических условиях суммарный отрицательный заряд.

Поскольку большинство тканей и поверхностей организма человека и животного несут отрицательный суммарный заряд, то в некоторых осуществлениях XTEN-последовательности сконструированы так, чтобы нести отрицательный суммарный заряд для минимизации неспецифических взаимодействий между композициями, содержащими полипептиды XTEN и различными поверхностями, такими как кровеносные сосуды, здоровые ткани или различные рецепторы. Без связи с определенной теорией полипептид XTEN может принимать открытые конформации из-за электростатического отталкивания между отдельными аминокислотами полипептида XTEN, который самостоятельно несет отрицательный суммарный заряд, который распределен вдоль последовательности полипептида XTEN. В некоторых осуществлениях XTEN-последовательность сконструирована с по меньшей мере от 90 до 95% заряженных остатков, разделенных другими незаряженными остатками, такими как серин, аланин, треонин, пролин или

глицин, что ведет к более однородному распределению заряда, лучшей экспрессии или поведению при очистке. Такое однородное распределение отрицательного суммарного заряда на протяженных длинах полипептидов XTEN также вносит вклад в получение неструктурированной конформации этого полимера, которая, в свою очередь, может привести к эффективному увеличению гидродинамического радиуса. В предпочтительных осуществлениях отрицательный заряд предлагаемого полипептида XTEN обеспечивается внедрением остатков глутаминовой кислоты. Как правило, остатки глутаминовой кислоты располагаются однородно вдоль XTEN-последовательности. В некоторых случаях полипептид XTEN может содержать около 10-80, или около 15-60, или около 20-50 остатков глутаминовой кислоты на 20 кДа полипептида XTEN, что может обеспечить получение полипептидов XTEN с заряженными остатками, которые имеют очень подобные значения pKa, что может повысить гомогенность заряда препарата и сузить его изоэлектрическую точку, улучшить физико-химические свойства получаемого продукта XTEN-нагрузочное вещество для того, чтобы, таким образом, упростить процедуры очистки. Например, если требуется получить полипептид XTEN с отрицательным зарядом, последовательность XTEN может быть выбрана полностью из семейства последовательностей AE, в которых около 17% суммарного заряда обеспечивается благодаря включению глутаминовой кислоты, или могут быть включены разные пропорции мотивов, содержащих глутаминовую кислоту из табл. 1, для обеспечения требуемой степени суммарного заряда. Не ограничивающие примеры последовательностей AE XTEN, включают, но не ограничивают использование последовательностей AE36, AE42, AE144, AE288, AE432, AE576, AE624, AE864 и AE912 из табл. 2 и 21 или их фрагменты. В одном варианте реализации XTEN-последовательность из табл. 2 или 3 может быть модифицирована для включения дополнительных остатков глутаминовой кислоты для достижения требуемого отрицательного суммарного заряда. Соответственно, в одном осуществлении данное изобретение предлагает полипептид XTEN, в котором XTEN-последовательности содержат около 1, 2, 4, 8, 10, 15, 17, 20, 25 или даже около 30% глутаминовой кислоты. В некоторых случаях, полипептид XTEN может содержать около 10-80, или около 15-60, или около 20-50 остатков глутаминовой кислоты на 20 кДа полипептида XTEN, что может обеспечить получение полипептидов XTEN с заряженными остатками, которые имеют очень подобные значения pKa, что может повысить гомогенность заряда препарата и сузить его изоэлектрическую точку, улучшить физико-химические свойства получаемой конъюгационной композиции полипептида XTEN для того, чтобы, таким образом, упростить процедуры очистки. В одном варианте в данном изобретении для достижения отрицательного суммарного заряда в дополнение к глутаминовой кислоте предусмотрено включение в полипептид XTEN до 5% остатков аспарагиновой кислоты.

Без связи с определенной теорией полипептид XTEN в конъюгатах XTEN-нагрузочное вещество с большим отрицательным суммарным зарядом, как ожидается, обладает меньшим неспецифическим взаимодействием с различными отрицательно-заряженными поверхностями, такими как кровеносные сосуды, ткани или различные рецепторы, что может вносить дополнительный вклад в снижение активного выведения препарата. И наоборот, считается, что полипептид XTEN конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество с низким (или отсутствующим) суммарным зарядом будет обладать высокой степенью взаимодействия с поверхностями, которые могут потенцировать активность присоединенного конъюгата в сосудистой системе или тканях. В других осуществлениях, где требуется отсутствие суммарного заряда, полипептид XTEN может быть выбран, к примеру, из компонентов XTEN AG, таких как мотивы AG из табл. 1, или тех мотивов AM из табл. 1, у которых нет заряда. Не ограничивающие примеры последовательностей AG XTEN, включают, но не ограничивают использование последовательностей семейств AG 36, 42, 144, 288, 576 и 864 из табл. 2 и 22 или их фрагментов. В другом варианте полипептид XTEN может включать варьирующие пропорции мотивов AE и AG для того, чтобы получить суммарный заряд, который считается оптимальным для данного использования или для поддержания данного физико-химического свойства.

Конъюгаты полипептидов XTEN настоящего изобретения не содержат или имеют низкое содержание положительно заряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид XTEN может содержать меньше чем 10% аминокислотных остатков с положительным зарядом, или меньше чем около 7%, или меньше чем около 5%, или меньше чем около 2%, или меньше чем около 1% аминокислотных остатков с положительным зарядом. Тем не менее, данное изобретение предусматривает конструкции, в которых определенное количество аминокислот с положительным зарядом, таких как лизин, внедрены в полипептид XTEN для обеспечения конъюгации между эпсилон-аминогруппой лизина и реакционноспособной группы нагрузочного вещества или кросс-линкера, которые должны присоединяться к остову молекулы XTEN. В одном варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN предложенных конъюгатов содержит от около 1 до около 100 лизиновых остатков, или от около 1 до около 70 лизиновых остатков, или от около 1 до около 50 лизиновых остатков, или от около 1 до около 30 лизиновых остатков, или от около 1 до около 20 лизиновых остатков, или от около 1 до около 10 лизиновых остатков, или от около 1 до около 5 лизиновых остатков, или от около 1 до около 3 лизиновых остатков или в другом варианте только один лизиновый остаток. С использованием вышеуказанных лизинсодержащих полипептидов XTEN могут быть сконструированы конъюгаты, которые включают полипептид XTEN, необязательный линкер плюс нагрузочное вещество, пригодное для лечения болезненного со-

стояния пациента, при этом максимальное количество молекул агента нагрузочного вещества присоединяется к ХТЕН-компоненту по определенному количеству остатков лизина с реакционноспособной боковой группой (например, концевой амин), внедренных в полипептид ХТЕН.

#### 7. Низкая иммуногенность.

В другом аспекте в данном изобретении предлагаются композиции полипептидов ХТЕН, обладающие низкой степенью иммуногенности или являющиеся в основном неиммуногенными. Не низкую иммуногенность полипептида ХТЕН могут влиять несколько факторов, например неповторяющаяся последовательность, неструктурированная конформация, высокая степень растворимости, низкая степень или отсутствие самоагрегации, низкое содержание или отсутствие протеолитических сайтов в пределах последовательности и низкое содержание или отсутствие эпитопов в ХТЕН-последовательности.

Конформационные эпитопы формируются участками поверхности белка, которая состоит из множества непрерывных последовательностей аминокислот белкового антигена. Точный фолдинг этого белка приводит эти последовательности к образованию четко выраженных стабильных пространственных конфигураций или эпитопов, которые могут распознаваться как "чужеродные" гуморальной иммунной системой хозяина, приводя к образованию антител к этому белку или активизации клеточно-опосредованного иммунного ответа. В последнем случае у индивида иммунный ответ к белку находится под сильным влиянием распознавания эпитопа Т-клетками, которое является функцией от специфичности связывания этого пептида с аллотипом рецепторов HLA-DR индивида. Вовлечение пептидного комплекса МНС II класса с помощью рецептора распознавания Т-клеток на поверхности Т-клеток вместе с перекрестным связыванием определенных других корецепторов, таких как молекула CD4, может индуцировать активированное состояние у Т-клеток. Активация ведет к высвобождению цитокинов других лимфоцитов, таких как В-клетки, синтезирующие антитела, или активации Т-клеток киллеров, как полное проявление клеточного иммунного ответа.

Способность пептида связываться с данной молекулой МНС II класса для презентации на поверхности АПК (антиген-презентирующей клетки) зависит от нескольких факторов; наиболее заметно участие его первичной последовательности. В одном варианте осуществления более низкая степень иммуногенности достигается конструированием ХТЕН-последовательностей, которые устойчивы к процессированию в антиген-презентирующих клетках, и/или выбором последовательностей, которые не связываются легко с рецепторами МНС. В данном изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-реактант клик-химии с в основном неповторяющимися полипептидами ХТЕН, сконструированными для снижения связывания с рецепторами МНС II класса, а также устранения образования эпитопов для рецепторов Т-клеток или связывания антител, что приводит к низкой степени иммуногенности этих конъюгатов. Устранение иммуногенности может объясняться, по меньшей мере частично, следствием конформационной гибкости ХТЕН-последовательностей; например отсутствием вторичной структуры, благодаря выбору и порядку аминокислотных остатков. Например, особым интересом пользуются последовательности, обладающие слабой склонностью принимать в водных растворах или в физиологических условиях компактные свернутые конформации, которые могут приводить к образованию конформационных эпитопов. Введение полипептидов, содержащих ХТЕН, применяя традиционные терапевтические способы и дозировки, обычно не приведут к образованию нейтрализующих антител к ХТЕН-последовательностям и также понизят иммуногенность нагрузочных веществ в данных конъюгатах.

В одном варианте осуществления ХТЕН-последовательности, используемые у предложенного полипептида, могут в основном быть свободными от эпитопов, распознаваемых Т-клетками человека. Удаление таких эпитопов с целью создания менее иммуногенных белков было раскрыто ранее; см., к примеру, WO 98/52976, WO 02/079232 и WO 00/3317, которые включены в данный документ посредством ссылки. Assays for human T cell epitopes have been described (Stickler, M., et al. (2003) J. Immunol. Methods, 281: 95-108). Особый интерес представляют последовательности пептидов, которые могут быть олигомеризованы без получения эпитопов Т-клеток или несвойственных человеческому организму последовательностей. Это достигается испытанием прямых повторностей таких последовательностей на наличие Т-клеточных эпитопов и на встречаемость 6-15-мерных и, особенно, 9-мерных последовательностей несвойственных человеческому организму, с последующим изменением структуры ХТЕН-последовательностей для удаления или разрушения последовательности эпитопов. В некоторых вариантах осуществления ХТЕН-последовательности являются в основном неиммуногенными, благодаря ограничению количества эпитопов полипептида ХТЕН, для которых предсказана возможность связывания рецепторов МНС. Со снижением количества эпитопов, способных связывать рецепторы МНС, появляется сопутствующее снижение потенциала активации Т-клеток, а также функционирование Т-клеточных хелперов, снижение активизации В-клеток или повышенной экспрессии и ослабление образования антител. Низкая степень рассчитанных Т-клеточных эпитопов может быть определена алгоритмами вычисления эпитопов, таких как, например, TERITOPRE (Sturniolo, T., et al. (1999) Nat. Biotechnol., 17: 555-61), как показано в примере 46. Число TERITOPRE для данной области пептида в пределах белка является значением  $\log K_d$  (константа диссоциации, аффинности, скорости диссоциации) связывания такого участка пептида с множеством наиболее встречаемых аллелей МНС человека, как показано в публикации Stur-



niolo, T. et al. (1999) *Nature Biotechnology* 17:555). Эти числа находятся в диапазоне по меньшей мере 20 log, от около 10 до около -10 (соответствует константам связывания от  $10e^{10}$  до  $10e^{-10}$  К<sub>d</sub>), и могут быть снижены удалением гидрофобных аминокислот, которые служат анкерными остатками во время представления пептидов комплексам МНС, таким как М, I, L, V, F. В некоторых вариантах ХТЕН-компонент, встроенный в конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество, ХТЕН-кросс-линкер или ХТЕН-реактант клик-химии, не несет рассчитанный Т-клеточный эпитоп при пороговом значении числа ТЕРИТОРЕ около -5, или -6, или -7, или -8, или -9, или при числе ТЕРИТОРЕ равном -10. Как используется в данном тексте, число "-9" является более ограничивающим пороговым значением ТЕРИТОРЕ, чем число равное -5.

#### 8. Увеличенный гидродинамический радиус.

В другом аспекте предложенный полипептид ХТЕН, применяемый как участник гибридизации, имеет большой гидродинамический радиус; это свойство, которое обеспечивает соответственное увеличение кажущейся молекулярной массы композиции ХТЕН-нагрузочное вещество по сравнению с нагрузочным веществом без полипептида ХТЕН. Как подробно объясняется в примере 26, связывание ХТЕН с последовательностями лечебных белков приводит к получению композиций, которые могут иметь увеличенные гидродинамические радиусы, увеличенные кажущиеся молекулярные массы и увеличенный кажущийся коэффициент молекулярной массы по сравнению с лечебным белком, не связанный с полипептидом ХТЕН. Например, терапевтические применения, в которых требуется пролонгированный период полувыведения, композиций, в которых один или большее количество полипептидов ХТЕН с большим гидродинамическим радиусом присоединены к нагрузочному веществу, могут существенно увеличить гидродинамический радиус этого конъюгата с превышением гломерулярной поры размером около 3-5 нм (соответствует кажущейся молекулярной массе около 70 кДа) (Caliceti. *Sci.* 2003. *Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates.* *Adv Drug Deliv Rev* 55:1261-1277), что приводит к пониженному почечному выведению циркулирующих белков с соответствующим увеличением конечного периода выведения и другим улучшениям фармакокинетических свойств. Гидродинамический радиус белка обеспечивается его молекулярной массой, а также его структурой, включающей форму или компактность. Без связи с определенной теорией полипептид ХТЕН может принимать открытые конформации из-за электростатического отталкивания между отдельными зарядами внедренных заряженных остатков полипептида ХТЕН, а также из-за присущей гибкости, обусловленной определенными аминокислотами в последовательности с недостаточным потенциалом для появления вторичной структуры. Открытая, расширенная и неструктурированная конформация полипептида ХТЕН обладает большим пропорциональным гидродинамическим радиусом по сравнению с полипептидами со сравнимыми длинами последовательностей и/или молекулярными массами, которые имеют вторичную или четвертичную структуры, такие как обычные глобулярные белки. Методы определения гидродинамических радиусов хорошо известны в этой области знаний, такие как методы с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ), описанные в патентах США №№ 6406632 и 7294513. Пример 26 показывает, что увеличение длины полипептида ХТЕН приводит к пропорциональному увеличению гидродинамического радиуса, кажущейся молекулярной массы и/или коэффициента молекулярной массы и, таким образом, дает возможность направить полипептид ХТЕН-нагрузочное вещество к желаемому снижению значений кажущихся молекулярных масс и гидродинамических радиусов. Соответственно, в некоторых вариантах полипептид ХТЕН-нагрузочное вещество может быть сконфигурирован с полипептидом ХТЕН так, чтобы получаемый конъюгат мог обладать гидродинамическим радиусом по меньшей мере около 5 нм, или по меньшей мере около 8 нм, или по меньшей мере около 10 нм, или около 12 нм, или около 15 нм, или около 20 нм, или около 30 нм или больше. В вышеуказанных осуществлениях большой гидродинамический радиус, присущий полипептидам ХТЕН в конъюгате ХТЕН-нагрузочное вещество, может вести к пониженному клиренсу получаемого конъюгата, увеличению конечного периода полувыведения и увеличению среднего времени удержания. Как описано в примерах, когда молекулярные массы ХТЕН-содержащих композиций являются производными от результатов анализа эксклюзивной хроматографии, открытая конформация полипептида ХТЕН из-за низкой степени вторичной структуры приводит к увеличению кажущейся молекулярной массы конъюгатов, в которые они введены. В одном варианте осуществления в данном изобретении применяется открытие, в котором увеличение кажущейся молекулярной массы может достигаться присоединением не только одного полипептида ХТЕН заанной длины, но также присоединением 2, 3, 4 или более полипептидов ХТЕН пропорционально более коротких длин, в линейном виде или в виде тримерной или тетрамерной разветвленной конфигурации, как более полно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления полипептид ХТЕН, включающий нагрузочное вещество и один или большее количество полипептидов ХТЕН, выявляет кажущуюся молекулярную массу по меньшей мере около 400 кДа, или по меньшей мере около 500 кДа, или по меньшей мере около 700 кДа, или по меньшей мере около 1000 кДа, или по меньшей мере около 1400 кДа, или по меньшей мере около 1600 кДа, или по меньшей мере около 1800 кДа, или по меньшей мере около 2000 кДа. Соответственно, конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество выявляет кажущуюся молекулярную массу, которая является в около 1,3 раза больше, или около 2 раз больше, или около 3 раз больше или около 4 раз больше, или около 8 раз больше, или около 10 раз больше, или около 12 раз больше, или около 15 раз больше, или в около 20 раз больше, чем действительная молекулярная масса этого конъюгата. В одном варианте изолиро-

ванный конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество любого из осуществлений, раскрытых в данном тексте, выявляет коэффициент кажущейся молекулярной массы в физиологических условиях больше чем около 1,3, или около 2, или около 3, или около 4, или около 5, или около 6, или около 7, или около 8, или около 10, или больше чем около 15. В другом варианте осуществления полипептид ХТЕН-нагрузочное вещество в физиологических условиях коэффициент кажущейся молекулярной массы составляет от около 3 до около 20, или от около 5 до около 15, или от около 8 до около 12, или от около 9 до около 10 относительно действительной молекулярной массы этого конъюгата. В общем, увеличенная кажущаяся молекулярная масса предложенных конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество улучшает фармакокинетические свойства композиции путем сочетания факторов, которые включают пониженный активный клиренс, пониженное почечное выведение и пониженные потери при прохождении через капиллярные и венозные соединения.

9. Композиции и способы очистки полипептидов ХТЕН как в основном гомогенных препаратов.

Объектом данного изобретения является предложение композиций полипептидов ХТЕН и способов получения препаратов, содержащих полипептиды ХТЕН с высокой степенью чистоты и однородности по длине и составу описанных в данном тексте полипептидов ХТЕН. Экспрессия рекомбинантного белка ХТЕН или рекомбинантного белка слияния, содержащего полипептид ХТЕН, в клетке-хозяине обычно как любого глобулярного белка приводит к получению смеси различных веществ, в которой часть белков представлены в виде укороченных версий требуемой длины белка. Эта укорачивание может быть результатом ранней терминации трансляции, нестабильности мРНК или протеолиза в клетке-хозяине. Из-за того, что глобулярные белки обычно эффективно и полностью сворачиваются в свои трехмерные структуры, тогда как укороченные версии - нет, обычные процессы очистки и выделения способны успешно разделять и удалять укороченные версии таким образом, что в данном препарате глобулярных белков достигается высокий уровень гомогенности продукта. Тем не менее, белковые полимеры, такие как полипептиды ХТЕН, уникальны тем, что в их заданной неструктурированной сущности обычно недостает трехмерных структур. Поэтому из-за одного или более вышеупомянутых причин получение гомогенного препарата полноразмерных полипептидов ХТЕН является трудной задачей. Это происходит потому, что неполные или укороченные цепи ХТЕН только слегка отличаются по своим физико-химическим свойствам от требуемых полноразмерных последовательностей, так что традиционные процессы, которые были бы достаточными для очистки глобулярных белков, не эффективны для удаления укороченных полипептидов ХТЕН от продукта экспрессии для того, чтобы получить в основном гомогенный препарат из полноразмерных последовательностей. Несмотря на то, что предложенный полипептид ХТЕН этого изобретения, включая полипептид ХТЕН, присоединенный к нагрузочному веществу, может быть очищен до среднего уровня гомогенности традиционными методами, используемыми для белков, такими как высаливание, ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография, хроматография с помощью адсорбции на гидроксипатите, хроматография с гидрофобным взаимодействием или гель-электрофорез, такие методы сами по себе не приводят к получению препаратов, в которых полипептиды ХТЕН в в основном гомогенны по длине последовательностей.

Предложенные способы, представленные в данном тексте, позволяют получать в основном гомогенный препарат полипептидов ХТЕН посредством одной или нескольких простых стадий очистки. В одном варианте осуществления при практическом применении какого-либо из таких способов настоящего изобретения может использоваться полипептид ХТЕН, сконструированный для дальнейшего включения, в виде белка слияния, аффинных маркеров, расположенных на одном или на обоих N- и C-концах этого полипептида ХТЕН так, что продукт экспрессии может стать объектом для методов очистки для селективного захвата полноразмерного экспрессированного полипептида, при этом удаляются фрагментированные побочные продукты полипептида ХТЕН (см. фиг. 41-42). Не ограничивающие примеры аффинных маркеров, которые могут быть добавлены к концам полипептида ХТЕН, представлены в табл. 7. Не ограничивающие примеры способов конструирования, экспрессии и методов очистки для получения в основном гомогенных полипептидов ХТЕН, описаны в примерах. В некоторых осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом ХТЕН, связанным непосредственно с одним аффинным маркером (таким как, но не ограничиваясь, маркер из табл. 7), соединенном с N- или C-концом полипептида ХТЕН. В других осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом ХТЕН, связанным с одним аффинным маркером (таким как, но не ограничиваясь, маркер из табл. 7) через расщепляемую последовательность, соединенную с N- или C-концом полипептида ХТЕН. В других осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом ХТЕН, связанным непосредственно с одним или двумя различными аффинными маркерами (такими как, но не ограничиваясь, маркер из табл. 7), соединенными с N- и/или C-концом полипептида ХТЕН, как показано на фиг. 41. В других осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом ХТЕН, связанным с одной или двумя расщепляемыми последовательностями (такими как, но не ограничиваясь, расщепляемые последовательности из табл. 8 или 9), каждая из которых, в свою очередь, соединена с различными аффинными маркерами (таким как, но не ограничиваясь, маркеры из табл. 7), соединенными с N- или C-концом или обоими N- или

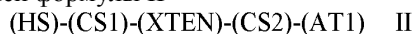
С-концами полипептида XTEN, как показано на фиг. 41. В еще одних осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом XTEN, связанным непосредственно с одним или двумя различными аффинными маркерами (такими как, но не ограничиваясь, маркеры из табл. 7), соединенными с N- и/или С-концом полипептида XTEN, которые дополнительно включают вспомогательную последовательность (такую как, но не ограничиваясь, последовательность из табл. 12), соединенную с N-концом этого белка. Как используется в контексте описанных в данном тексте белков, термин "в основном гомогенный" обозначает, что по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95, 96, 97, 98, 99% или даже больше полипептидных последовательностей имеют идентичную длину последовательностей. Эти процентные значения основаны на процентном значении площади на хроматограмме препарата, проанализированного с помощью ВЭЖХ, или процентном значении площади сканирования препарата, проанализированного с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН или с помощью других таких стандартных методов, известных в этой области, для оценивания чистоты белков.

В одном варианте осуществления в данном изобретении предложен в основном гомогенный полипептид, обладающий конфигурацией формулы I



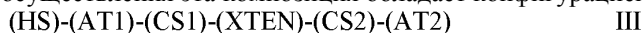
в которой HS - вспомогательная последовательность, AT1 - первый аффинный маркер, CS1 - первая расщепляемая последовательность и XTEN - расширенный рекомбинантный полипептид.

В другом варианте осуществления в данном изобретении предложен в основном гомогенный полипептид, обладающий конфигурацией формулы II



в которой HS - вспомогательная последовательность, AT1 - первый аффинный маркер, CS1 - первая расщепляемая последовательность, CS2 - вторая расщепляемая последовательность и XTEN - расширенный рекомбинантный полипептид.

В другом варианте осуществления эта композиция обладает конфигурацией формулы III



в которой HS - вспомогательная последовательность, AT1 - первый аффинный маркер, AT2 - второй аффинный маркер, CS1 - первая расщепляемая последовательность, CS2 - вторая расщепляемая последовательность и XTEN - расширенный рекомбинантный полипептид.

Полипептидные конструкции, включающие аффинные маркеры, обладают преимущественным свойством по сравнению с полипептидом XTEN, не связанным с аффинными маркерами, что дает возможность очищать их до в основном гомогенной длины последовательностей путем использования хроматографических носителей, с которыми соединены аффинные маркеры. В некоторых осуществлениях классы хроматографических носителей, используемых в данном способе очистки, выбираются из хроматографических носителей, отраженных в табл. 7, которые используются для очистки полипептидов XTEN, связанных с соответственно указанными в таблицах аффинными маркерами. Специалистом в этой области знаний будет отмечено, что классы хроматографических носителей могут охватывать различные химические группы, присоединенные к разным носителям или смолам; например анионообменные носители содержат четвертичные триметиламмониевые и диэтиламиноэтильные группы, связанные со смолами, катионообменные носители содержат сульфо-, сульфопропил-, карбоксиметил- или фосфатные группы, связанные со смолами, носители для хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (НС) содержат этил-, изопропил-, бутил-, фенил- или октилгруппы, связанные со смолами, и носители для ИМАС-хроматографии содержат группы иминодиуксусной и нитрилуksусной кислот, связанные со смолами. Вышеуказанные носители перечислены в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения сферы носителей, которые могут применяться при практическом применении этого изобретения. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептиды XTEN, полученные из полипептидов, содержащих полипептид XTEN, связанный с первым или первым и вторым аффинными маркерами через расщепляемые последовательности (такие как, но не ограничиваясь, расщепляемые последовательности из табл. 8), способные расщепляться протеазой, при этом этот препарат обрабатывается протеазой для разрушения расщепляемых последовательностей, чтобы высвободить из полученного полипептида полипептид XTEN, с последующим проведением стадии хроматографии для связывания и последующего элюирования с дальнейшим выделением в основном гомогенного полипептида XTEN. В одном варианте вышеуказанного осуществления эта протеаза является трипсином и данные расщепляемые последовательности способны разрушаться трипсином, не ограничивающие примеры перечислены в табл. 11 и 15. В другом варианте вышеуказанного осуществления эта протеаза является протеазой TEV и данные расщепляемые последовательности способны разрушаться протеазой TEV. В другом варианте вышеуказанного осуществления разрушенный полипептид XTEN очищается связыванием на хроматографическом носителе MasoCap SP с последующим элюированием соевым или буферным раствором, таким как, но не ограничиваясь, фосфат натрия/NaCl, обеспечивая получение в основном гомогенного полипептида XTEN. Как используется в контексте полипептидов XTEN и/или полипептидов, содержащих последовательность XTEN, сочетание "в основном очищенный"

препарат обозначает, что по меньшей мере около 85%, и предпочтительнее по меньшей мере около 90%, и предпочтительнее по меньшей мере около 91%, и предпочтительнее по меньшей мере около 92%, и предпочтительнее по меньшей мере около 93%, и предпочтительнее по меньшей мере около 94%, и предпочтительнее по меньшей мере около 95% или больше отдельных молекул данного препарата имеют идентичную длину последовательностей; другими словами одно и то же количество аминокислот. Методы, которые могут быть использованы для определения гомогенности длины последовательности, включают масс-спектроскопию, эксклюзионную хроматографию/ВЭЖХ или электрофорез в ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием серебром; эти методы могут применяться по отдельности или вместе для количественного определения степени гомогенности. Обобщенная схема для очищения полипептидов, содержащих полипептиды ХТЕН с последовательностями аффинных маркеров, оптимизированными для очистки, показаны на фиг. 41-42. После очистки маркеры могут протеолитически отщепляться (фиг. 41В) или сохраняться с полипептидами (фиг. 41С). Полипептиды ХТЕН могут быть очищены от загрязняющих веществ благодаря уникальному аминокислотному составу полипептида ХТЕН, как показано на фиг. 42.

В одном варианте осуществления в данном изобретении предложен способ получения в основном очищенного препарата полипептида, содержащего ХТЕН, включающего стадии конструирования гена, кодирующего полипептид ХТЕН и первый аффинный маркер, создавая вектор экспрессии, пригодный для трансформации клетки-хозяина, содержащей функционально связанные с контролирующими последовательностями кодирующие гены, трансформирования клетки-хозяина этим вектором экспрессии, культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии полипептида ХТЕН с присоединенным аффинным маркером, введения неочищенного продукта экспрессии в процесс очистки, который включает стадию аффинной очистки, при котором неочищенный продукт экспрессии наносится на первый хроматографический носитель, селективно связывающий первый аффинный маркер, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования удерживаемого белка в подходящих условиях и выделения элюата, при этом получается выделенный полипептид, в основном гомогенный по длине. В другом варианте осуществления в данном изобретении предложен способ получения в основном гомогенного препарата полипептида, содержащего ХТЕН, включающего стадии конструирования гена, кодирующего полипептид ХТЕН, содержащий первый и второй аффинные маркеры, создавая вектор экспрессии, пригодный для трансформации клетки-хозяина, содержащей функционально связанные с контролирующими последовательностями кодирующие гены, трансформирования клетки-хозяина этим вектором экспрессии, культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии этого полипептида, введения неочищенного продукта экспрессии в процесс очистки, который включает стадию аффинной очистки, при котором неочищенный продукт экспрессии наносится на первый хроматографический носитель, селективно связывающий первый аффинный маркер, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования удерживаемого белка в подходящих условиях и выделения элюата, нанесения выделенного полипептида на второй хроматографический носитель в условиях, эффективных для захватывания этого полипептида со вторым аффинным маркером хроматографическим носителем, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования полипептида ХТЕН в условиях, эффективных для элюирования полипептида ХТЕН, со вторым аффинным маркером, выделения элюата, содержащего полипептид, включающий полипептид ХТЕН с первым и вторым аффинными маркерами, при этом получается выделенный полипептид, в основном гомогенный по длине. В еще одном варианте осуществления в данном изобретении предложен способ получения в основном гомогенного препарата полипептида, содержащего ХТЕН, включающего стадии конструирования гена, кодирующего полипептид ХТЕН, содержащий первый аффинный маркер, присоединенный расщепляемой последовательностью к N-концу кодирующей последовательности ХТЕН, и второй аффинный маркер, присоединенный расщепляемой последовательностью к C-концу кодирующей последовательности ХТЕН, создавая вектор экспрессии, пригодный для трансформации клетки-хозяина, содержащей функционально связанные с контролирующими последовательностями кодирующие гены, трансформирования клетки-хозяина этим вектором экспрессии, культивирования клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии этого полипептида, введения неочищенного продукта экспрессии в процесс очистки, который включает стадию аффинной очистки, при котором неочищенный продукт экспрессии наносится на первый хроматографический носитель, селективно связывающий первый аффинный маркер, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования удерживаемого белка в подходящих условиях и выделения элюата, нанесения выделенного полипептида на второй хроматографический носитель в условиях, эффективных для захватывания этого полипептида со вторым аффинным маркером хроматографическим носителем, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования полипептида ХТЕН в условиях, эффективных для элюирования полипептида ХТЕН со вторым аффинным маркером, с последующей обработкой выделенного полипептида протеазой в условиях, эффективных для высвобождения полипептида ХТЕН из полученного полипептида и нанесения вещества на хроматографический

носитель, способный к захватыванию полипептида XTEN, но не аффинных маркеров, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования полипептида XTEN, выделения элюата, содержащего полипептид XTEN, при этом получается выделенный полипептид, в основном гомогенный по длине. В одном варианте осуществления вышеуказанных способов, описанных в этом параграфе, первый и второй аффинные маркеры выбираются из группы аффинных маркеров, отраженных в табл. 7. В одном осуществлении этого способа первый аффинный маркер присоединен к полипептиду XTEN в виде гибридного белка, содержащего последовательность RPRPRPRPRPRPR, и используемый хроматографический носитель для связывания этого полипептида является носителем SP. В другом осуществлении вышеуказанных способов первый аффинный маркер присоединен к первому концу полипептида XTEN в виде гибридного белка, содержащего последовательность RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, второй аффинный маркер присоединен к второму концу полипептида XTEN, содержащего последовательность НННННННН, первый хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем MacroCap SP, а второй хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем для аффинной хроматографии с иммобилизованным металл-ионом (IMAC). В другом осуществлении вышеуказанных способов первый аффинный маркер связан с расщепляемой последовательностью, присоединенной к первому концу полипептида XTEN в виде гибридного белка, содержащего последовательность RPRPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, второй аффинный маркер присоединен к расщепляемой последовательности к второму концу полипептида XTEN, содержащего последовательность НННННННН или НННННННННН, первый хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем MacroCap SP, второй хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем для аффинной хроматографии с иммобилизованным металл-ионом (IMAC), расщепляемые последовательности содержат аргинин или лизин (включая, но не ограничиваясь, последовательностями из табл. 8 и 9) и разрушаются трипсином, а носитель MacroCap Q является хроматографическим носителем, используемым для связывания полипептида XTEN, высвобожденного от аффинных маркеров или, в альтернативном варианте, высвобожденный полипептид XTEN захватывается как элюат, прохождением препарата, обработанного протеазами, через одну или большее количество катионообменных, НИС и/или IMAC-носителей для захватывания продуктов расщепления и протеазы, оставляя в элюате полипептид XTEN, который после выделения остается в основном гомогенным препаратом. Специалистом в данной области будет отмечено, что порядок и особые условия проведения стадий этого способа будут варьировать в зависимости от композиции полипептида XTEN-аффинный маркер, а также от начального уровня экспрессии и степени загрязнения фрагментированными полипептидами. Например, для определенных композиций XTEN, использование одного аффинного маркера, присоединенного к полипептиду XTEN, будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине. В таких случаях в одном варианте осуществления один аффинный маркер выбирается из группы, состоящей из аффинных маркеров, отраженных в табл. 7. С другими композициями XTEN использование первого и второго аффинных маркеров будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине, и в таких случаях в одном осуществлении первый и второй аффинные маркеры различаются и каждый из них выбирается из аффинных маркеров, отраженных в табл. 7. Специалистом в данной области знаний будет отмечено, что порядок и особые условия проведения стадий этого способа будут варьировать в зависимости от композиции полипептида XTEN-аффинный маркер, а также от начального уровня экспрессии и степени загрязнения фрагментированными полипептидами. Например, для определенных композиций XTEN использование одного аффинного маркера, присоединенного к полипептиду XTEN, будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине. В таких случаях в одном варианте осуществления один аффинный маркер выбирается из группы, состоящей из аффинных маркеров, отраженных в табл. 7. С другими композициями XTEN использование первого и второго аффинного маркера будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине, и в таких случаях, в одном осуществлении первый и второй аффинные маркеры различаются и каждый из них выбирается из аффинных маркеров, отраженных в табл. 7. Специалистом в данной области дополнительно будет отмечено, что как только эти полипептиды, содержащие последовательности расщепления будут очищены, выделенный полипептид может впоследствии быть обработан с целью протеолиза для высвобождения одного или двух аффинных маркеров, с последующим пропуском обработанного полипептида XTEN через хроматографический носитель для выделения полипептида XTEN без присоединенных аффинных маркеров. Схематически этот способ показан на фиг. 42, и приводимые в качестве примера методики описаны в примерах. Множество различных протеаз может использоваться для удаления концевых маркеров для очистки в зависимости от последовательности, присоединенной аффинным маркером к полипептиду XTEN, включая, но не ограничиваясь, протеазы, выбранные в табл. 9. В одном варианте осуществления эти протеазы выбираются из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина, протеазы вируса гравировки табака (TEV), фактора FXa и энтерокиназы. В другом варианте осуществления расщепляемая последовательность встраивается в полипептид, содержащий аргининовые остатки, которые могут быть

разрушены и аффинный маркер удален обработкой трипсином, таким образом высвобождая полипептид ХТЕН, который впоследствии выделяется в основном в очищенной форме с помощью хроматографии, такой как улавливание анионообменным носителем (включая, но не ограничиваясь, носителем MascoCar Q) или выделением в виде элюата, при этом продукты расщепления, не содержащие последовательность ХТЕН и протеазу, захватываемыми носителями ИС, катионообменной или ИМАС-хроматографии, получая в элюате в основном гомогенный полипептид ХТЕН.

Таблица 7

Классы аффинных маркеров и хроматографических носителей, которые связывают аффинные маркеры

Аминокислотная последовательность аффинных маркеров	Хроматографический носитель
LYPYPYP, LYYPYP, WPWP, FPFPP	ИС
$(Y)_n$ , $(W)_n$ , $(YP)_n$ , $(WP)_n$ , $(FP)_n$ , $(LP)_n$ с $n=3-20$	ИС
$(RP)_n$ , $(KP)_n$ , $(HP)_n$ , $(H)_n$ , $(R)_n$ с $n=3-20$	Катионообменный, ИМАС
$(E)_n$ , $(D)_n$ , $(ED)_n$ , $(EP)_n$ , $(DP)_n$ с $n=3-20$	Анионообменный
RPRPRPRPRP	Катионообменный
RPRPRPRPRPGR	Катионообменный
RPRPRPRPRPRP	Катионообменный
RPRPRPRPRPRPGR	Катионообменный
KPKPKPKPKP	Катионообменный
KPKPKPKPKPGR	Катионообменный
RPRPRPRPRPRPRPRP	Катионообменный
RPRPRPRPRPRPRPRPGR	Катионообменный
RPRPRPRPRPRPRPRPRP	Катионообменный
RPRPRPRPRPRPRPRPRPGR	Катионообменный
RPRPRPRPRPRPRPRPRPRP	Катионообменный
RPRPKPRPKPRPKPRPKP	Катионообменный
PRPKPRPKPRPKPRPKPGR	Катионообменный
RPRPKPRPKPRPKPRPKPRPKP	Катионообменный
RPRPKPRPKPRPKPRPKPRPKPGR	Катионообменный
GSPYGYPYSYS, GSPWGSPTSTE, GSPAGSPTSTE,	ИС
GSPXGXPXSXS, GSPSGXPXSXS, GSPSGTPXSXS, где X = Ile, Leu, Val, Phe, Trp или Tyr	ИС
GSPXGXPXSXS, GSPSGXPXSXS, GSPSGTPXSXS, где X = Arg, Lys или His	Катионообменный, ИМАС
НННННН, НННННННН	ИМАС
STRPSRRSRRG, STRRGTRRGTRRG,	Катионообменный
STRPSRGRARG, STRPSRRARG, STRPSRRRRG,	Катионообменный
STEPSEEESEG, STEEGTEEGTEEG,	Анионообменный
STEPSEGEAEG, STEPSEEAEG, STEPSEEEEG,	Анионообменный

Таблица 8

Последовательности, расщепляемые трипсином

P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
S	A	S	R	S	A
S	A	S	K	S	A
G	S	G	R	A	T
E	A	A	R	H	H
A	P	G	R	H	H
G	S	G	R	G	S
			R	X*	
			K	X*	

\* X = любая L-аминокислота, отличная от пролина.

## Протеазы и расщепляемые протеазами последовательности

Протеаза, действующая на последовательность	Примерные расщепляемые последовательности	Расщепляемые последовательности*
FXIa	KLTR↓AET	KD/FL/T/R/VA/VE/GT/GV
FXIa	DFTR↓VVG	KD/FL/T/R/VA/VE/GT/GV
FXIIa	TMTR↓IVGG	
Калликреин	SPFR↓STGG	-/-/FL/R/RY/SR/RT/-/-
FVIIa	LQVR↓IVGG	
FIXa	PLGR↓IVGG	-/-/G/R/-/-/-/-
FXa	IEGR↓TVGG	IA/E/GFP/R/STI/VFS/-/G
FIIa (тромбин)	LTPR↓SLLV	-/-/PLA/R/SAG/-/-/-
Эластаза-2	LGPV↓SGVP	-/-/-/VIAT/-/-/-/-
Гранизим-В	VAGD↓SLEE	V/-/-/D/-/-/-/-
MMP-12	GPAG↓LGGA	G/PA/-/G/L/-/G/-
MMP-13	GPAG↓LRGA	G/P/-/G/L/-/GA/-
MMP-17	APLG↓LRLR	-/PS/-/-/LQ/-/LT/-
MMP-20	PALP↓LVAQ	
TEV	ENLYFQ↓G	ENLYFQ/G/S
Энтерокиназа	DDDK↓IVGG	DDDK/IVGG
Protease 3C (PreScission™)	LEVLFQ↓GP	LEVLFQ/GP
Сортаза А	LPKT↓GSES	L/P/KEAD/T/G/-/EKS/S
Трипсин	K↓X** или R↓X	K/X или R/X
Трипсин	R↓X**	SASRSA

↓ указывает сайт расщепления;

\* перечень множества аминокислот до, между или после;

косая черта указывает на альтернативные аминокислоты, которые могут быть замещены в этом положении;

- указывает, что любая аминокислота может быть замещена соответствующей аминокислотой, показанной в середине столбца;

\*\* X - любая L-аминокислота, отличная от пролина.

В другом варианте осуществления полипептид XTEN может быть сконструирован так, что один или оба аффинных маркера, соединенных с концами полипептида и используемых для облегчения очистки, могут сохранять часть конечного продукта, исключая требование применения стадии высвобождения протеазы. Если маркеры для очистки сконструированы, чтобы оставаться частью лекарственного вещества, то последовательности маркеров выбираются таким образом, чтобы не вызывать выраженного иммунного ответа. Иммуногенность может быть предсказана с помощью использования численных алгоритмов расчета или экспериментальными исследованиями. Предпочтительной является последовательность, из которой устранены эпитопы Т-клеток и В-клеток. Не ограничивающие примеры последовательностей, встраиваемых в концевые последовательности XTEN, которые облегчают захватывание при очистке и которые могут при желании оставаться связанными с конъюгированными конструкциями, представлены в табл. 7.

## 10. Композиции для повышенной экспрессии полипептидов XTEN.

В другом аспекте в данном изобретении предложены конструкции, содержащие последовательности полинуклеиновых кислот, кодирующих полипептид XTEN, и способы получения полипептида XTEN для использования в предложенных конъюгатах, в которых дополнительные кодирующие полинуклеотидные кодирующие вспомогательные последовательности добавляются к 5'-концу полинуклеотидов, кодирующих полипептид XTEN, или добавляются к 5'-концу последовательностей, кодирующих аффинный маркер, присоединенный к 5'-концу последовательностей, кодирующих полипептид XTEN, и облегчают экспрессию полипептида XTEN или последовательности XTEN с расщепляемыми последовательностями, присоединенными к полипептидам аффинных маркеров в трансформированных клетках хозяина, таких как бактерии. Примеры таких последовательностей, кодирующих вспомогательные последовательности, приведены в табл. 10 и в примерах. В одном варианте в данном изобретении предложена конструкция полинуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид, содержащий вспомогательную последовательность, обладающую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью, выбранной из табл. 10, присоединенной к N-концу первого аффинного маркера, выбранного из множеств

ва последовательностей, отраженных в табл. 7, такого что, в свою очередь, является присоединенным к расщепляемой последовательности, описанной в данном тексте, или непосредственно к N-концу последовательности XTEN, обладающей по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94% идентичностью последовательности, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в табл. 2 и 3. В этом изобретении предложены векторы экспрессии, кодирующие конструкции, используемые для способов получения в основном гомогенных препаратов полипептидов и полипептидов XTEN с высокими уровнями экспрессии. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предлагает способы получения в основном гомогенных популяций полипептидов, включающих последовательности XTEN, первого и второго аффинного маркера и вспомогательную последовательность, этот способ включает культивирование в реакции ферментации клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN, первый и второй аффинные маркеры в условиях, эффективных для экспрессии полипептида, такие, что больше чем около 2 г/л, или больше чем около 3 г/л, или больше чем около 4 г/л, или больше чем около 5 г/л, или больше чем около 6 г/л, или больше чем около 7 г/л этого полипептида синтезируется как компонент неочищенного продукта экспрессии клетки-хозяина, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 130 при длине волны 600 нм. В одном варианте осуществления этот способ дополнительно включает стадии адсорбции данного полипептида на первом хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения полипептида; адсорбции полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения в в основном гомогенного полипептидного препарата. В одном варианте вышеуказанного способа вектор дополнительно включает нуклеотиды, кодирующие вспомогательную последовательность на N-конце кодированного полипептида, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, отраженной в табл. 10. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются способы получения в основном гомогенной популяции полипептидов, содержащих полипептид XTEN, первый и второй аффинные маркеры и вспомогательную последовательность, этот способ включает культивирование клетки-хозяина в реакции ферментации, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и первый и второй аффинные маркеры в условиях, эффективных для экспрессии этого полипептидного продукта в концентрации больше чем около 10 мг/г сухой массы клеток-хозяев, или по меньшей мере около 250 мкмоль/л, или около 300 мкмоль/л, или около 350 мкмоль/л, или около 400 мкмоль/л, или около 450 мкмоль/л, или около 500 мкмоль/л упомянутого полипептида, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 130 при длине волны 600 нм. В одном вышеуказанном осуществлении этот способ дополнительно включает стадии адсорбции данного полипептида на первом хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения полипептида; адсорбции полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения в в основном гомогенного полипептидного препарата. В одном варианте вышеуказанного способа вектор дополнительно включает нуклеотиды, кодирующие вспомогательную последовательность на N-конце кодированного полипептида, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностями, отраженными в табл. 10. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются способы получения в основном гомогенной популяции полипептидов, содержащих полипептид XTEN, первый и второй аффинные маркеры и вспомогательную последовательность, этот способ включает культивирование клетки-хозяина в реакции ферментации, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и первый и второй аффинные маркеры, в условиях, эффективных для экспрессии этого полипептидного продукта в концентрации больше чем около 10 миллиграммов/грамм сухой массы клеток-хозяев (мг/г), или по меньшей мере около 15 мг/г, или по меньшей мере около 20 мг/г, или по меньшей мере около 25 мг/г, или по меньшей мере около 30 мг/г, или по меньшей мере около 40 мг/г, или по меньшей мере около 50 мг/г упомянутого полипептида, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 130 при длине волны 600 нм. В одном вышеуказанном осуществлении этот способ дополнительно включает стадии: адсорбции данного полипептида на первом хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения полипептида; адсорбции полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения в в основном гомогенного полипептидного препарата. В одном вари-



анте вышеуказанного способа вектор дополнительно включает нуклеотиды, кодирующие вспомогательную последовательность на N-конце кодированного полипептида, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностями, отраженными в табл. 10. В другом варианте осуществления данные конструкции, полученные вышеуказанными в этом параграфе способами, дополнительно включают нуклеотиды, кодирующие последовательности, расщепляемые протеазами между аффинными маркерами и полипептидом XTEN, и эти способы предлагают для выделенных полипептидов препарата обработку протеазой, способной разрушать эти расщепляемые последовательности, такие протеазы не ограничиваются трипсином, с помощью которого полипептид XTEN высвобождается из получаемого полипептида; полипептид XTEN адсорбируется на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания полипептида XTEN; полипептид XTEN потом элюируется и выделяется как в основном гомогенный полипептид XTEN.

Таблица 10

Примеры вспомогательных последовательностей для облегчения экспрессии белков, их выделения и процессинга в бактериях

Аминокислотная последовательность*	Аминокислоты в положении**					
	X1	X2	X3	X4	X5	Z
ADAQKAADNKKP						
KTLVYCSEGSPE						
ENNAQTTNESAG						
KDTIALVVSTLN						
APKDNTWYTGA						
ADVPAQVTLAEK						
KIEEGKLVWIN						
AEATTAAGGA						
ATGTATSEGSPE						
EPTAATTGESAG						
AETTAPAGST						
APTEATAGTGA						
AETPAGATGAE						
APEEGTAGGA						
SLSTEATAKIVSEFGRDAN						
ANPEQLEEQRETRLIIEE						
SASTEATAKAASEAGRDAN						
ANPEQAEEQREETR						
ANPEQAEEQREET						
ANPEQAEEQSEET						
KNPEQAEEQREET						
KNPEQAEEQSEET						
KNPEQAEEQAEQREET						
KNPEQAEEQAEQSEET						
KNHEQAEEQAEQSEET						
KKHEQAEEQAEQSEET						
KKPEQAEEQAEQREET						
KNHEQEKEKAEQSEET						

KKQEKEEKAAEEQREET							
KNHEKDEKKAEEQSEET							
KKQEKEKEQAEEQREET							
KNPEQEKEKAEEQREET							
KKPEQEKEQAEEQREET							
KKQEKEKEQAEEQAESEREET							
KKQEKEKEQAEEQSQSREET							
KKQEKEKEQAEEQSESEEREET							
KKQEKEKEQAEEQAKAESEAREET							
KKQEKEKEQAEEQSKSQAEREET							
KKQEKEKEQAEEQAQAEDEREET							
KKQEKEKEQAEEQSKSKAEDEREET							
KKQEKEKEQAEEQPEVQREET							
KKQEKEKEQAEEQVENPREET							
KKQEKEKEQAEEQELCEREET							
KKQEKEKEQAEEQGIDTREET							
KNPEQAEEQX1EET	S/R						
ANPEQAEEQX1EET	S/R						
KNPEQAEEQAEEQX1EET	S/R						
KX2X3EQAEQAEEQX1EET	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
KX2(X3) <sub>10</sub> QX1EET	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
KX2(X3) <sub>7</sub> AEEQX1EET	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
KX2X3EQE(X3) <sub>3</sub> AEEQREET		K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
KX2X3EQE(X3) <sub>3</sub> AEE(X3) <sub>5</sub>		K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
KKQEKEKEQAEEQ(X4X5) <sub>2</sub> REET					A/S	K/Q/E	
KKQEKEKEQAEEQ(X4X5) <sub>1</sub> REET					A/S	K/Q/E	
KKQEKEKEQAEEQ(Z) <sub>1</sub> REET							любом
KX2(X3) <sub>n</sub> , где n=10-40		K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
(X3) <sub>n</sub> , где n=10-50			K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				
KX2QEKEKEQAEEQ(X4X5) <sub>n</sub> X1EET, где n=0-10	S/R	K/N			A/S	K/Q/E	
KX2(X3) <sub>n</sub> (X4X5) <sub>m</sub> X1EET, где n=5-20 и m=0-10	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S		A/S	K/Q/E	
KX2(X3) <sub>n</sub> (Z) <sub>m</sub> X1EET, где n=5-20 и m=0-20	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S				любом

\* где n или m=0, соседние аминокислоты расположены последовательно,

\*\* указана аминокислота(ы), которая(ые) могут быть использованы в данном положении в исходных аминокислотных последовательностях с альтернативными вариантами, разделенными символом.

### III). Нагрузочные вещества.

Настоящее изобретение относится частично к ХТЕН-конъюгатам, присоединенным к одной или большому количеству молекул нагрузочных веществ. Предусмотрено, что полипептид ХТЕН может быть соединен с большим разнообразием молекул нагрузочных веществ, включающим биологически активные пептиды, белки, полимеры, небольшие фармакологически активные молекулы, полинуклеиновые кислоты, пептиды- и белки-мишени, небольшие молекулы-мишени, антитела и фрагменты антител и небольших молекул нагрузочных веществ для визуализации, а также комбинациями этих типов нагрузочных веществ, что приводит к получению композиций с 2, 3, 4 или более типов нагрузочных веществ. Это изобретение направлено на долговременные потребности улучшения конечного периода полувыведения экзогенно назначаемых терапевтических и диагностических нагрузочных веществ пациенту в них нуждающемуся, а также комбинаций нагрузочных веществ, которые могут включать лечебный компонент или нацеленному компоненту.

Примеры, не ограничивающие функциональные классы агентов фармакологически активных нагрузочных веществ для использования для связывания с полипептидом ХТЕН данного изобретения, могут включать какой-либо из следующих классов: снотворные и седативные средства, антидепрессанты, транквилизаторы, лекарство, действующее на органы дыхания, антиконвульсанты, миорелаксанты, средства против болезни Паркинсона (антагонисты дофамина), анальгетики, противовоспалительные средства, успокоительные препараты (анксиолитики), средства, подавляющие аппетит, антигистаминные средства, средства для сокращения мышц, противинфекционные средства (антибиотики, противовирусные, противогрибковые, вакцины), противоревматические, противомаларийные, противорвотные средства, средства против эпилепсии, бронхолитические средства, факторы свертывания крови, цитокины, хемокины, интерлейкины, ростовые факторы, гормоны роста, гормоны эндокринной системы, экзокринные гормоны, инсулин, пептиды, регулирующие метаболизм глюкозы, противораковые агенты, антитромботические средства, антигипертензивные средства, препараты для сердечнососудистой системы, противоаритмические средства, антиоксиданты, противоастматические средства, гормональные агенты (включая контрацептивы), симпатомиметические средства, диуретики, средства, регулирующие липидный обмен, антиандрогенные агенты, противопаразитарные средства, антикоагулянты, диагностирующие опухоли средства, противоопухолевые средства, гипогликемические средства, нутриенты и пищевые добавки, ростовые добавки, противоэнтритные агенты, вакцины, антитела, диагностические средства, контрастирующие

шие агенты и радиоактивные вещества для визуализации. Конкретнее, данное активное нагрузочное вещество может попадать в один из нескольких структурных классов, включающих, но не ограничивающихся, небольшие молекулы лекарственных средств, биологически активные белки (пептиды, полипептиды, белки, рекомбинантные белки, антитела и гликопротеины), стероиды, нуклеотиды, олигонуклеотиды, полинуклеотиды, жиры, электролиты и т.п. Для конъюгационных композиций ХТЕН-нагрузочное вещество специально предусмотрено, чтобы нагрузочное вещество могло быть фармакологически активным агентом, который обладает подходящей реакционноспособной группой, включающей, но не ограничивающейся, нативную аминогруппу, сульфгидрильную группой, карбоксильную группой, альдегидную группой, кетонную группой, алкеновую группой, алкиновую группой, азидную группой, спиртовую группой, гетероцикл или, в альтернативном варианте, модифицируется для того, чтобы содержать по меньшей мере одну из вышеуказанных реакционноспособных групп, подходящих для связывания с полипептидом ХТЕН, ХТЕН-кросс-линкером или ХТЕН-реактантом клик-химии из этого изобретения, используя любой из способов конъюгации, описанных в данном тексте, или из иных, известных по использованию в этой области для конъюгации таких реакционноспособных групп. Специфические функциональные части и их реакционноспособные активности описаны в издании *Organic Chemistry, 2nd Ed. Thomas Sorrell, University Science Books, Herndon, VA (2005)*. В дальнейшем будет понятно, что какое-либо нагрузочное вещество, содержащее реакционноспособную группу или модифицированное для включения реакционноспособной группы, также будет содержать остаток после конъюгации, при которой к нему присоединяется полипептид ХТЕН, ХТЕН-кросс-линкер или ХТЕН-реактант клик-химии.

Приводимые в качестве примера нагрузочные вещества, подходящие для ковалентного присоединения к ХТЕН-полимеру, ХТЕН-кросс-линкеру или ХТЕН-реактанту, включают биологически активные белки и фармакологически активные небольшие молекулы лекарственных веществ, обладающих активностью. Приводимые в качестве примера лекарственные вещества, подходящие для изобретенных композиций, могут быть найдены как представленные в официальной Фармакопее США, официальной Гомеопатической Фармакопее США, официальном Национальном Формуляре и Настольном справочнике врача (PDR) и в "Оранжевой книге" (Перечень зарегистрированных лекарственных средств с оценками терапевтической эквивалентности), издаваемой Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA). Предпочитаемые лекарственные вещества - это те вещества, которые имеют необходимую реакционноспособную функциональную группу, или те, для которых легко могут быть получены производные с внесением реакционноспособной функциональной группы для конъюгации и которые будут сохранять по меньшей мере часть фармакологической активности неконъюгированного нагрузочного вещества после конъюгации с полипептидом ХТЕН.

#### 1. Лекарственные вещества как нагрузочные вещества.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное нагрузочное вещество для конъюгации с предложенным полипептидом ХТЕН, ХТЕН-кросс-линкерами или ХТЕН-реактантами клик-химии, описанными в данном тексте, является одним или более агентов, описанных в данном тексте или выбранных из нагрузочных веществ табл. 11, или их фармацевтически приемлемой солью, кислотой или производным или агонистом. В одном варианте осуществления для этого лекарственного вещества получают производное для введения реакционноспособной группы для конъюгации с предложенным полипептидом ХТЕН, ХТЕН-кросс-линкерами или ХТЕН-реактантами клик-химии, описанными в данном тексте. В другом варианте осуществления для этого лекарственного вещества для конъюгации получают производное для введения расщепляемого линкера, такого как, но не ограничивающегося соединением валин-цитруллин-ПАБ, при этом после введения пациенту данный линкер способен расщепляться циркулирующей или внутриклеточной протеазой, таким образом высвобождая лекарственное вещество из конъюгата.

## Лекарственные вещества для конъюгации с полипептидами ХТЕН

Лекарственные вещества
<p>Эрлогиниб; Бортезомиб; Алитретиноин, Аллопуринол, триокись мышьяка, клотфарабин, дексразоксан, Фульвестрант; Сутент (SU11248), Летрозол; Иматиниба мезилат; РТК787/ЗК 222584; Бендамустин; Ромидесин; Пралатрексат; Кабазитаксель (XRP-6258); Эверолимус (RAD-001); Абиратерон; Оксалиплатин; 5-ФУ (5-фторурацил), лейковорин, рапамицин; лапатиниб; лонафарниб; сорафениб; гефитиниб; циклофосфамид; бусульфан; импросульфан; пипосульфан; бензодопа; карбоквон; метуредопа; уредопа; алтретамин; триэтиленмеламин; триэтиленфосфорамид; триэтилентиофосфорамид; триметилмеламин; буллатацин; буллатацинон; камтотецин; топотекан; бриостатин; каллистатин; СС-1065; адозелезин; калихеамицин; ауристатин; монометилауристатин Е (ММАЕ); монометилауристатин F (ММАF); (валин-цитрулин-ПАБ)- монометилауристатин Е; (валин-цитрулин-ПАБ)- монометилауристатин F; карзелезин; бизелезин; криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин; элутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; хлорамбуцил; хлорнафазин; холофосфамид; эстрамустин; ифосфамид; мехлорэтамин; мехлорэтаминоксид гидрохлорид; мелфалан; новембихин; фенестерин; преднимустин; трофосфамид; урацил мустард; кармустин; хлорозотоцин; фотемустин; ломустин; нимустин; ранимустин; калихеамицин; динемистин; динемистин А; клодронат; эсперамицин; неокарзиностагин хромофор; аклациномизины, актиномицин; антрамицин; азасерин; блеомицин; кактиномицин; карабицин; карминомицин; карзинофилин; хромомицины; дактиномицин; даунорубицин; гидроксимочевина; лентинан; лонидайнин; майтанзин; анзамитоцины; митогазон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; метоксален, подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; ризоксин; рибавирин; зидовудин; ацикловир; ганцикловир; видарабин; идоксуридин; трифлкрдин; фоскарнет; амантадин; римантадин; саквинавир; индинавир; рионавир; альфа-интерфероны и другие интерфероны; AZT; сизофуран; спирогерманиум; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлоротриэтиламин; Т-2 токсин; верракурин А; роридин А; ангвидин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; таксонды; эпаклитаксел; паклитаксел; доцетаксел; доксетаксел; иринотекан; пеметрексед; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; цисплатин; карбоплатин; винбластин; платина; эпопозид, VP-16; ифосфамид; митоксантрон; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор изомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; капецитабин; месна, лидокаин; бупивакаин; мепамтин; квинакрин, донепезил, ривастигмин; галантамин; морфин; оксикодон; гидроморфон; оксиморфон; метопон; апоморфин; норморфин; эторфин; бупренорфин; меперидин; лопермид; анилеридин; этогептазин; пиминидин; бетакпродин; дифеноксилат; фентанил; суфентанил; альфентанил; ремифентанил; леворфанол; декстрометорфан; феназоцин; пентазоцин; циклазоцин; метадон; изометадон; пропоксифен; налоксон; натрексон; трепростинил; N-метилналоксон; 6-амино-14-гидрокси-17-аллилнордесморфин; налтрендол; N-метилналтрексон; налбуфин; буторфанол; циклазоцин; пентазоцин; налмефен; налтриндол; нор-биналторфимин; оксилорфан; 6-амино-6-дезоксо-налоксон; петазоцин; леваллорфанметилналтрексон; бупренорфин; циклорфан; левалорфан; циклоспорин; циклоспорин А; микофенилат мофетила; сиролimus; такролимус; преднизолон; азатиоприн; циклофосфамид; преднизон; аминокaproновая кислота; хлороквин; гидроксихлороквин; дексаметазон; хлорамбуцил; даназол; бромокриптин; Нилотиниб (AMN107); Неларабин, амифостин, амиодарон, аминокaproновая кислота, аминокгипурат натрия, аминокглутетимид, аминоклевулиновая кислота, аминоксалициловая кислота, амсакрин, анагрелид, анастрозол, аспарагиназа, антрациклины, бексаротен, бикалутамид, блеомицин, бузерелин, бусульфан, каберголин, капецитабин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, циластина натрий, цисплатин, кладрибин, клодронат, циклофосфамид, ципротерон, цитарабин, камптотецины, 13-цис-ретиноевая кислота, все транс ретиновые кислоты, дакарбазин,</p>

дактиномицин, даунорубин, дефероксамин, дексаметазон, диклофенак, диэтилстильбэстрол, доцетаксел, доксорубин, эпирубинин, эстрамустин, этопозид, экземестан, фексофенадин, флударабин, флуорокортизон, фторурацил, флуоксиместерон, флутамид, гемцитабин, эпинефрин, L-Дофа, гидроксимочевина, идарубин, ифосфамид, иматиниб, иринотекан, итраконазол, гозерелин ацетат, летрозол, лейковорин, левамизол, лизиноприл, ловотироксина натрия, мехлоретамин, медроксипрогестерон, мегестрол, мелфалан, метараминила битартрат, метоклопрамид, мексилэтин, митоминин, митотан, налоксон, никотин, нилутамид, октреотид, памидронат, пилкаминин, порфирин, преднизон, прохлорперазин, ондасетрон, ралтитрексед, сиролimus, такролимус, тамоксифен, темозоломид, тестостерон, тетрагидроканнабинол, талидомид, тиогуанин, топотекан, третиноин, валрубинин, винкристин, виндезин, винорелбин, доласетрон, гранисетрон; формотерол, флутиказон, лейпролид, мидазолам, алпразолам, амфотерицин В, подофилотоксины, нуклеозидные противовирусные препараты, ароилгидразоны, суматриптан; макролиды, такие как эритромицин, олеандомицин, тролеандромицин, рокситромицин, кларитромицин, даверцин, азитромицин, флуритромицин, диритромицин, джозамицин, спириномицин, мидекамицин, лейкомицин, миокамицин, рокитамицин, андазитромицин и свинолид А; фторохиноны, такие как ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, trovафлоксацин, алатрофлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, энноксацин, грепафлоксацин, сунитиниб, гатифлоксацин, ломефлоксацин, спарфлоксацин, темафлоксацин, пefлоксацин, амифлоксацин, флероксацин, тосуфлоксацин, прулифлоксацин, ирлоксацин, пазуфлоксацин, клинафлоксацин и ситафлоксацин; аминокликозиды, такие как гентамицин, нетилмицин, парамецин, тобрамицин, амикацин, канамицин, неомицин и стрептомицин, ванкомицин, текопланин, рамполанин, мидепланин, колестилин, даптомицин, грамицидин, колестиметат; полимиксины, такие как полимиксин В, капреомицин, бацитрацин, пенымы, пенициллины, включая чувствительные к пенициллиназе агенты как пенициллин G, пенициллин V; устойчивые к пенициллиназе агенты как метициллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, флоксациллин, нафциллин; активные против грам-отрицательных микроорганизмов агенты как ампициллин, амоксициллин и гетациллин, циллин и галампидиллин; пенициллины против синегнойной палочки как карбенициллин, тикарциллин, азлоциллин, мезлоциллин и пиперациллин; цефаспорины как цефподоксим, цефпрозил, цефтбутен, цефтизоксим, цефтриаксон, цефалотин, цефепим, цефалексин, цефалоридин, цефалорин, цефалоридин, цефакор, цефадоксил, цефалоглицин, цефуросим, цефоранид, цефотаксим, цефатризон, цефазетрил, цефепим, цефиксим, цефоницид, цефоперазон, цефотетан, цефинетазол, цефтазидим, лоракарбеф и моксалактам, монобактамы как азтреонам и карбапенемы, такие как имипенем, меропенем, пентамидин и эетиоуат, альбутерола сульфат, лидокаин, метапротеренола сульфат, беклометазона дипропионат, триамцинолон ацетамид, будесонид ацетонид, флутиказон, ипратропиума бромид, флунизолид, кромолин натрий и эрготамин тартрат; таксаны, такие как паклитаксел; SN-38, тирфостины, 20-эпи-1,25-дигидрокси-витамин D3, 5-этинилурацил, абиратерон, Ацивицин, Акларубинин, Амодазола Гидрохлорид, АкрКвинин, ацифульвен, адесипенон, адрамицин, Алдеслейкин, антагонисты ALL-ТК, амбамустин, амидокс, Амбоницин, Амелантраон ацетат, амрубинин, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антагонист D, антагонист G, антареликс, анти-андроген, антидорзелининг морфогенетический протеин -1, анти-эстроген, антиметаболиты, анти-неопластон, анти-эстрогены, антисмысловые олигонуклеотиды, противоядия, афидиколинглицинат, модуляторы генов апоптоза, апуриновая кислота, ага-CDP-DL-PTBA, аргинин-дезаминаза, Асперлин, азулакрин, атаместан, атримустин, атраскрин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатирозин, Азиптепа: Азотоминин, производные баккатина III, баланол, Батимастат, анягонисты BCR/ABL, бензохлорины, Бензодипна, бензоилстауроспорин, стауроспорин, бета-алетин, бетакламицин В, производные беталактамов, бетаметазон, бетулиновая кислота, ингибитор bFGF, Биалутамид, Бизантрена Гидрохлорид, бисазидринилспермин, биснафид, Биснафида Димесилат, бистратен А, Блеомицина Сульфат, брeфлат, Бреквинар Натрий, бром эпиандростерон, Бропиримин, будотитан, бутинонин сульфоксимин, кальципотриол, калфостин С, производные камтотетина, канарипокс ПЛ-2, капедтабин, Карацемид, Карбетимер, карбоксамид-амино-триазол: карбоксиамидотриазол, CaRestM3, SARN700, ингибитор происходящий из хрящей, Карубицина Гидрохлорид, ингибиторы казеинкиназы (ICOS), кастаноспермин, цекропин В, Цедефингол, цетрореликс, хлорины, хлороквиноксалина сульфонамид, хлоротрианизен, циклопроп, Циролеминин, цис-порфирин, аналоги кломифена, клотримазол, коллимицин А, коллимицин В, комбретастатин А4, аналоги комбретастатина, конагенин, крамбесцидин 816, криснатол, Криснатол Мезилат, криптофицин 8, производные криптофицина А, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципеминин, цитарабинофосфат, цитолитический фактор, цитостатин, цитотоксические агенты, Даунорубинина Гидрохлорид, Децитабин, дегидродидемнин В, деслорелин, дексифосфамид, Дексормаплатин, дексразоксан, дексверапамил, Деагуанин, Деагуанина Мезилат, DHEA, диазикворин, дикарбазин, дидемнин I3, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азациитидин: дигидротаксол, 9-диоксаминин, дифенилспиромустин, докозанола, Доксорубинина Гидрохлорид, Дролоксифен, Дролоксифена Цитрат, Дромостанолона Пропионат, дронабинол, Дуазомицин, дуоканницин SA, эбселен, экорустин, эдельфозин, эдроколомаб, Эфломитина Гидрохлорид, эфлорнитин, элемен, Эльзамитруцин, эмитефур, Энлоплатин,

Энпрогат, эпиандростерон, Эпиропидин, Эпирубицина Гидрохлорид, эпристерид, Эрбулозол, терапия с использованием генов эритроцитов, Эзрубицина Гидрохлорид, аналоги эстрамустина, агонисты эстрогена, антагонисты эстрогенов, Этанидазол, этинилэстрадиол, Этиолизированное Масло П131, Этопозид Фосфат, Этоприн, фазрозол, Фазрозола Гидрохлорид, Фазарабин, фазарабин, фенретинид, Фенретинид:Флоксуринид, финастерид, флавопиридол, флезластин, Флударабина Фосфат, фтордаунорунцина гидрохлорид, Фторцитабин, форменимекс, фрместан, Фосквидон, фостриecin, Фостриecin Натрий, гадолиния тексафирин, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы: гемцитабин, Гемцитабина Гидрохлорид, ингибиторы глутатиона, Золото Au198, гозерелин, гепсульфам, герегулин, гексаметиленбисацетамид, гексаметилмеламин, хорионический гонадотропин человека: монофосфорил-липид А + к-клеточные стенки микробактерий, гиперицин, ибандроновая кислота, идарубинина гидрохлорид, идоксифен, идрамантон, Илмофозин, иломастат, имидазо-акридон, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды: ингибитор рецептора инсулиноподобного ростового фактора -1, агонисты интерферона, Интерферон Альфа-2а, Интерферон Альфа-2b, Интерферон Альфа -n1, Интерферон Альфа -n3, Интерферон Бета-1а, Интерферон Гамма-1b, нобенгуан, йододоксорубинин, ипомеанол, Ипроплатин, Иринотекана Гидрохлорид, ироплакт, ирсогладин, изобенгазол, изогомогаликондрин В, итасетрон, джасплакинолид, кахалалид F, ламелларин-N-триацетат, ланреотид, Лантреотида Ацетат, лейнамидин, ленограстим, лентинина сульфат, лептолстатин, фактор ингибирующий лейкомию, лейкоцитарный альфа интерферон, Лейпролида Ацетат, лейпролид+эстроген+прогестерон, лейпропрелин, лиарозол, Лиарозола Гидрохлорид, аналог линейного полиамина, липофильный дисахарид-пептид, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лоблаптин, ломбрицин, лометрексол, Лометрексол Натрий, Ионидамин, Лозоксантрон Гидрохлорид, ловастатин, локсорибин, лупролид, луртотекан, лутеллумтексафирин, лизофиллин, литические пептиды, майтанзин, манностагин А, маримастат, Мазопрокол, маспин, ингибиторы матрилизина, ингибиторы матричной металлопротеиназы, меркаптопурин, Мехлорэтамин Гидрохлорид, Мегестерола Ацетат, Меленгестрола Ацетат, Меногарил, мербарон, метерелин, метиониназа, метлоретамин, Метоприн, Метуредеп, микроалгал, мифепристон, ингибитор МИФ, милтефозин, миромистим, некомплементарные двухцепочечные РНК, Митиндомид, Митокарцин, Митокромин, Митогиллин, митогвазон, Митомалцин, аналоги митомицина, митонафид, Митоспер, митотоксин фактора роста фибробластов -сапорин, мофаротен, молграмостим, моноклональное антитело, ингибитор генов множественной устойчивости к лекарствам, средства терапии на основе супрессора1 множественных опухолей, противораковый агент горчицы, мутамицин, микапероксид В, экстракт клсточных стенок микробактерий, *Mycobacterium bovis*, мирапапорон, N-ацетилдиналин:N-замещенные бензаамиды, нафарелин, нагрестип, налоксон+пентазоцин, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубинин, неридроновая кислота, нейтральная эндопептидаза, низамицин, модуляторы оксида азота, нитропроизводные мустарда, антиоксидант нитроксида, нитруллин, Нокодазол:Ногалямин, Об-бензилгуанин, эстрадиол, окайзенон, олигонуклеотиды, онапристон: ондасетрон, ондасетрон, орацин, индуктор оральных цитокинов, Ормаплатин, озатерон, оксауномицин, Оксизуран, палауамин, пальмитоилтризоксин, памидроновая кислота, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин: пегаспаргаза, Пегаспаргаза, пелдезин: пентозанполисульфат натрия, Пентамустин, пентрозол, Пептомидин Сульфат, перфлурон, Перфлосфамид, периллиловый спирт, феназомицин, фенилацетат, ингибиторы фосфатазы, пицибанил, пилокарпина гидрохлорид, пиритрексим, Пироксантрон Гидрохлорид, пластегин А, пластегин В, ингибитор активатора плазминогена, комплекс платины, соединения платины, комплекс платина-триамин, Пликамицин, Пломестан, Порфимер Натрий, Прокарбазина Гидрохлорид, пропилен-бис-акридон, простагландин J2, карцинома простаты, ингибиторы протеасомы, иммуномодулятор на основе протенна А, ингибитор протеникиназы С, ингибиторы протенин-тирозин-фосфатазы, ингибиторы пурин-нуклеозид-фосфориллазы, Пуромидина Гидрохлорид, пурпурины, Пиразофуриин, пиразолоакридин, конъюгат пиридоксильированного гемоглобина и полиоксизтилена, антагонисты гаf, рамострон, ингибиторы расфарнезил-протеин-трансферазы, ингибиторы gas: ингибитор gas-GAP, деметилированный ретеллиптин, ренция Re186 этидронат, Рибоприн, рибозимы, RII ретинамид, RM-131 (агонист грелина), RM-493 (агонист рецептора меланокортина 4 типа), Роглетимид, рогитумин, ромуртид, роквинимекс, рубигинон B1, рубоксил, Сафингола Гидрохлорид, Сафингол, сейнтропин: Sar CNU, саркофитол А, сарграмостим, Sdi1-миметик, Семустин, сенесцен-производное ингибитора 1, смысловые олигонуклеотиды, ингибиторы сигнала трансдукции, модуляторы сигнала трансдукции, Симтарсен, одноцепочечный антигенсвязывающий белок, собузоксан, натрия борокаптит, натрия фенилацетат, сольверол, соматомединсвязывающий белок, сонермин, Спарфосат Натрия, спарфосовая кислота, Спарсомицин, Спирогерманиума Гидрохлорид, Спиромустин, спиромустин: спленопентин, Спиплатин, спликанамицин D, скваламин, ингибитор стволовых клеток, ингибитор деления стволовых клеток, стипинамид, ингибиторы стромелизина, Стронция Хлорид Sr89, сульфозин, Сулофенур, антагонист суперактивного вазоактивного интестинального пептида, сурадиста, сурамин, свайнсонин, синтетический гликозамногликаны, Тализомин, таллимустин, тамоксифена метиодид, тауромустин, тазаротен, Текогалан Натрий, Тегафур, теллурапирилиум, теллопорфин,

ингибиторы теломеразы, Телоксантрон Гидрохлорид, Темопорфин, тернозоломид, Тероксирон, тетрахлордекаоксид, тетразомин, тексотер, талбластин, тиокоралин, миметик тромбозептина, тималфасин, агонист рецептора тимопоэтина, тимотрипан, тиронид-стимулирующий гормон, тиазофуриин, тинетилотиопурпурин, Тирапазамин, титаноцена дихлорид, Топотекана Гидрохлорид, топсентин, торемифен, Торемифена Цитрат, фактор тотипотентных стволовых клеток, ингибиторы трансляции, Трестолона Ацетат, триацетилуридин, трицирибин, Трицирибина Фосфат: Триметрексамат, Триметрексамата Глюкуронат, Трипторелин, трипторелин: трописетрон, тубулозола гидрохлорид, туростерид, ингибиторы тирозин-киназы, ингибиторы UBC, уродепа, фактор ингибирования роста полученный из урогенитального синуса, антагонисты рецептора урокиназы, вапреотид, вариолин В, векторная система, веларезол, змеиный яд, верамин, вердины, Верлепорфин, вертепорфин, Винбластин Сульфат, винкристина сульфат, виндезин, Виндезина Сульфат, Винспидина Сульфат, Винглицината Сульфат, Винлейрозина Сульфат, винорелбина тартрат, винозидина сульфат, винкастатин, Винзолидина Сульфат, витаксин, Ворозол, занотерон, Зениплатин, зиласкорб, зиностагин стималамер, Зорубицина Гидрохлорид, панкреатическая РНКаза быка, панкреатическая РНКаза человека, панкреатическая РНКаза млекопитающих, онконаза, ранпирназа, антивирусный белок лаконоса американского, рахелмицин, цепь рибина-А, гелонин, эвероллумс, карфилзомид, тубулизин, тубулизин В, тубулизин М, майтанзиноид DM1, майтанзиноид DM4, триптолид, SJG-136, апазиквон, ирофульвен, иллудин S, томаимидин, зелендронат.

## 2. Биологически активные белки как нагрузочные вещества.

В другом аспекте данного изобретения предложены композиции ХТЕН-нагрузочное вещество, в

которых нагрузочное вещество является биологически активным белком в виде пептида или полипептида. В некоторых вариантах осуществления конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество это нагрузочное вещество является каким-либо фармакологически активным пептидом или полипептидом, который может быть экспрессирован как рекомбинантный белок слияния, присоединенный к одному или большему количеству полипептидов ХТЕН. В других вариантах осуществления конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество, это нагрузочное вещество является каким-либо фармакологически активным пептидом или полипептидом, который может быть конъюгационно присоединенным к одному или большему количеству полипептидов ХТЕН. Эти конъюгаты могут обладать конфигурацией, описанной в данном тексте ниже. Приводимые в качестве примера пептидные или полипептидные нагрузочные вещества предназначены для включения аналогов, агонистов, антагонистов, ингибиторов и изомеров. Будет понятно, что предложенные пептиды и белки охватывают синтетические, полусинтетические, рекомбинантные, нативные, гликозилированные и негликозилированные формы, а также биологически активные фрагменты, варианты последовательностей, видовые варианты, их гомологичные и мутационные последовательности, а также получаемый вариант белка, сохраняющий часть активности родительского или нативного белка.

Последовательности биологически активных белков могут быть получены из общедоступных баз данных, патентов или литературных ссылок и других подобных источников, которые хорошо известны в этой области знаний. Например, последовательности могут быть получены из Универсального Ресурса Белков (UniProt)/Swiss-Prot, Европейского института биоинформатики (EBI), SIB Швейцарского института биоинформатики, Информационного Ресурса по Белкам (PIR). Регистрационные номера Химической реферативной службы (CAS) (публикуемые Американским химическим обществом) или номера доступа в GenBank (например, AAA-AZZ, HAA-HZZ, JAA-JZZ), идентификаторы модельных белков, доступные на веб-странице Национального центра биотехнологической информации (NCBI), доступные в интернете по адресу [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov), которые соответствуют записям в реестре CAS или базе данных GenBank, содержащих аминокислотную последовательность интересующего белка или фрагмента или варианта этого белка. Такие идентификаторы последовательностей, представленные в данном тексте, обобщенные страницы связаны с каждым из этих CAS, GenBank и GenSeq номерами доступа, а также цитируемыми журнальными публикациями (например, ID номер PubMed (PMID)), каждая из которых включена посредством ссылки в их полном объеме, особенно применительно к аминокислотным последовательностям, описанным в данном документе. В одном варианте осуществления композиция ХТЕН-нагрузочное вещество в рекомбинантной или конъюгационной форме включает одну или больше молекул биологически активного пептида или белка, который содержит, но не ограничивается, пептид или полипептид, выбранный из нагрузочных веществ, отраженных в табл. 12, или их вариантом последовательности, который сохраняет по меньшей мере часть активности этого биологически активного белка. Под термином "вариант последовательности" подразумевается, что этот биологически активный белок обладает по меньшей мере около 80, или 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичностью последовательности при оптимальном выравнивании к последовательности известного пептида или полипептида, такого как перечислены в табл. 12.

Таблица 12

Биологически активные белки для присоединения к полипептиду ХТЕН

Название белка/пептида
ЕРО, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , консенсусный IFN, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, IL-1, IL-2, ремикад (инфликсимаб), Ритуксан (ритуксимаб), Эмбрел (этанерцепт), Синагис (паливизумаб), Реопро (абциксимаб), Герцептин (трастузумаб), tPA, Церизим (нимиглоуцераза), Вакцина против гепатита-В, рДНКза, ингибитор альфа-1 протеиназы, С-пептид, фузеон, G-CSF, GM-CSF, гормон роста, соматропин, гормон высвобождающий гормон роста, инсулин, аналоги инсулина, глюкагон, GLP-1, GLP-2, FSH, TNF-рецептор, уриказа, VEGF, РТН, аспарагиназа, амдоксовир (DAPD), антид, бекаплермин, кальцитонины, цановирин, денилейкин дифтитокс, эритропоэтин (ЕРО), чередаза, церезим, альфа-глюкозидаза, коллаген, циклоспорин, альфа дефензины, бета дефензины, эксендин-4, гранулоцитарный колоннестимулирующий фактор (GCSF), тромболоэтин (ТРО), ингибитор альфа-1 протеиназы, элкатонин, гранулоцитарно-макрофагальный колоннестимулирующий фактор (GMCSF), фибриноген, филграстрим, ростовые гормоны человека гормон роста (hGH), гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), GRO-бета, антитело к GRO-бета, морфогенные белки костей, такие как морфогенный белок костей-2, морфогенный белок костей-6, OP-1; кислый ростовой фактор фибробластов, основной ростовой фактор фибробластов, лиганд CD-40, гепарин, сывороточный альбумин человека, низкомолекулярный гепарин (LMWH), интерфероны, такие как интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон омега, интерферон тау, консенсусный интерферон; интерлейкины и рецепторы интерлейкинов, такие как рецептор интерлейкина-1, интерлейкин-2, гибридные белки интерлейкина-2, антагонист рецептора интерлейкина-1, интерлейкин-3, интерлейкин-4, рецептор интерлейкина-4, интерлейкин-6, интерлейкин-8, интерлейкин-12, рецептор интерлейкина-13, рецептор интерлейкина-17; лактоферрин и фрагменты лактоферрина, гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон (LHRH), инсулин, про-инсулин, аналоги инсулинов (например, моноацилированный инсулин как описано Пат. США № 5922675), амилин, соматостатин, аналоги соматостатина, включая октреотид, вазопрессин, фолликулстимулирующий гормон (FSH), вакцина против гриппа, инсулиноподобный ростовой фактор (IGF), инсулилотропин, макрофагальный колоннестимулирующий

фактор (M-CSF), активаторы плазминогена, такие как альтеплаза, урокиназа, ретеплаза, стрептокиназа, памитеплаза, ланотеплаза и тенетеплаза; ростовой фактор нервов (NGF), остеопротегерин, тромбоцитарный фактор роста, тканевые ростовые факторы, трансформирующий ростовой фактор -1, фактор роста эндотелия сосудов, ингибирующий лейкемию фактор, ростовой фактор кератицитов (KGF), глиальный ростовой фактор (GGF), T-клеточные рецепторы, CD молекулы/антигены, фактор некроза опухолей (TNF), моноцитарный хемоаттрактантный белок -1, эндотелиальные ростовые факторы, паратиреоидный гормон (PTH), тимозин альфа 1, ингибитор тимозина альфа 1 Пб/IIIa, тимозин бета 10, тимозин бета 9, тимозин бета 4, альфа-1 антитрипсин, соединения фосфодиэстеразы (PDE), ингибиторы VLA-4 (очень поздний антиген - 4), ингибиторы VLA-4, бисфосфонаты, антитело к респираторно-синцитиальному вирусу, ген-регулятор кистозного фиброза (CFTR), дезоксирибонуклеаза (ДНКаза), бактерицидный/повышающий проницаемость белок (BPI), антитело к CMV, этанерсепт, абсиксимаб, афелиомаб, бациликсимаб, даклизумаб, инфликсимаб, нмбритумаб триуксетан, митумаб, муromoаб-CD3, конъюгат йода 131 и тозитумаба, олизумаб, ритуксимаб, трастузумаб (герцептин), бокстокс, Диспорт, алглокозидаза альфа, даптомицин, YH-16, хоригонадотропин альфа, филграстрим, цетрореликс, интерлейкин-2, альдеслейкин, тецелейкин, денилейкин дифтигтокс, интерферон альфа -п3 (инъекционный), интерферон альфа -n1, DL-8234, интерферон, Санторий (гамма-1a), интерферон гамма, тимозин альфа 1, тазонермин, ДигиФаб, ВипераТАб ЭхиТАб, КроФаб, незиритид, абатасепт, алафасепт, РебиФ, эптотермин альфа, терипаратид (остеопороз), кальцитонин инъекционный (заболевания костей), кальцитонин (назальный, остеопороз), этанерсепт, глотамер гемоглобина 250 (бычий), дротрекогин альфа, коллагеназа, карперетид, рекомбинантный эпидермальный ростовой фактор человека (гель для местного применения, лечение ран), DWP-401, дарбелозин альфа, эпозтин омега, эпозтин бета, эпозтин альфа, дезирудин, лепирудин, бивалирудин, онаког альфа, Мононин, эптаког альфа (активированный), рекомбинантный Фактор VIII + VWF, Рекомбинат, рекомбинантный Фактор VIII, Фактор VIII (рекомбинантный), Альфанат, октоког альфа, Фактор VIII, палифермин, Индикиназа, тенектеплаза, альтеплаза, памитеплаза, ретеплаза, натеплаза, монтеплаза, фолитропин альфа, rFSH, hpFSH, микафунгин, пэгфилграстрим, ленограстрим, нартограстрим, серморелин, глюкагон, экзенатид, прамлинтид, имиглюоцераза, галсульфаза, Лейкотропин, молграмостим, трипторелина ацетат, гистрелин, гистрелина ацетат, деслорелин, нафарелин, лейпролид запасной замедленного высвобождения (ATRIGEL), имплант лейпролида (DUROS), соматропин, Эутропин, программа KP-102, соматропин, соматропин, мекасермин (нарушение роста), энфувиртид, Org-33408, инсулин гларгин, инсулин глизин, инсулин (ингаляционный), инсулин лизпро, инсулин детемир, инсулин (буккальный, RapidMist), мекасермин ринфабат, анакинра, сельмолейкин, 99mTc-апситид инъекционный, мислопид, Бетасерон, глатирамера ацетат, Гепон, опрелвекин, альфа-интерфероны, происходящие из лейкоцитов человека, Билив, инсулин (рекомбинантный), рекомбинантный инсулин человека, инсулин аспарт, мекасермин, Роферон-А, интерферон -альфа2, Альфаферон, интерферон альфакон-1, интерферон альфа, Авонекс, рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека, дорназа альфа, трафермин, зиконотид, талтирелин, диботермин альфа, атозибан, бекаптермин, эптифибатид, Земайра, СТС-111, Шванвак-В, вакцина против HPV (квадровалентная), NOV-002, октреотид, ланреотид, анестим, агалзидаза бета, агалзидаза альфа, ларонидаза, презатид ацетат меди (гель для местного применения), расбуриказа, ранибизумаб, Актиммун, ПЭГ-Интрон, Трикомин, десенситизирующая инъекция рекомбинантного аллергена клеща домашней пыли, рекомбинантный паратиреоидный гормон человека (PTH) 1-84 (п/к, остеопороз), эпозтин дельта, трансгенный антитромбин III, Грандитропин, Вираза, рекомбинантный инсулин, интерферон-альфа (оральные таблетки), GEM-21S, вапреотид, идурсульфаза, омапатрилат, рекомбинантный сывороточный альбумин, сертолизумаб пэгол, глюкарпидаза, ингибитор рекомбинантной эстеразы С1 человека (ангиоэдема), ланотеплаза, рекомбинантный гормон роста человека, энфувиртид (безигольная инъекция, Биоджектор 2000), VGV-1, интерферон (альфа), люцинактант, авиптадил (ингаляционный, заболевание легких), икатибант, экаллантид, омиганан, Аураграб, пексиганана ацетат, ADI-PEG-20, LDI-200, дегареликс, цинтредекин безудотокс, Фавид, MDX-1379, ISAtx-247, лираглутид, терипаратид (остеопороз), тифакогин, AA-4500, T4N5 липосомный лосьон, катумаксомаб, DWP-413, ART-123, Хризалин, десмотеплаза, амедиплаза, корифолитропин альфа, TH-9507, тедигютид, Днамид, DWP-412, гормон роста (инъекция для замедленного высвобождения), рекомбинантный G-CSF, инсулин (ингаляционный, AIR), инсулин (ингаляционный, Техносфера), инсулин (ингаляционный, AERx), RGN-303, DiaPer277, интерферон бета (вирусная инфекция гепатита С (HCV)), интерферон альфа -п3 (оральный), белатасепт, трансдермальные инсулиновые пластыри, AMG-531, MBP-8298, Ксерсепт, опебакан, AIDSVAХ, GV-1001, Лимфоскан, ранпирназа, Липоксисан, лусупултид, MP52 (переносчик бета-трикальцийфосфата, регенерация костей), вакцина против меланомы, сипулейсел-Т, СТР-37, Инсегия, витеспен, тромбин человека (замороженный, кровотечения при хирургическом вмешательстве), тромбин, TransMID, альфимепраза, Пуриказа, терлипессин, EUR-1008M, рекомбинантный FGF-1, BDM-E, ротигапид, ETC-216, P-113, MBI-594AN, дурамицин (ингаляционный, цистозный фиброз), SCV-07, OPI-45, Эндостатин, Ангиостатин, АВТ-510,



Концентрат ингибитора Боуман-Бирка, ХМР-629, 99mTc-Хиник-Аннексин V, кахалилд F, СТСЕ-9908, тевереликс (пролонгированное высвобождение), озареликс, ромидепсин, ВАУ-50-4798, интерлейкин-4, PRX-321, Пелскан, иботактекин, rh лактоферрин, TRU-015, IL-21, ATN-161, шленгитид, Альбуферон, Бифазикс, IRX-2, омега интерферон, РСК-3145, САР-232, пазиреотид, huN901-DM1, иммунотерапевтическая вакцина против рака яичников, SB-249553, Онковакс -CL, Онковакс -P, BLP-25, Цервакс-16, немифитид, гААТ (ингаляционный), гААТ (дерматологический), CGRP (ингаляционный, астма), пегсунерсепт, тимозин бета-4, плитидепсин, GTP-200, рамоланин, GRASPA, OBI-1, AC-100, кальцитонин лосося (оральный, элиген), кальцитонин (оральный, остеопороз), экзаморелин, капроморелин, Кардева, велафермин, 131I-TM-601, КК-220, TP-10, уларитид, депелестат, гематид, Хризалин (для местного применения), rNAPc2, рекомбинантный Фактор VIII (ПЭГилированный липосомальный), bFGF, ПЭГилированный вариант рекомбинантной стрептокиназы, V-10153, Сонолизис Пролиз, НейроВакс, CZEN-002, неогенезная терапия островными клетками, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, экзенатид, AVE-0010, GA-GCB, аворелин, AOD-9604, линаклотид ацетат, CETi-1, Гемоспан, VAL (инъекционный), инсулин, рекомбинантный метионилированный лептин человека, питракира для подкожных инъекций, экзема, питракира (сухой порошок для ингаляций, астма), Мультикин, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Crn10 (аутоиммунные заболевания/воспаление), талактоферрин (для местного применения), rEV-131 (офтальмологический), rEV-131 (заболевание легких), оральный рекомбинантный инсулин (диабет), RPI-78M, CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, валатраст, интерферон альфа-n3 (для местного применения), IRX-3, RDP-58, Тауферон, стимулирующая желчными солями липаза, Мериспаза, щелочная фосфатаза, EP-2104R, Меланотан -II, бремеланотид, ATL-104, рекомбинантный микроплазмин человека, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, динорфин A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, вакцина против малярии (виросомы, Pevipro), ALTU-135, вакцина против парвовируса B19, вакцина против гриппа (рекомбинантная нейраминидаза), вакцина малярии/HBV, вакцина против сибирской язвы, Vacc-5q, Vacc-4x, вакцина против ВИЧ (оральная), вакцина против HPV, Таг Токсид, YPSL, CHS-13340, PTH(1-34) липосомальный крем (Новасом), Остаболин-С, аналог PTH (для местного применения, псориаз), MBRI-93.02, MTB72F вакцина (туберкулез), MVA-Ag85A вакцина (туберкулез), FAR-404, BA-210, рекомбинантная вакцина против чумы F1V, AG-702, OхSODrol, rBetV1, Deg-p1/Deg-p2/Deg-p7 вакцина нацеленная против аллергена (аллергия к пылевому клещу), PR1 пептидный антиген (лейкемия), вакцина против мутантного gas, HPV-16 E7 липопептидная вакцина, вакцина против лабиринтного (аденокарцинома), вакцина против CML, WT1-пептидная вакцина (рак), IDD-5, CDX-110, Пентрис, Норелин, ЦюФаб, P-9808, VT-111, айкрокапид, телбермин, рупинтвир, ретикулоза, rGRF, P1A, альфа-галактозидаза A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, ангиотензин-терапевтическая вакцина, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (оральный, туберкулез), DRF-7295, ABT-828, ErbB2-специфический иммунотоксин (противораковый), DT388IL-3, TST-10088, PRO-1762, Комботокс, пептиды связывающие холецистокинин-B/гастрин-рецептор, 111Pn-hEGF, AE-37, трастузумаб-DM1, Антагонист G, IL-12 (рекомбинантный), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (для местного применения), радиоиммунные препараты на основе L-19 (рак), Re-188-P-2045, AMG-386, DC/1540/KLN вакцина (рак), VX-001, AVE-9633, AC-9301, NY-ESO-1 вакцина (пептиды), NA17.A2 пептиды, вакцина против меланомы (лекарственное средство активированное антигеном), вакцина против рака простаты, CBP-501, рекомбинантный лактоферрин человека (сухость глаз), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (инъекционный), ACP-NIP, SUN-11031, пептид YY [3-36] (ожирение, интраназально), FGLL, атасисепт, BR3-Fc, BN-003, BA-058, паратироидный гормон человека 1-34 (назальный, остеопороз), F-18-CCR1, AT-1001 (целиакия /диабет), JPD-003, PTH(7-34) липосомальный крем (Новасом), дурамицин, САВ-2, СТСЕ-0214, эритропоэтин, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Фактор XIII, аминокандин, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, телеверикс (с быстрым высвобождением), EP-51216, hGH, OGP-I, сифувиртид, TV-4710, ALG-889, Org-41259, rhCC10, F-991, тимопентин (заболевания легких), r(m)CRP, гепатоселективный инсулин, субалин, L19-IL-2 белок слияния, элафин, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, агонист рецептора тромбопоэтина, AL-108, AL-208, антагонист фактора роста нервов (боли), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, оральный терипаратид (элиген), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, LFn-p24 гибридная вакцина (Терапор), EP-1043, hPTH(1-34), 768974, SYN-101, PGN-0052, авискумин, BIM-23190, энкастим, APC-8024, GI-5005, ACC-001, TTS-CD3, TNF, десмопрессин, онерсепт, TP-9201, AC165198, Рецептор активина типа IIA, Аденозин дезаминаза, Адипотид, Афостаза альфа (щелочная фосфатаза), Альфа-меланоцит стимулирующий гормон, Альфа-1 антитрипсин, Альфа-галактозидаза, Ангиотензин, Ингибитор ангиопоэтина-1, Ингибитор ангиопоэтина -2, Аполипопротин A1, аркалист, Аргинин дезимидаза, Аспарагиназа, Атиломтин, AZD2820, Антагонист рецептора брадикинина, Кальцитонин, Пептид, регулирующий ген кальцитонин, Цендеритид, Холецистокинин, Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), Цилигенитид, Фактор свертывания IX, Фактор свертывания, Фактор свертывания VIII, Фактор свертывания X, Фактор свертывания XIII, Коллагеназа, Ингибитор эстеразы C1 комплемента (констат альфа), Ингибитор фактора

комплемента C3, Ингибитор фактора комплемента C5, Кортикотропин-высвобождающий фактор, С-пептид, натрийуретический пептид С-типа, Дефензины, DiaPer277, Дифенилгидрамин, Экалантид, Эндостатин, Эпифибатид, Фибриноген, Агонист рецептора фактора роста фибробластов, Фолликул-стимулирующий гормон (FSH), Фоллистатин, FP-1039 (FGF-ловушка), Фуззон, Гастрин, Грелин, Антагонист грелина, GIP-1, GIP-1/GLP-1 двойной агонист, Глюкагон, Глюкагон –подобный пептид (GLP) 1, Глюкагон –подобный пептид (GLP) 2, Глюкоцереброзидаза (Церезим), Глютамат карбоксипептидаза (карбоксипептидаза G2), Глютаминаза, Колонистимулирующий фактор гранулоцитов (GCSF), Гормон роста, Гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), Гематид, Гепариназа, Гирудин, Нuman хорионический гонадотропин (hCG), дезоксирибонуклеаза человека I, Хуманин, Гиалуронидаза, Икатибант, Идуронат-2-сульфатаза (Элапраза), INGAР (Эксулин), Инсулин, Ирззин, KAI-4169, Лепирудин (Рефлудан), Фактор ингибирования лейкемии, L-идуронидаза, ингибитор LRP5, ингибитор LRP6, лотенизирующий гормон (LH), макрофагальный воспалительный белок 2 (Гробета-Т СХС хемокин), Манноза-связывающий лектин, меланокортин-стимулирующий гормон, Метиониназа (МЕТаза), Миростипен, Ингибитор MUC1, Ингибитор мюстатина, N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (Наглазим), Фактор роста нервов (Церебролизин), Нейропептид Y2, Нейрофилин, NU206, Онконаза (Ранпирназа), Онтак (IL-2-токсин), Опноидный ростовой фактор, Оксингомодулин, Окситоцин, Палиперидон, Панкреатический полипептид, Панцит, Паратироидный гормон (PTH), белок, высвобождающий паратироидный гормон (PTHrP), Пептид YY (3-36), Фенилаланин аммонийлиаза (PAL), Фенилаланин гидроксилаза (PAH), Активирующий полипептид аденилатциклазы гипофиза (PACAP), Ацетилгидролаза тромбоцит-активирующего фактора, POT-4 (APL-1), Прамлинтид, P-Селектин, Релаксин, рекДНКазы (Пульмозим), РНКазы, Санвар, Секретин, SN38, Соматостатин (Октеотид, Пазиреотид, Сандостатин и т.д.), Сомаверт (антагонист рецептора гормона роста человека), Фактор роста стволовых клеток, Супероксиддисмутаза, TAC1, Ингибитор тромбина (прямой), Тромбомодулин, Тромбопоэтин (ТРО), Тимозин альфа 1 (Тимальфазин), Тиротид-стимулирующий гормон (TSH), Тиротропин-высвобождающий гормон, Тигапотид, Тканевый активатор плазминогена (tPA), TLN-232, Трипептидилпептидаза 1, Рецептор фактора некроза опухолей, Рецептор тирозинкиназы (ТrkA), UGP281, Уратоксидаза, Уриказ, Урокортин 2, Активатор урокиназы плазминогена, Ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), Вазоактивный интестинальный пептид, Вазопрессин, Фактор фон Виллебранда (vWF), Зиконотид (Приалт), Цинк протопорфирин, Гормон надпочечного кортикотрофина (ACTH), CD25, Рецептор интерлейкина-1, Интерлейкин-21, ABCF1, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, ADORA2A, Аггрскан, AGR2, AICDA, AIF1, AIG1, AKAP1, AKAP2, AMH, AMHR2, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANPEP, APC, APOC1, APRIL, AR, AZGP1 (цинк-а-гликопротеин), A4 интегрин, B7, B7.1, B7.2, BAD, BAFF, BAG1, BAI1, BCL2, BCL6, BDNF, BLNK, BLMR1 (MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BPAG1 (плектин), BRCA1, C19orf10 (IL27w), C3, C4A, C5, C5R1, CANT1, CASP1, CASP4, CAV1, CCBP2 (D6/JAB61), CCL1 (1-309), CCL11 (эотаксин), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), MCAF, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), SLC, эксодус-2, CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/эотаксин-2), CCL25 (TECK), CCL26 (эотаксин-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-1RB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), CD164, CD19, CD1C, CD20, CD200, CD-22, CD24, CD28, CD3, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD11a (LFA-1 интегрин альфа L), CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD52, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD340, CDH1 (Е-кадгерин), CDH10, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN1C, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEVBP, CER1, CHGA, CHGB, Хитиназа, CHST10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (клаудин-7); CLN3; CLU (кластерин); cMET; CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (G-CSF); CTLA4; CTNНВ1 (b-катенин); CTSB (катепсин В); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Бонзо); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; эластаза; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB-2 (Her2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGF3; FIGF (VEGFD); FIL1 (EPSILON); FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (фибронектин); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP

(GABA<sub>A</sub>); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (Гельзолин); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HER2; HGF; HIF1A; HIP1; гистамин и рецепторы гистамина; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN- $\alpha$ ; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN-гамма; IFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (гликопротеин 130); IL7; IL7R; IL8; IL8RA; IL8RB; IL8RB; IL9; IL9R; ILK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; IRAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 интегрин); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b 4 интегрин); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC Бокс BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (Кератин 19); KRT2A; KRTHB6 (волососпецифичный кератин II типа); LAMA5; LEP (лептин); LFA3; LIGHT; Линго-р75; Линго-Трой; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTB4R; MACMARCKS; MAG или Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; миджин; MIF; MIP-2; MKI67 (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (металлотрионектин-III); MTSS1; MUC1 (муцин); MYC; MYD88; NCK3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; фосфакан; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21Rac2); RANKL; RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROBO2; RSV; SI00A2; SCGB1D2 (липофилин B); SCGB2A1 (маммаглобин 2); SCGB2A2 (маммаглобин 1); SCYE1 (эндотелиальный моноцит-активирующий цитокин); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5 (маспин); SERPINE1 (PAI-1); SERPINF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB111; TGFB2; TGFB3; TGFB4; TGFB5; TGFB6; TGFB7; TGFB8; TGFB9; TH1L; THBS1 (тромбоспондин-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TIMP3; тканевый фактор; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF- $\alpha$ ; TNFAIP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSF1A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEG1); TNFSF18; TNFSF4 (лиганд OX40); TNFSF5 (лиганд CD40); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (лиганд CD27); TNFSF8 (лиганд CD30); TNFSF9 (лиганд 4-1BB); TOLLIP; Толл-подобные рецепторы (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 до TLR-13); TOP2A (топизомераза I $\alpha$ ); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VAP1; VEGF; VEGFB; VEGFC; версикан; VHL C5; VLA-1; VLA-4; XCL1 (лимфотактин); XCL2 (SCM-1b); XCR1 (GPR5/CCXCR1); YY1; ZFPM2.

### 3. Приводимые в качестве примера биологически активные белки как нагрузочные вещества.

Белковые вещества, которые специально предусмотрены как нагрузочные вещества в предложенных композициях, являются следующими пептидами и белками: "Натрийуретический пептид С-типа" или "CNP" обозначает белок человека (UniProt № P23582), кодируемый геном NPPC, который расщепляется до натрийуретического пептида - пептида С-типа из 22 аминокислот (CNP), несущий последовательность GLSKGCFGLKLDJRJGSMGLGC, а также его видовые и синтетические варианты, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного пептида. CNP - это селективный агонист натрийуретического рецептора В-типа (NPRB) и, по сообщениям, является сильным стимулятором эндохондрального роста костей. CNP связывается со своим рецептором, инициирует передачу внутриклеточных сигналов и, в конечном итоге, ингибирует механизм передачи сигнала FGFR3. Применение CNP назначается при ахондроплазии, обычной форме дисплазии скелета или синдроме "карлика-коротконожки" и расстройств человеческого организма, вызванных мутациями участником механизма FGFR3, включая синдромы, влияющие на развитие скелета; например гипохондроплазия [HCH], АСН, летальная дисплазия [TD]), заболевания кожи (эпидермальные невусы, себорейный кератоз, акантокератодермия) и раковые заболевания (множественная миелома [ММ], карцинома простаты и рак мочевого пузыря, семиома) (Foldynova-Trantirkova S. Hum Mutat. (2012) 33:29). Период полувыведения пептида CNP-22, как сообщалось, равен 2,6 мин из-за быстрого метаболизма нейтральной эндопептидазой и выведению клиренс-рецептором (Prickett T., 2004, Clinical Science, 106:535), что ограничивает применение этого пептида.

"Гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон" или "LHRH" обозначает белок человека (UniProt № P01148), кодируемый геном GNRH1, который процессируется в преоптическом переднем отделе гипоталамуса из препрогормона из 92-аминокислот в линейный декапептидный конечный продукт, имеющий последовательность пироглу-гис-трип-сер-тир-гли-леу-арг-про-гли-амид, а также его видовые и синтетические варианты, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного пептида. Гормон LHRH играет ключевую роль в регулировании блока гипофиз/половые железы и, таким образом, репродукции. Гормон LHRH проявляет свое действие посредством связывания с высокоаффинными рецепторами на гипофизарных гонадотропных клетках с последующим высвобождением гормонов FSH и LH. Гормон LHRH найден в органах за пределами гипоталамуса и гипофиза из-за высокого процентного содержания в определенных раковых тканях, имеющих сайты связывания LHRH, и из-за того, что половые гормоны были замечены в развитии раковых заболеваний груди и простаты, гормональная терапия с помощью агонистов LHRH была утверждена или предлагается для лечения зависимых

от половых гормонов болезненных состояний, таких как эстроген-зависимый рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и андроген-зависимая карцинома простаты. Из-за того что, согласно сообщениям, период полувыведения составляет менее 4 мин (Redding T.W., et al. The Half-life, Metabolism and Excretion of Tritiated Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Man. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1973) 37:626-631), его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

Название "циленгитид" обозначает синтетический циклический RGD пентапептид, имеющий последовательность Arg-Gly-Asp-Dphe-NmeVal или пептид с химическим названием 2-[(2S,5R,8S,11S)-5-бензил-11-{3-[(диаминометилиден)амино]пропил}-7-метил-3,6,9,12,15-пентаоксо-8-(пропан-2-ил)-1,4,7,10,13-пентаазаациклопентадекан-2-ил]уксусная кислота (CAS № 188968-51-6). Циленгитид является селективным к  $\alpha\upsilon$  интегринам, которые являются важными для ангиогенеза (формирования новых кровеносных сосудов). Связывание таких лигандов активирует интегрины для регулирования инвазии, миграции, пролиферации, выживания опухолевых клеток и ангиогенеза. В связи с этим, использование циленгитида для лечения глиобластомы путем ингибирования ангиогенеза находится в процессе исследования (Burke P., et al. Cilengitide targeting of  $\alpha\upsilon\beta 3$  integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts". Cancer Res (2002) 62(15): 4263-4272). Поскольку циленгитид имеет короткий период полувыведения 3-5 ч и слабую растворимость, ограничивающую максимальную концентрацию лекарственного вещества 15 мг/мл (O'Donnell P.H. A phase I study of continuous infusion cilengitide in patients with solid tumors. Invest New Drugs (2012) 30:604), его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

"Гормон, высвобождающий гормон роста" или "GHRH" (также известный как рилизинг фактор роста гормона, GRF, GHRF, соматолиберин или соматокринин" обозначает пептидный гормон из 44 аминокислот, синтезируемый в дугообразном ядре гипоталамуса, несущий последовательность YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL, а также его видовые и синтетические варианты, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного пептида, включая биологически активный укороченный пептид из 1-29 аминокислот YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR. Гормон GHRH высвобождается нейросекреторными нервными окончаниями и переносится гипоталамо-гипофизарной портальной системой к передней доле гипофиза, где он воздействует на рецептор GHRH для стимуляции импульсного высвобождения гормона роста. Аналог GHRH - тезаморелин является утвержденным лекарственным препаратом для лечения липодистрофии у ВИЧ-пациентов при высокоактивной антиретровирусной терапии и также рассматривается для применения при истощении, центральном ожирении у пациентов с дефицитом гормона роста, мышечной атрофии, связанной с определенными хроническими заболеваниями, легком когнитивном нарушении и замещении гормона роста у пациентов с дефицитом гормона роста. Из-за того, что период полувыведения, как сообщалось, менее 15 мин (Chapman I.M. J. Endocrinol (1991) 128:369-374), его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

"Пептид YY" и "PYY" обозначают пептид YY человека, полипептид (UniProt № P10082), синтетические версии, видовые варианты и варианты неприродных последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого белка PYY. Как используется в данном тексте, пептид PYY включает обе основные полноразмерные формы пептида человека из 36 аминокислот, PYY<sub>1-36</sub> и доминирующая циркулирующая форма PYY<sub>3-36</sub> ("PYY<sub>3-36</sub>"), которые несут свернутый структурный мотив PP. Пептид PYY<sub>3-36</sub> обладает последовательностью IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH<sub>2</sub>. Пептид PYY синтезируется специализированными клетками эндокринной системы (L-клетками) в желудке после приема пищи у каждого человека? и он ингибирует перистальтику желудка и повышает абсорбцию воды и электролитов в кишечнике. Пептид PYY также может подавлять секрецию поджелудочной железы. Встречающийся в природе PYY<sub>3-36</sub> - это неселективный агонист рецепторов Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, и Y<sub>5</sub>. Гибридные белки этого изобретения, содержащие пептид PYY, могут найти особое применение при лечении диабета для регуляции метаболизма глюкозы, нарушений, устойчивых к инсулину и ожирения. Были получены аналоги пептидов PYY, описанные в патентах США №№ 5604203, 5574010 и 7166575. Из-за того что период его полувыведения, как сообщалось, составил менее 1 ч (Addison M.L. A role for metalloendopeptidases in the breakdown of the gut hormone, PYY<sub>3-36</sub>. Endocrinology (2011) 152(12):4630-4640), и он обычно назначался интраназальным путем введения три раза в день, его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

Термин "лептин" означает встречающийся в природе лептин (UniProt № P41159), который кодируется геном Ob(Lep), синтетические версии, видовые варианты и варианты неприродных последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого лептина. Лептин имеет последовательность

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQILTS  
MPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKLSCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGS  
LQDMLWQLDLSPGC,

и содержит дисульфидный мостик между остатками 97 и 147. Лептин играет ключевую роль в регуляции получения и расходования энергии, включая аппетит, метаболизм и массу тела. Лептин-содержащие по-

липептиды этого изобретения могут найти особое применение при лечении диабета для регуляции метаболизма глюкозы, нарушений, устойчивых к инсулину, ожирения, врожденной/приобретенной липодистрофии, HAART-индуцированной липодистрофии, гипоталамической аменореи. Лептин клонировали, как описано в патенте США № 7112659, а аналоги и фрагменты лептина - патент США № 5521283, патент США № 5532336, заявки PCT/US 96/22308 и PCT/US 96/01471. Благодаря коммерчески доступной форме для метрелептина сообщался период полувыведения составивший 8-30 мин (Klein S., et al. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* (1996) 45:984-987), и в большинстве действующих схем лечения лептином требуется его 1-2-разовое дозирование/сутки, его применение в качестве лекарственного препарата ограничено. Название "прамлинтид" обозначает синтетический амилинмиметический пептид, имеющий последовательность KCNTATCATNRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH<sub>2</sub>, и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого прамлинтита или нативного амилина. Прамлинтид имеет последовательность, в которой аминокислоты последовательности амилина крысы замещены аминокислотами последовательности амилина человека. Амилин - это пептид из 37 ак, секретируемый β-клетками поджелудочной железы, который высвобождается совместно с инсулином импульсным образом, обычно в молекулярном соотношении 100 ч. инсулина к 1 ч. амилина. Действие амилина заключается в ингибировании опустошения желудка, секреции глюкагона, способствует насыщению и прекращению приема пищи (Kong M.F., et al. Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM. *Diabetologia*. (1997) 40:82-88). Прамлинтид используется как вспомогательное средство в инсулиновой терапии диабета 1 и 2 типов и показывает улучшение гликемического контроля и снижение потребности в инсулине, а также демонстрирует умеренное снижение массы тела (Nearby M.T., Batterham R.L. Gut hormones: Implications for the treatment of obesity. *Pharmacology & Therapeutics* (2009) 124:44-56). Поскольку у прамлинтита, по сообщениям, период полувыведения составляет 20 мин (McQueen, J. Pramlintide acetate. *Am. J. Health-System Pharmacy* (2005) 22:2363-2372) и он требует 2-3-разовое дозирование/сутки, его применение в качестве лекарственного препарата ограничено. Название "окситоцин" обозначает пептидный гормон млекопитающих (UniProt № P01178), имеющий последовательность CYIQNCPLG-NH<sub>2</sub> и дисульфидный мостик между остатками 1 и 6, и его синтетические версии, такие как питоцин. Окситоцин главным образом действует как нейромодулятор в мозге, обладая структурой очень сходной к такой вазопрессина, они являются единственными известными гормонами, высвобождаемые задней долей гипофиза человека, действующими удаленно. Окситоцин обладает свойством вызывать сокращение матки, опосредованное специфическими высокоаффинными рецепторами окситоцина, экспрессируемыми молочными железами и маткой; тем самым играя роль в родовом акте и процессе лактации. Окситоцин-содержащие полипептиды этого изобретения могут найти особое применение при лечении аутизма, хрупкости X-хромосомы, хронической ежедневной головной боли и бесплодия мужчин.

Название "релаксин" обозначает белковый гормон, который представляет собой гетеродимер двух пептидных цепей из 24 и 29 аминокислот, связанных дисульфидными мостиками, образующийся из белка-предшественника из 185 аминокислот (UniProt № P04090); В-цепь имеет последовательность DSWMEEVIKLCGRELVRQAICGMSTWS, а А-цепь, имеет последовательность QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC, с дисульфидными мостиками между положениями В10-А10 и В23-А24, название также включает синтетические и рекомбинантные версии этого гормона. Релаксин продуцируется желтым телом во время менструального цикла и беременности у женщин и простатой у мужчин. Релаксин управляет многими физиологическими реакциями материнского организма на беременность, действует как системный и почечный сосудорасширяющий фактор, является кардиопротекторным и противоишемическим агентом. Релаксин связывается с рецептором релаксина (GPCR), увеличивает количество цАМФ и активирует PKC, PI3K и эндотелиальный рецептор типа В, что приводит к увеличенному образованию оксида азота и также активирует MAPK киназу, что может играть роль в обеспечении индуцированной релаксином экспрессии фактора VEGF. Релаксин-содержащие полипептиды этого изобретения могут найти особое применение при лечении острой декомпенсированной сердечной недостаточности (ADHF). Поскольку опубликованный период полувыведения релаксина у людей составляет менее 10 мин (Dschietzig T., et al. Intravenous recombinant human relaxin in compensated heart failure: a safety, tolerability, and pharmacodynamic trial. *J. Card Fail.* 2009; 15:182-190), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

Названия "цендеритид" и "CD-NP" обозначает натрийуретический пептид-(32-53)-пептид С-типа человека (CNP-22) с натрийуретическим пептид-(24-38)-пептидом узкоголовой мамы (*Dendroaspis angusticeps*), имеющий последовательность GLSKGCFGLKLDRIKMSGLGCPSLRDPNPASTSA, с дисульфидными мостиками между остатками 6 и 22. Этот химерный пептид имеет вазопротекторное и RAAS-подавляющее действие посредством активации рецепторов гуанилилциклазы (GC)-А и GC-В, и он может потенцировать усиление почечного и сердечного выброса, при этом обладая минимальным гипотензивным действием. Соответственно, он может получить применение при лечении кардиоренальных заболеваний, таких как острая декомпенсированная сердечная недостаточность (ADHF) и острый инфаркт миокарда (AMI), особенно во время периода лечения "после купирования острых симптомов".

"Пэгинесатид" или "гематид" - это пептид, состоящий из двух синтетических пептидов из 21 аминокислоты, обладающих последовательностью GlyGlyLeuTyrAlaCysHisMetGlyProIleThrIleValCysGlnProLeuArgSarLys, которые присоединены к лизину с азвещенным полиэтиленгликолем. Пэгинесатид представляет собой новый аналог эритропоэтина, который обладает эритропоэтическими свойствами и разрабатывается для использования в медицине как средство для лечения анемии при хронической почечной недостаточности (СКД) у пациентов, не пребывающих на диализе. Названия "оксимодулин" или "ОХМ" обозначают оксимодулин человека, его синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого оксимодулина. Оксимодулин является пептидом из 37 аминокислот, имеющим последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA, который синтезируется после приема пищи в интестинальных L-клетках толстого кишечника и содержит последовательность глюкагона из 29 аминокислот с карбокситерминальным дополнением из 8 аминокислот. Оксимодулин - это агонист рецептора глюкагона и GLP-1R, его аноректичное действие вероятно опосредовано влиянием на последний рецептор. Было обнаружено, что ОХМ подавляет аппетит. ОХМ-содержащие полипептиды этого изобретения могут найти особое применение при лечении диабета для регуляции метаболизма глюкозы, нарушений, устойчивых к инсулину, ожирения и может использоваться при лечении потери массы. Для нативного оксимодулина сообщали его период полураспада в плазме человека ~12 мин (измерено анализом с перекрестным взаимодействием с глюкагоном; Schjoldager B.T. Oxymodulin: a potential hormone from the distal gut. Pharmacokinetics and effects on gastric acid and insulin secretion in man. Eur. J. Clin. Invest. (1988) 18(5):499-503.), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

Сокращения "POT4" или "APL-1" обозначают синтетический циклический пептид, имеющий последовательность H-Ile-[Cys-Val-Val-Gln-Asp-Trp-Gly-His-His-Arg-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub>.

POT4 более сильный ингибитор фактора C3 комплемента чем компстатин, который ингибирует расщепление нативного фактора C3 на его активные фрагменты C3a и C3b, и он имеет пролонгированный период полувыведения 8 ч в условиях *in vivo*. Его предполагают использовать для предупреждения воспалений, повреждения и повышенной экспрессии ангиогенных факторов, как VEGF, при таких заболеваниях, как связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), астма и COPD. Названия "интерферон-лямбда", "IFN-λ", "интерлейкин-29" и "IL-29" обозначают интерлейкин человека (UniProt № Q8IU54 (20-200)), который кодируется геном IL29, имеющим последовательность

GPVPTSKPTTTGKGCNIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRLLQV  
RERPVALEAEALATLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHW  
LHRLQEAPKKESAGCLEASVTFNLFRLTRDLKYVADGNLCLRTSTHPEST,

их рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого IL-29. Интерферон II типа - IL-29 передает сигнал через гетеродимерный рецепторный комплекс (рецепторные цепи IL-10R2 и IL-28Rα), отличающиеся от IFN I типа (рецепторный комплекс IFNAR1/IFNAR2), и играет важную роль в развитии невосприимчивости к вирусам. Примечательно, что рецептор IL-29 экспрессируется на высоком уровне в гепатоцитах, первичном сайте возникновения HCV-инфекции, но незначительно экспрессируется в иммунных клетках или клетках костного мозга. Для пэгилированных версий период полувыведения составляет 50-70 ч.

Названия "интерферон-бета" или "IFN-β" обозначают белок человека, который кодирует ген IFNB1, имеющий последовательность

MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQ  
KEDAALTIYEMLQNFIFRQDSSSTGWNENLLENVYHQNHLKTVLEEKLEKEDFTRGKL  
MSSLHLKRYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNRYFINRLTGYLNRN,

и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого IFN-β. IFN-β синтезируется различными типами клеток, включая фибробласты и макрофаги и является медиатором противовирусного, антипролиферативного и иммуномодулирующего действия в ответ на вирусную инфекцию и другие биологические индукторы. Связывание IFN-β со специфическими рецепторами на поверхности клеток человека инициирует каскад внутриклеточных событий, которые ведут к экспрессии многочисленных продуктов интерферон-индуцированных генов, такие как 2',5'-олигоденилатсинтаза, β2-микроглобулин и неоптерин. Эти генные продукты обычно используются в качестве биомаркеров в клинических условиях. IFN-β используется при лечении различных форм рассеянного склероза (РС), включая проходящий ремиссию MS, вторичный прогрессирующий РС, первичный прогрессирующий РС, ювенильные проявления РС и клинически изолированные синдромы суггестивного РС. Коммерчески доступные формы IFN-β, по сообщениям, обладают периодом полувыведения от 4 до 67 ч и требуют частое дозирование, такое, что их применение в качестве лекарственных средств является ограниченным. "С-пептид" обозначает белок поджелудочной железы человека, имеющий последовательность EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, и его

рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого С-пептида. С-пептид - это средний сегмент проинсулина, который находится между N-концом В-цепи и С-концом А-цепи и отщепляется от препроинсулина, когда образуется и секретируется зрелый инсулин. Циркулирующий С-пептид связывается с рецептором, который вероятно является сдвоенным G-белком, и получаемый сигнал активирует Ca<sup>2+</sup>-зависимые внутриклеточные сигнальные механизмы, такие как MAPK, PLC $\gamma$  и PKC, что приводит к повышению экспрессии ряда факторов транскрипции, а также повышению активности фермента eNOS и Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>АТФазы. С-пептид рассматривается для лечения диабетических осложнений и диабетической нефропатии. Так как установленный период полувыведения составляет около 30 мин (Matthews D.R. The half-life of endogenous insulin and C-peptide in man assessed by somatostatin suppression. Clin Endocrinol (Oxf). (1985) 23(1):71-79), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

"Грелин" обозначает гормон человека, имеющий последовательность GSSFLSPENQRVQQRKESKPPAKLQPR, его укороченные, рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного грелина, включая нативную процессированную последовательность из 27 или 28 аминокислот и гомологические последовательности. Грелин индуцирует насыщение, или его виды и варианты не встречающихся в природе последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого грелина, включая нативную процессированную последовательность из 27 или 28 аминокислот и гомологические последовательности. Грелин синтезируется в основном P/D1-клетками, выстилающими дно желудка человека и эpsilon-клетками поджелудочной железы, которые стимулируют чувство голода, он рассматривается как заместительный гормон для лептина. Уровни содержания грелина возрастают перед приемом пищи и снижаются после еды, что может приводить к повышенному потреблению пищи и увеличивать жировую массу посредством влияния, выявляемого на уровне гипоталамуса. Грелин также стимулирует высвобождение гормона роста. Грелин ацилируется по сериновому остатку п-октановой кислотой; это ацилирование является необходимым для связывания с рецептором GHS1a и для проявления агонистической активности и GH-высвобождающую способность грелина. Грелин-содержащие полипептиды этого изобретения могут найти особое применение в качестве агонистов; например, для селективного стимулирования перистальтики ЖК-тракта при нарушениях моторики желудочно-кишечного тракта, для ускорения освобождения желудка или при стимулировании высвобождения гормона роста. В данном изобретении также предусмотрены неацилированные формы и варианты последовательностей грелина, которые действуют антагонистами. Аналоги грелина с заместителями в последовательности или укороченные варианты, такие как описанные в патенте США № 7385026, могут найти особое применение как участники гибридизации с полипептидами XTEN для использования в качестве антагонистов для улучшения гомеостаза глюкозы, лечения инсулиновой резистентности и лечения ожирения, раковой кахексии, послеоперационной кишечной непроходимости, нарушений пищеварения и желудочно-кишечных расстройств. Сообщалось об изоляции и определении характеристик грелина (Kojima M., et al., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. 1999; 402(6762):656-660) и пептидным синтезом были получены синтетические аналоги, как описано в патенте США № 6967237. Так как для грелина сообщалось о периоде полувыведения 10-30 мин (Akamizu T., et al. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. Eur. J. Endocrinology (2004) 150(4):447-455), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено, и его аналоги с октильной боковой группой у нативной аминокислоты серина в положении 3 вместо нативной октаноиловой боковой группы могут выявлять дополнительной устойчивостью к протеазам.

"Фоллистатин", также известный как "активин-связывающий белок" или "FSH-супрессирующий белок (FSP)," означает белок, который у людей кодируется геном FST. Как используется в данном тексте, "фоллистатин" включает гомологи, видовые варианты, варианты последовательности и их фрагменты. Зрелая форма белка у людей имеет 315 аминокислот, обозначается как FS-315 и была клонирована (патенты США №№ 5041538 и 5182375). Фоллистатин содержит два потенциальных сайта N-гликозилирования, Asn95 и Asn259, однако было продемонстрировано, что мутации этих сайтов с последующим испытанием этого рекомбинантного белка на способность ингибировать экспрессию FSH и связывать активин обеспечивает каждого мутанта сходными свойствами с немутировавшим рекомбинантным белком hFS-315, что наводит на предположение об отсутствии влияния гликозилирования на функции молекулы фоллистатина (Inouye, S., et al. Site-specific mutagenesis of human follistatin. BBRC (1991) 179(1):352-358). Фоллистатин свиньи описан в публикации Ueno et al., PNAS:USA 84:8282-8286 (1987), а фоллистатин коровы описан в публикации Robertson et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:744-749 (1987). Так как белки морфогенеза костей и факторы роста/дифференциации, такие как активин и мио-статин, обладают способностью индуцировать рост, образование, дифференцирование и поддержание различных тканей, включая кости, хрящи, сухожилия/связки, мышцы, нервные ткани и разные органы, их нейтрализация фоллистатином и агонистами фоллистатина имеют терапевтическое значение (патенты США №№ 5545616, 5041538, и AU 9675056). Так как фоллистатин, введенный пациенту, быстро удаля-

ется из кровотока с определенным на крысах конечным периодом полувыведения чуть больше 2 ч (Kogure K., et al. Intravenous administration of follistatin: delivery to the liver and effect on liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*. (1996) 24(2):361-366), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

Названия "вазоактивный интестинальный полипептид" и "VIP" обозначают пептидный гормон из 28 аминокислот (UniProt № P01282 (125-152)), который кодируется геном VIP, имеющий последовательность HSDAVFTDNYTRLRQMAVKKYLNSILN-NH<sub>2</sub> и их рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного VIP. Пептид VIP синтезируется во многих тканях, включая желудок, поджелудочную железу и супрахиазматическое ядро гипоталамуса в мозге. Пептид VIP стимулирует сократительную способность сердца, расширение кровеносных сосудов, повышает гликогенолиз, снижая артериальное давление крови и расслабляя гладкую мускулатуру трахеи, желудка и желчный пузырь. Изменения в концентрации, связанные с миокардиальным фиброзом, параличом сердца, кардиомиопатией и легочной гипертензией, а также его дефицитом в системе органов дыхания считается патогенетическим фактором при заболевании легких (Said S.I., 2007, *Circulation*, 115: 1260; Said S.I., 2008, *Ann N.Y. Acad Sci*, 1144:148; Petkov V. et al., 2003, *J. Clin. Invest.*, 111:1339). Пептид VIP рассматривается в связи с применением для лечения устойчивой гипертензии, первичной легочной артериальной гипертензии (ПАН), астмы, COPD, диабета, эректильной дисфункции и сексуальной дисфункции у женщин. Так как период его полувыведения определен равным приблизительно 1 мин (Domschke S., et al. Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. *Gut* (1978) 19:1049-1053), то применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

"Фузеон" обозначает пептид из 36 аминокислот, производный gp41 ВИЧ, вирусного белка, участвующего в слиянии вириона ВИЧ с рецептором CD4+ Т-клеток, имеющий последовательность YTSLI-HSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного gp41. Фузеон и его мультимеры или конъюгаты с родственными пептидами используются или рассматриваются для использования в лечении устойчивых форм ВИЧ-инфекции. Так как период полувыведения фузеона у пациентов, требующих частых инъекционных введений, составляет 3,8 ч, то его применение ограничено.

Обозначение "KAI-4169" относится к пептидному агонисту кальций-распознающего рецептора (CaSR) на поверхности клеток человека, разрабатываемого компанией KAI Pharma для лечения вторичного гиперпаратиреоза (SHPT) у пациентов с заболеваниями почек и поражением костей (CKD-MBD).

"Пазиреотид" обозначает аналог соматостатина, имеющий химическое название [(3S,6S,9S,12R,15S,18S,20R)-9-(4-аминобутил)-3-бензил-12-(1H-индол-3-илметил)-2,5,8,11,14,17-гексокси-15-фенил-6-[(4-фенилметоксифенил)метил]-1,4,7,10,13,16-гексазацикло[16.3.0]геникозан-20-ил] N-(2-аминоэтил)карбамат, используемый для лечения болезни Кушинга. Пазиреотид - это мультирецепторный аналог соматостатина с высокой связывающей аффинностью с R-подтипами соматостатина R1, 2, 3 и 5, который подавляет секрецию гормона роста, IGF-1 и адренкортикотропного гормона. Кроме лечения болезни Кушинга, он также рассматривается для использования в лечении акромегалии, нейроэндокринных заболеваний, заболеваний печени, симптоматического полициститного заболевания печени, нейроэндокринных опухолей, лимфангиолейкомиоматоза, наследственного гиперинсулинизма, рецидивирующей и прогрессирующей менингиомы и других эндокринных нарушений. Так как для коммерчески доступной формы определен период полувыведения от 12 до 17 ч (Petersenn, S. et al. Tolerability and Dose Proportional Pharmacokinetics of Pasireotide Administered as a Single Dose or Two Divided Doses in Healthy Male Volunteers: A Single-Center, Open-Label, Ascending-Dose Study. *Clinical Therapeutics* (2012) 34:677-688), то его использование ограничено.

"Иризин" обозначает продукт расщепления белка, кодируемого геном FNDC5 и имеющим последовательность

DPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDEVVIGFAISQQKDVRLRFIQEVNTTTRSCALWDL

EEDTEYIVNHQAISIQGQSPASEPVLFKTPREAEMASKNKDEVMTMKE,

и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного иризина. Иризин является медиатором благоприятного действия при мышечных нагрузках и индуцирует окисление белой жировой ткани путем повышения экспрессии гена UCP1 через активизацию ядерного рецептора PPARA. Как показано, небольшое увеличение концентраций иризина приводит к увеличению расхода энергии, снижению массы тела и улучшению индуцированной диетой невосприимчивости к действию инсулина (Bostrom P., 2012, *Nature*, 481:463). Иризин рассматривается для применения в лечении ожирения, диабета и нарушений обмена веществ.

"ТХА127" и "PanCyte" являются аналогами ангиотензина (1-7), ТХА127 имеет последовательность NRVYIHP, а PanCyte - циклическим аналогом, связанным 4-м и 7-м остатками с dAla и Ala, соответственно, что делает его более устойчивым к деградации и увеличению периода полувыведения. Эти анало-



ги связываются с MAS-рецептором и стимулируют ранние гемапоэтические клетки-предшественники в костном мозге и также обладающие сосудорасширяющим, противотрофическим, противифиброзным, натрийуретическим, противовоспалительным и антитромботическим действиями. Эти вещества рассматриваются относительно использования для ускорения восстановления количества тромбоцитов при трансплантации стволовых клеток у пациентов с опухолями системы крови, такими как острая миелогенная лейкемия (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хроническая миелогенная лейкемия (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома Ходжкина (HL) или не-Ходжкина лимфома (NHL) и множественная миелома, а также для применения в лечении легочного фиброза, острого повреждения легких, легочной артериальной гипертензии и фиброза почек и печени. Названия "интерлейкин-7" и "IL-7" обозначают интерлейкин человека (UniProt № P13232 (26-177)), который кодируется геном IL7 и имеет последовательность

DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHCICDANKEGMFLFRAARKLR  
QFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKNLNDL  
CFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEN,

а также его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного IL-7. IL-7 стимулирует дифференцирование мультипотентных (плюрипотентных) гемапоэтических стволовых клеток в лимфоидных клетках-предшественниках, включая развитие CD4/CD8 Т-клеток. IL-7 лимитирует выработку супрессорных регуляторных Т-клеток и через антагонизм к фактору TGF- $\beta$  вызывает анергию Т-клеток, а также поддерживает образование центральных Т-клеток памяти. IL-7 рассматривается для использования при лечении лимфопении при ВИЧ, онкологии, трансплантациях, HBV- и HCV-инфекциях, а также при лечении минимальной остаточной болезни или опухолей на поздней стадии, а также может играть роль при восстановлении или улучшении иммунотерапии. Так как для IL-7 определенный период полувыведения у людей составил приблизительно 10 ч (Sportès, C. et al. Phase I Study of Recombinant Human Interleukin-7 Administration in Subjects with Refractory Malignancy. Clin Cancer Res 2010;16:727-735), то его применение в немодифицированной форме ограничено.

Названия "фактор роста фибробластов 18" или "FGF-18" относятся к белку человека (UniProt № 076093(28-207)), который кодируется геном FGF18, имеющий последовательность

EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYAQLLVETD  
TFGSQVRIKQKTEFYLCMNRKGKLVGKPDGTSKECVFIEKVLNNYALMSAKYSGWYVGF  
KKGPRKPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTKRRIIRPTHPA

и его рекомбинантным и синтетическим версиям и последовательностям вариантов, обладающих по меньшей мере частью биологической активности нативного FGF-18. FGF-18 - это белковый фактор семейства факторов роста фибробластов (FGF). Факторы семейства FGF обладают различными видами митогенной и обеспечивающей выживание клеток активностью, а также вовлечены в разнообразные биологические процессы, включая развитие эмбриона, клеточный рост, морфогенез, репарацию тканей, рост и инвазию опухолей. При исследованиях *in vitro* показано, что этот белок способен индуцировать отрастание нейритов у PC12-клеток. FGF-18 стимулирует пролиферацию хондроцитов и остеобластов (клетки, которые образуют и поддерживают клеточные и хрящевые ткани), а его использование рассматривается в отношении репарации и генерации хрящевой ткани, например в коленных суставах (Ellsworth J.L. Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors. Osteoarthritis Cartilage (2002) 10:308-320).

"Гормон, стимулирующий  $\alpha$ -меланоциты" или " $\alpha$ -MSH" является пептидом из 13 аминокислот, образующийся как продукт протеолитического расщепления из гормона АСТН (1-13), который в свою очередь является продуктом расщепления проопиомеланокортина (POMC), имеющий последовательность N-Ас-SYSMGFRWGLPV, и его синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного  $\alpha$ -MSH.  $\alpha$ -MSH - неселективный агонист меланокортиновых рецепторов MC1, MC3, MC4 и MC5, но не MC2 (который является специфическим для АСТН).  $\alpha$ -MSH стимулирует меланоциты синтезировать и высвободить меланин, который обладает фотопротекторным действием; он передает сигналы в мозг, которые влияют на аппетит и сексуальное возбуждение. Он рассматривается в качестве применения для лечения эритропоэтической протопорфирии (EPP, непереносимости солнца), несегментального витилиго (обесцвечивание кожи), актинического кератоза (АК, солнечный кератитоз, предшественник рака кожи), полиморфного фотодерматоза (PLE/PMLE), послеоперационного повреждения почек, эректильной и сексуальной дисфункций. Из-за того, что его период полувыведения исчисляется всего лишь секундами, то его применение в немодифицированной форме ограничено.

Термин "эндостатин" обозначает встречающийся в природе С-концевой фрагмент массой 20 кДа, который происходит из коллагена XVIII типа (UniProt № P39060 (1572-1754)), имеющий последовательность

HSHRDFQPVHLVALNSPLSGMGRGADFCFQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRA  
 DRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFQKDVLRHPTWPQKSVWHGSDPNGR  
 RLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK,

и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного эндостатина. Эндостатин - это ингибитор ангиогенеза и он может взаимодействовать с проангиогенным действием факторов роста, таких как основной фактор роста фибробластов (bFGF/FGF-2) и VEGF. Его рассматривают для лечения некоторых видов рака. Из-за того что его период полувыведения составляет 13 ч (Thomas, J.P. et al. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* (2003) 21:223-231), его применение в немодифицированной форме ограничено.

Название "хуманин" обозначает пептид (UniProt № Q8IVG9(1-24)), кодируемый геном MT-RNR2, имеющий последовательность MAPRGFSCLLLTSEIDLPKRRA, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного хуманина. Хуманин играет роль в нейрозащите от клеточной смерти, связанной с болезнью Альцгеймера (AD), AD-сопутствующего инсульта, прион-индуцированного апоптоза и химически индуцированного нейронального повреждения (Hashimoto, Y., A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Aβ. *PNAS* (2001) 98:6336-6341). Недавно обнаружено, что хуманин помогает улучшить действие инсулина и снижает уровни глюкозы в крови (Muzumdar R.H., Humanin: A Novel Central Regulator of Peripheral Insulin Action. *PLoS One* (2009) 4:e6334). Рассматривается использование хуманина при лечении болезни Альцгеймера, диабета и сосудистых и сердечно-сосудистых заболеваний.

Название "глюкагон" обозначает глюкозрегулирующий пептид - глюкагон человека, имеющий последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного глюкагона. Термин "глюкагон", используемый в данном тексте, также включает пептидные миметики глюкагона. Нативный глюкагон синтезируется поджелудочной железой, высвобождаемый, когда уровни глюкозы падают очень низко, и вызывающий в печени конверсию запасенного гликогена в глюкозу и ее выделение в кровоток. Так как действие глюкагона противоположно действию инсулина, который передает сигнал клеткам организма захватывать глюкозу из крови, глюкагон также стимулирует высвобождение инсулина так, что вновь доступная в кровотоке глюкоза может поступать и использоваться инсулин-зависимыми тканями. Глюкагон-содержащие пептиды данного изобретения могут найти особое применение в увеличении уровней глюкозы в крови индивидов с имеющимися запасами глюкозы в печени и поддержания гомеостаза глюкозы при диабете. Глюкагон был клонирован, как описано в патенте США № 4826763.

"Глюкагонподобный белок-1" или "GLP-1" обозначает глюкагонподобный пептид-1 человека и его варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного GLP-1. Термин "GLP-1" включает GLP-1(1-37) человека, имеющий последовательность HDEFERHAEGTFTSDVSSTLEGQAALFIAWLKGRG, GLP-1(7-37) и GLP-1(7-36) амид. GLP-1 стимулирует секрецию инсулина, но только во время периодов гипергликемии. Безопасность GLP-1, благодаря этому качеству и тому наблюдению, что количество секретированного инсулина пропорционально интенсивности гипергликемии, выше по сравнению с инсулином. Биологический период полувыведения GLP-1(7-37)ОН составляет всего лишь 3-5 мин (патент США № 5118666). GLP-1-содержащие полипептиды этого изобретения могут найти особое применение при лечении диабета и нарушений метаболизма, устойчивых к инсулину, для регуляции глюкозы. GLP-1 был клонирован и получены его производные, как описано в патенте США № 5118666.

"Глюкагонподобный белок-2" или "GLP-2" собирательно в данном тексте обозначает глюкагонподобный пептид-2 человека, имеющий последовательность HADGFSFDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD, видовые гомологи GLP-2 человека и не встречающиеся в природе варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного GLP-2, включая такие варианты как, в числе прочего, вариант с глицином, замещающим аланин в положении 2 зрелой последовательности, что обеспечивает получение последовательности HGDGFSFDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD ("2G"), а также с Val, Glu, Lys, Arg, Leu или He, замещающие аланин в положении 2. GLP-2 или его варианты последовательностей были изолированы, синтезированы, описаны или клонированы, как описано в патентах или заявках США №№ 5789379; 5834428; 5990077; 5994500; 6184201; 7186683; 7563770; 20020025933 и 20030162703.

"Инсулин" обозначает инсулин человека или его гомолог, видовые варианты или варианты последовательностей, которые включают, в числе прочего, зрелый белок инсулина человека, состоящий из 51 аминокислоты с молекулярным весом 5808 Да, и предшественник проинсулина из 110 аминокислот. Белок-предшественник процессируется в зрелый инсулин, который имеет А-цепь с последовательностью GIVEQCCTSICSLYQLENYCN и В-цепь с последовательностью FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT, связанные вместе дисульфидными связями.

"А-цепь фактора XIII", "FXIIIА" или "F13А" обозначает белок свертывания крови (UniProt № P00488(2-732)), имеющий последовательность

```
SETSRTAFGGRRVPPNNSNAAEDDLPTVELQGVVPRGVNLQEFLNVTSVHLFKERWDTNKVD
HNTDKYENKLVIRRGQSFYVQIDFSRPYDPRRDLEFRVEYVIGRYPQENKGTYPVPIVSELQSGK
WGAKIVMREDRSVRLSIQSSPKCIVGKFRMYVAVWTPYGVLRTRNPETDTYILFNPWCEDDAV
YLDNEKEREYVLDIGVIFYGEVNDIKTRWSYGGQFEDGILDTCLYVMDRAQMDLSGRGNPIK
VSRVGSAMVNAKDDEGLVVGSDNIYAYGVPPSAWTGSDILLEYRSENPPVRYGQCWVFAG
VFNTFLRCLGIPARIVTNYFSAHDNDANLQMDIFLEEDGNVNSKLTKDSVWNYHCWNEAWMTR
PDLPVGFGGWQAVDSTPQENS DGM YRCGPASVQAIKHGHVCFQFDAPFVFAEVNSDLIYITAKK
DGTHVVENVDATHIGHKLIVTKQIGGDGMMDITDTYKFQEQEERLALETALMYGAKKPLNTE
GVMKRSRNVDMDFEVENAVLGKDFKLSITFRNNSHNRYTITAYLSANITFYTGVPKAEFKKETFD
VTLEPLSFKKEAVLIQAGEYMGQLLEQASLHFFVTARINETRDVLAKQKSTVLTPIEPIIKVRGTQV
VGS DMTVTVQFTNPLKETLRNVVHLDGPGVTRPMKKMFREIRPNSTVQWEEVCRPWVSGHR
KLIASMSDSL RHVYGELDVQIQRPSM,
```

и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного FXIIIА. Фактор XIII является последним ферментом в каскаде свертывания крови и отвечает за перекрестное связывание молекул фибрина друг с другом в новообразующемся сгустке крови. Образование внутримолекулярных ковалентных связей между мономерами фибрина и перекрестное связывание  $\alpha$ -2 антиплазмина, фибриногена, фибронектина, коллагена и других белков для усиления механической прочности фибринового сгустка защищает от протеолитической деградации и обеспечивает стабильность внутриклеточного матрикса. FXIII плазмы циркулируют в виде гетеротетрамера, состоящего из 2 А-субъединиц и 2 В-субъединиц, нековалентно связанных вместе и присоединенных к фибриногену. В-субъединица, которая, как оказалось, стабилизирует структуру А-субъединицы и защищает А-субъединицу от протеолиза, обычно присутствует в плазме в избытке как свободная В-субъединица FXIII. Большинство пациентов с дефицитом FXIII несут мутации в субъединице А FXIII; в некоторых случаях сообщалось о наличии у пациентов мутаций в субъединице В FXIII (Mikkola H., 1996, Semin Thromb Hemost, 22:393; Ichinose A., 1996, Semin Thromb Hemost, 22:385). FXIIIА используется или предполагается использовать при лечении гемофилии и связанной с ней коагулопатии, наследственного дефицита FXIII и приобретенного дефицита FXIII из-за хронического заболевания печени, воспалительных заболеваний кишечника и послеоперационного кровотечения.

"Фактор X" или "FX" обозначает белок свертывания крови (UniProt № P00742(2-488)), имеющий последовательность

```
GRPLHLVLLSASLAGLLLGESLFIREQANNILARVTRANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEE
AREVFEDSDKTNEFWNKYKGDGQCETSPCQNQGKCKDGLGEYTCTCLEGFEGKNCELFTRKLC
SLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADNGKACIPTGPYPGKQTLERRKRSVAQATSSSGE
APDSITWKPYDAADLDPTENPFDLLDFNQTPERGDNNLTRIVGGQECKDGECWPQALLINEEN
EGFCGGTILSEFYILTAANCLYQAKRFKVRVGDNRNTEQEEGGEAVHEVEVVIKHNRFKETYDF
DIAVLRLLKTPITFRMNVAPACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLLKMLEVPYV
DRNSCKLSSFIITQNMFCAGYDTKQEDACQDSSGGPHVTRFKDTYFVTGIVSWGEGCARKGKY
GIYTKVTAFLKWIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK,
```

и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного FX. Фактор X при активации с помощью фактора IX (со своим кофактором, фактором VIII, для образования комплекса, известного как внутренняя Хаза) и фактора VII со своим кофактором, тканевым фактором (для образования комплекса, известного как внешняя Хаза) превращается в фактор Ха. Фактор X - это первый участник завершения обычного (или тромбинового) пути. Фактор X применяется для лечения дефицита фактора X, гемофилии А и В, используя обходные стратегии из-за того, что у пациентов, принимающих факторы FVIII и FIX, развиваются ингибирующие антитела к препаратам FVIII и FIX заместительной терапии), неотложной терапии пациентов с кровоизлияниями из-за передозировки антикоагулянтами или критическими кровотечениями неизвестного происхождения и для пациентов, у которых развился приобретенный дефицит FX, обусловленный недостатком витамина К, амилоидоз, тяжелые заболевания печени и при использовании антикоагулянтов (например, варфарина). Так как период полувыведения зрелого фактора X составляет 40-45 ч, период полувыведения активированного фактора X (Fxa) в плазме составляет <1-2 мин ((Bunce M.W., 2008, Blood, 117:290), то это делает применение его немодифицированной формы ограниченным из-за быстрой инактивации антитромбином III и TFP1.

#### 4. Нуклеиновые кислоты как нагрузочные вещества.

Данное изобретение также подразумевает использование нуклеиновых кислот как нагрузочных веществ в ХТЕН-конъюгатах. В одном осуществлении в этом изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-

нагрузочное вещество, в которых нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из аптамеров, антисмысловых олигонуклеотидов, рибозимных нуклеиновых кислот, РНК-интерферирующих нуклеиновых кислот и антигенных нуклеиновых кислот. Такие нуклеиновые кислоты используются как лекарственные средства, известные в этой области (Edwin Jarald, *Nucleic acid drugs: a novel approach*. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (12):662-666, 2004; Joanna B. Opalinska. *Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications*. Nature Reviews Drug Discovery 1:503-514, 2002).

IV). Конъюгаты ХТЕН-кросс-линкеров и ХТЕН-нагрузочных веществ и способы получения таких конъюгатов.

Настоящее изобретение относится к высокоочищенным препаратам конъюгационных составов ХТЕН-кросс-линкер, которые можно использовать в качестве участников конъюгации, к которым присоединяются нагрузочные вещества, как описано в данном тексте. Также изобретение относится к высокоочищенным препаратам нагрузочных веществ, связанных с одним или более ХТЕН при помощи участников конъюгации ХТЕН-кросс-линкер. Настоящее изобретение включает в себя композиции и способы получения конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество, образованных путем связывания любого из описанных в данном тексте ХТЕН с нагрузочным веществом, а также химически активные композиции и способы получения композиций, образованных путем конъюгации ХТЕН с кросс-линкером, или другие описанные в данном тексте химические способы. В частности, отмечается, что термины "ХТЕН-нагрузочное вещество" и "ХТЕН-кросс-линкер" включают в себя связанные с ними продукты реакции, которые остаются после конъюгации реагирующих веществ - участников конъюгации, включая продукты реакции кросс-линкеров, реактантов клик-химии или других описанных в данном тексте методов. В некоторых вариантах реализации ХТЕН, применяемые для создания конъюгатов, являющихся объектами изобретения, содержат ХТЕН, выбранные из любой последовательности в табл. 2, 3 и 22-25, которые могут быть связаны с нагрузочным веществом прямо или посредством описанных в данном тексте кросс-линкеров. В других вариантах реализации один или более из ХТЕН, применяемых для создания конъюгатов, являющихся объектами изобретения, содержат в отдельности последовательность ХТЕН, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или в другом варианте 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с ХТЕН, выбранным из табл. 2, 3 и 22-25, или его фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В одном варианте реализации конъюгаты, являющиеся объектами изобретения, являются мультимерными, что означает, что они содержат первую и вторую последовательность ХТЕН, при этом ХТЕН являются одинаковыми либо разными и каждый в отдельности содержит последовательность ХТЕН, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или в другом варианте 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98%, 99 или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с ХТЕН, выбранным из табл. 2, 3 и 22-25, или его фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В другом варианте реализации конъюгаты, являющиеся объектами изобретения, являются мультимерными, что означает, что они содержат первую, вторую и третью последовательность ХТЕН, при этом ХТЕН являются одинаковыми либо разными и каждый в отдельности содержит последовательность ХТЕН, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или в другом варианте 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с ХТЕН, выбранным из табл. 2, 3 и 22-25, или его фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В другом варианте реализации конъюгаты, являющиеся объектами изобретения, являются мультимерными, что означает, что они содержат 3, 4, 5, 6 или более последовательностей ХТЕН, при этом ХТЕН являются одинаковыми либо разными и каждый в отдельности содержит последовательность ХТЕН, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или в другом варианте 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с ХТЕН, выбранным из табл. 2, 3 и 22-25, или его фрагментом. В мультимерных конъюгатах суммарная длина остатков в последовательностях ХТЕН является большей чем от около 200 до около 3000 или от около 400 до около 1000 аминокислотных остатков, а ХТЕН могут являться одинаковыми либо разными по последовательности или по длине. При употреблении в данном тексте подразумевается, что суммарная длина включает в себя общую длину в аминокислотных остатках, в случае, когда более одного ХТЕН включено в состав конъюгата.

В одном аспекте изобретения предложены композиции из ХТЕН, ковалентно связанных с низкомолекулярным нагрузочным лекарственным веществом, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-лекарственное вещество ("ХТЕН-D" ("D" - от англ. "drug")). В другом аспекте изобретения предложены композиции из ХТЕН, ковалентно связанных с нагрузочными биологически активными белками (которые включают в себя пептиды или полипептиды), что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-пептид/полипептид ("ХТЕН-P" ("P" - от англ. "peptide")). В другом аспекте изобретения предложены композиции из одного или более ХТЕН, рекомбинантно связанных с нагрузочным пептидом или полипептидом, что приводит к образованию рекомбинантного гибридного белка ХТЕН-пептид/полипептид ("ХТЕН-PR" ("PR" - от англ. "recombinant" и "peptide")). В другом аспекте изобретения предложены ком-

позиции из одного или более XTEN, связанных с нагрузочными веществами из одного или более лекарственных веществ или одного или более белков, которые могут быть биологически активными или могут являться нацеленными веществами. В частности, в изобретении предложены отдельные композиции XTEN-D, XTEN-P, XTEN-PR и XTEN-D-P, которые могут применяться для лечения болезненного состояния, для которого в данной области известно, что введение нагрузочного лекарственного вещества и/или белка является целесообразным для лечения, улучшения или предотвращения заболевания или болезненного состояния пациента. В общем случае конъюгаты XTEN-D содержат один или более из следующих компонентов: 1) XTEN; 2) кросс-линкер и 3) нагрузочное вещество, к которому XTEN присоединен химическим способом, прямо или посредством кросс-линкера, такого как описанные в данном тексте коммерчески доступные кросс-линкеры, или посредством реактантов клик-химии, или, в некоторых случаях, они могут быть образованы вследствие конъюгации между функциональными группами в XTEN и нагрузочным веществом без применения линкера, как описано в данном тексте. XTEN-P в общем случае содержат один или более из следующих компонентов: 1) XTEN; 2) кросс-линкер и 3) биологически активный нагрузочный белок, и в общем случае также образуются вследствие конъюгации посредством кросс-линкера или реактантов клик-химии. Конъюгаты XTEN-PR в общем случае содержат один или более из следующих компонентов: 1) один или более XTEN; 2) спейсерную последовательность и 3) нагрузочное вещество. XTEN-D-P в общем случае содержат один или более из следующих компонентов: 1) XTEN; 2) произвольный линкер; 3) биологически активный белок и 4) лекарственное вещество, при этом нагрузочные вещества в общем случае образованы вследствие конъюгации посредством кросс-линкера или реактантов клик-химии, как описано выше. При этом в некоторых случаях, касающихся вышеописанных композиций, эти композиции могут быть созданы без применения кросс-линкера при условии, что компоненты обладают химической активностью иного рода.

Конъюгация XTEN с нагрузочными веществами обеспечивает полученным в результате композициям несколько преимуществ по сравнению с нагрузочными веществами, неприсоединенными к XTEN. Как более полно описано ниже, неограничивающие примеры усиленных свойств включают увеличение общей растворимости и метаболической стабильности, сниженную восприимчивость к протеолизу во время циркуляции, сниженную иммуногенность, сниженную скорость всасывания при подкожном или внутримышечном введении, сниженное выведение почками, повышенное взаимодействие с субстратом, сниженную токсичность, нацеленную доставку нагрузочного вещества и усиленные фармакокинетические свойства. Усиленные фармакокинетические свойства конъюгатов по сравнению с нагрузочным веществом, неприсоединенным к XTEN, включают более длительный терминальный период полувыведения (например, двукратно, трехкратно или четырехкратно превышающий обычный), увеличенную площадь под кривой (ППК) (например, на 25%, 50%, 100% или более), более низкий объем распределения, более медленное всасывание после подкожной или внутримышечной инъекции (что является преимуществом по сравнению с коммерчески доступными формами нагрузочных веществ, которые вводятся таким же способом), что приводит к более низкой величине средней максимальной концентрации, что, в свою очередь, приводит к снижению нежелательных действий нагрузочного вещества, что все вместе приводит к увеличению периода времени, на протяжении которого вводимая пациенту конъюгационная композиция оказывает терапевтическое действие. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгационные композиции содержат расщепляемые последовательности (более детально описанные ниже), что делает возможным пролонгированное высвобождение активного нагрузочного вещества так, что вводимый конъюгат XTEN-нагрузочное вещество действует в качестве депо при подкожном или внутримышечном введении. В частности, предполагается, что конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество могут проявлять одно или более либо любую комбинацию из описанных в данном тексте улучшенных свойств. В результате данных усиленных свойств конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество обеспечивают возможность менее частого дозирования, более индивидуализированного дозирования и/или сниженной токсичности по сравнению с нагрузочным веществом, неприсоединенным к XTEN и вводимым схожим способом. Подобные конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество обладают свойством излечивать определенные болезненные состояния, на которые, как известно в данной области, восприимчивы к, улучшаются или предотвращаются при введении нагрузочного вещества нуждающемуся в этом пациенту, как описано в данном тексте.

1. Кросс-линкер и азид/алкиновые реактанты клик-химии для конъюгации.

В другом аспекте реализации данное изобретение относится к XTEN, присоединенным к кросс-линкерам, что приводит к образованию конъюгатов XTEN-кросс-линкер, которые можно применять для получения конъюгационных композиций XTEN-нагрузочное вещество. В частности, описанные в данном тексте участники конъюгации XTEN-кросс-линкер можно применять для конъюгации с нагрузочными веществами или поверхностями, несущими по меньшей мере одну тиоловую, amino, карбоксильную, альдегидную или спиртовую либо любую другую функциональную группу, которая является доступной и подходящей, как известно в данной области, для реакции между описанными в данном тексте компонентами. В другом аспекте реализации данное изобретение относится к способам получения конъюгатов из реактантов XTEN-кросс-линкер и XTEN-азид/алкиновых реактантов клик-химии, что приводит к образованию конъюгатов, которые можно применять для получения конъюгационных компо-

зий ХТЕН-нагрузочное вещество. В частности, описанные в данном тексте способы получения ХТЕН-кросс-линкеров и ХТЕН-азид/алкиновых реактантов можно применять в случае, если нагрузочное вещество или реакционная поверхность несет по меньшей мере одну тиоловую, amino-, карбоксильную, альдегидную, алкеновую, алкиновую, гетероциклическую, спиртовую либо другую функциональную группу, которая является доступной для реакции.

Примеры вариантов реализации ХТЕН были описаны выше, включая получение в основном гомогенных ХТЕН. В изобретении предложены ХТЕН, которые дополнительно служат в качестве платформы, к которой могут быть присоединены нагрузочные вещества, так, что они служат в качестве "носителя", обеспечивая композициям определенные необходимые фармакокинетические, химические и фармацевтические свойства среди других описанных ниже свойств. В других вариантах реализации в изобретении предложены полинуклеотиды, которые кодируют ХТЕН, которые могут быть присоединены к генам, кодирующим пептидные или полипептидные нагрузочные вещества, которые могут быть включены в экспрессионные векторы и внесены в подходящие хозяйские организмы для экспрессии и выделения рекомбинантных гибридных белков ХТЕН-нагрузочное вещество, являющихся объектами изобретения. В некоторых вариантах реализации изобретения компоненты ХТЕН, описанные выше в данном тексте, сконструированы так, чтобы включать определенное количество функциональных аминокислотных остатков, которые могут реагировать с перекрестно-сшивающими веществами или могут дополнительно содержать функциональные группы, которые могут участвовать в конъюгации с нагрузочными веществами. В одном варианте реализации в изобретении предложены цистеин-сконструированные ХТЕН, в которых молекулы цистеина, каждая из которых содержит функциональную тиоловую группу, присоединены к кросс-линкеру, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-кросс-линкер. В другом варианте реализации в изобретении предложены лизин-сконструированные ХТЕН, в которых молекулы лизина, каждая из которых содержит положительно заряженную гидрофильную  $\epsilon$ -аминогруппу, присоединены к кросс-линкеру, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-кросс-линкер. В вариантах реализации цистеин-сконструированных ХТЕН каждый из них содержит от около 1 до около 100 аминокислот цистеина, или от 1 до около 50 аминокислот цистеина, или от 1 до около 40 аминокислот цистеина, или от 1 до около 20 аминокислот цистеина, или от 1 до около 10 аминокислот цистеина, или от 1 до около 5 аминокислот цистеина, или 9 цистеинов, или 3 цистеина, или одну аминокислоту цистеина, которые доступны для конъюгации. В вариантах реализации лизин-сконструированных ХТЕН каждый из них содержит от около 1 до около 100 аминокислот лизина, или от 1 до около 50 аминокислот лизина, или от 1 до около 40 аминокислот лизина, или от 1 до около 20 аминокислот лизина, или от 1 до около 10 аминокислот лизина, или от 1 до около 5 аминокислот лизина, или 9 лизинов, или 3 лизина, или одну аминокислоту лизина, которые доступны для конъюгации. В другом варианте реализации изобретения сконструированный ХТЕН содержит остатки как цистеина, так и лизина, в вышеприведенных диапазонах или количествах.

В общем случае тиоловые группы цистеина ХТЕН являются более функциональными, т.е. более нуклеофильными, по отношению к электрофильным конъюгационным реагентам, чем аминные или гидроксильные группы. Вдобавок, остатки цистеина, как правило, присутствуют в данном белке в меньших количествах; и, таким образом, вероятность множественной конъюгации в пределах одного и того же белка является меньшей. Остатки цистеина вносили в белки методами генной инженерии для образования ковалентных связей с лигандами или для образования новых внутримолекулярных дисульфидных связей (Better et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 13:9644-9650; Bernhard et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; Greenwood et al. (1994) *Therapeutic Immunology* 1:247-255; Tu et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:4862-4867; Kanno et al. (2000) *J. of Biotechnology*, 76:207-214; Chmura et al. (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98(15):8480-8484; патент США № 6248564).

В одном варианте реализации в изобретении предложена отдельная композиция, содержащая цистеин-сконструированный ХТЕН, конъюгированный с кросс-линкером, в которой кросс-линкер выбран из сульфгидрил-функциональных гомобифункциональных или гетеробифункциональных кросс-линкеров. В другом варианте реализации в изобретении предложена отдельная композиция, содержащая лизин-сконструированный ХТЕН, конъюгированный посредством кросс-линкера, в которой кросс-линкер выбран из амин-функциональных гомобифункциональных или гетеробифункциональных кросс-линкеров. Перекрестное сшивание представляет собой процесс химического связывания двух или более молекул ковалентной связью. Этот процесс также называется конъюгацией или биоконъюгацией в случае, когда он применим к белкам или другим биомолекулам. Например, белки можно модифицировать для того, чтобы внести изменения в N- и C-концы и аминокислотные боковые цепи на белках и пептидах с целью заблокировать или открыть функциональные связывающие участки, инактивировать функции или изменить функциональные группы для создания новых мишеней для перекрестного сшивания.

В одном аспекте реализации в изобретении предложены способы для сайт-специфической конъюгации с полимером ХТЕН, осуществляемой путем применения химически активных аминокислотных остатков или их производных (например, N-концевой  $\alpha$ -аминной группы,  $\epsilon$ -аминной группы лизина, тиоловой группы цистеина, C-концевой карбоксильной группы, карбоксильных групп глутаминовой ки-

слоты и аспарагиновой кислоты). Функциональными группами, подходящими для реакций с первичными  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппами, являются хлорцианураты, дихлортреазины, трезилаты, бензотриазолкарбонаты, п-нитрофенилкарбонаты, трихлорфенилкарбонаты, альдегиды, смешанные ангидриды, карбонилимидазолы, имидоэфиры, N-гидроксисукцинимидэфиры, N-гидроксисульфосукцинимидэфиры (Harris, J. M., Herati, R.S. Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.), 32(1), 154-155 (1991); Herman, S., et al. Macromol. Chem. Phys. 195, 203-209 (1994); Roberts, M.J. et al. A. Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 459-476 (2002)). N-гидроксисукцинимидэфиры (NHS-эфиры и их водорастворимые аналоги сульфо-NHS-эфиры) обычно применяют для конъюгации белка (см. фиг. 2). NHS-эфиры дают на выходе устойчивые амидные продукты при реакции с первичными аминами с относительно эффективным сопряжением при физиологическом уровне pH. Реакции конъюгации обычно проводят в 50-200 мМ фосфатного, бикарбонатного/карбонатного, ГЭПЭС или боратного буферов (pH от 7 до 9) при температуре от 4°C до комнатной на протяжении от 0,5 до 2 ч. NHS-эфиры обычно применяют в молярном количестве, от 2 до 50 раз превышающем количество белка. Обычно концентрация реагента может варьироваться от 0,1-10 мМ, в то время как оптимальная концентрация белка составляет 50-100 мкМ.

В другом способе при условии, что полипептиды XTEN обладают только одной N-концевой  $\alpha$ -аминогруппой, XTEN можно сконструировать так, чтобы они содержали дополнительную  $\epsilon$ -аминогруппу(ы) специально включенных остатков лизина; примеры последовательностей которых приведены в табл. 3.  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппы характеризуются разными величинами pKa: приблизительно от 7,6 до 8,0 для  $\alpha$ -аминогруппы N-концевой аминокислоты и приблизительно 10-10,5 для  $\epsilon$ -аминогруппы лизина. Такую значительную разницу в величинах pKa можно использовать для избирательной модификации аминокислот. Депротонирование всех первичных аминов происходит при величине pH выше 8,0. В таком окружении нуклеофильные свойства различных аминов определяют их реакционную способность. Как правило, при депротонировании большее количество нуклеофильных  $\epsilon$ -аминогрупп лизинов являются более реакционноспособными в отношении электрофилов, чем  $\alpha$ -аминогруппы. С другой стороны, при более низком уровне pH (например, pH 6), как правило, большее количество кислотных  $\alpha$ -аминогрупп являются более депротонированными, чем  $\epsilon$ -аминогруппы, и порядок реакционной способности является обратным. Например, одобренный управлением по контролю за продуктами и лекарствами препарат нейласта (пэгфилграстим) представляет собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF - от англ. "granulocyte colony-stimulating factor"), модифицированный посредством ковалентного присоединения 20 кДа ПЭГ-альдегида. Специфическую модификацию N-концевой аминокислоты белка проводили путем использования более низкой pKa для  $\epsilon$ -аминогруппы по сравнению с  $\alpha$ -аминогруппами внутренних лизинов (Molineaux, G. Curr. Pharm. Des. 10, 1235-1244 (2004), Патент США 5824784). Полипептиды XTEN, содержащие остатки цистеина, можно генетически конструировать при помощи рекомбинантных технологий, описанных в данном тексте (см., например, примеры) или при помощи стандартных методов, известных в данной области. Конъюгацию с тиоловыми группами можно проводить при помощи высокоспецифических реакций, которые приводят к образованию одиночных продуктов конъюгации, соединенных перекрестно-сшивающими веществами. Функциональными группами, подходящими для реакций с тиоловыми группами цистеина, являются N-малеинимиды, галоацетилы и пиридилдисульфиды. Малеинимидная группа реагирует непосредственно с сульфгидрильными группами, когда уровень pH реакционной смеси составляет между pH 6,5 и 7,5, образуя стабильную тиоэфирную связь, которая не является обратимой (см. фиг. 3). При нейтральном уровне pH малеинимиды реагируют с сульфгидрилами в 1000 раз быстрее, чем с аминами, но когда уровень pH превышает 8,5, реакция происходит преимущественно с аминами. Малеинимиды не реагируют с тирозинами, гистидинами или метионинами. При составлении реакционных растворов тиолы следует исключить из реакционных буферов, которые применяются с малеинимидами, так как они будут конкурировать с ними за сайты сопряжения. Избыток малеинимидов в реакции можно компенсировать в конце реакции путем добавления тиолов, в то время как ЭДТК можно включать в буфер для сопряжения, чтобы минимизировать окисление сульфгидрилов. В другом варианте реализации изобретения предполагается применение галоацетильных реагентов, которые используются для перекрестного сшивания сульфгидрильных групп XTEN или нагрузочных веществ для получения конъюгатов, являющихся объектами данного изобретения. Наиболее часто применяемые галоацетильные реагенты содержат йодоацетильную группу, которая реагирует с сульфгидрильными группами при физиологическом уровне pH. Реакция йодоацетильной группы с сульфгидрильной сопровождается нуклеофильным замещением йода тиолом, что приводит к образованию стабильной тиоэфирной связи (см. фиг. 4). Создание небольшого избытка йодоацетильных групп над количеством сульфгидрильных групп при pH 8,3 обеспечивает сульфгидрильную избирательность. При наличии большого избытка йодоацетильных групп йодоацетильная группа может реагировать с другими аминокислотами. Имидазолы могут реагировать с йодоацетильными группами при pH 6,9-7,0, но инкубация должна проходить более одной недели. Боковые цепи и аминокислоты гистидила реагируют в непротонированной форме с йодоацетильными группами при уровне pH выше 5 и 7 соответственно. В другом варианте реализации изобретения кросс-линкеры, применяемые для сульфгидрильных групп, представляют собой пиридилдисульфиды. Пиридилдисульфиды реагируют с йодоацетильными группами

в широком диапазоне рН (оптимальны уровень рН составляет 4-5), образуя дисульфидные связи, соединяющие ХТЕН с нагрузочными веществами (см. фиг. 5). Как дисульфиды, конъюгаты, полученные с применением этих реагентов, являются отщепляемыми. Во время реакции между -SH группой и 2-пиридилдитиоловой группой молекулы происходит дисульфидный обмен. В результате происходит высвобождение пиридин-2-тиона. Эти реагенты можно использовать в качестве кросс-линкеров и для того, чтобы вносить в белки сульфгидрильные группы. Дисульфидный обмен можно проводить при физиологическом уровне рН, хотя скорость реакции при этом снижается.

Конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащие активные синтетические пептиды или полипептиды, можно изготовить, используя химически активные аминокислотные остатки или их производные; например N-концевую  $\alpha$ -аминогруппу,  $\epsilon$ -аминогруппу лизина, тиоловую группу цистеина, карбоксильную группу C-концевой аминокислоты, карбоксильную группу аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты. Каждый пептид содержит N-концевую  $\alpha$ -аминогруппу вне зависимости от первичной аминокислотной последовательности. При необходимости N-концевую  $\alpha$ -аминогруппу можно оставить защищенной/заблокированной при химическом синтезе активного пептида/полипептида. Синтетический пептид/полипептид может содержать дополнительную  $\epsilon$ -аминогруппу(ы) лизина, которая может иметь природное происхождение или быть специально замещенной для конъюгации. Как описано выше,  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппы можно избирательно модифицировать при различных уровнях рН. Другой подход к избирательной модификации  $\alpha$ - или  $\epsilon$ -аминогруппы в синтетическом пептиде состоит в реверсивной защите аминокислотных групп ди-трет-бутилдикарбонатом ( $\text{BOC}_2$ ). Например, избирательная защита  $\text{BOC}$  пептида вапреотида (синтетического аналога соматостатина) была достигнута путем модификации при рН 6 (защита  $\alpha$ -группы) или рН 8,5 (защита  $\epsilon$ -группы). Затем оставшиеся свободные аминокислотные группы специфически модифицировали при помощи ПЭГ-N-гидроксисукцинимидов или ПЭГ-альдегидов. В конце защиту  $\text{BOC}$  удаляли при помощи обработки кислотой, чтобы получить монофункциональные пептиды (Morgurgo, M. et al. Selective Alkylation and Acylation of  $\alpha$  and  $\epsilon$  Amino Groups with PEG in a Somatostatin Analogue: Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* 2002. 13:1238-1243). Так как цистеины в общем случае реже встречаются в пептидных и белковых последовательностях природного происхождения, чем лизины, использование цистеинов в качестве участка для конъюгации снижает вероятность множественных конъюгаций с молекулами ХТЕН-кросс-линкер в реакции. Также это снижает вероятность деактивации пептида/белка при конъюгации. Более того, конъюгацию с цистеиновыми участками часто можно проводить четко определенным способом, что приводит к образованию одиночных продуктов конъюгации полимер ХТЕН-пептид или полимер ХТЕН-полипептид. В некоторых случаях в аминокислотной последовательности пептида, подлежащего конъюгации, может отсутствовать цистеин. В таком случае остаток цистеина можно присоединить к N- или C-концу пептида рекомбинантно или синтетически при помощи стандартных методов. В альтернативном варианте выбранную аминокислоту можно химически или генетически модифицировать в цистеин. Как один из примеров, модификация серина в цистеин считается консервативной мутацией. Другим подходом к внесению тиоловой группы в пептиды, в которых отсутствует цистеин, является химическая модификация  $\epsilon$ -аминогруппы лизина при помощи тиолирующих реагентов, таких как 2-иминотиолан (реагент Траута), SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SATP (N-сукцинимидил-S-ацетилтиопропионат), SAT-PEO<sub>4</sub>-Ac (N-сукцинимидил-S-ацетил(тиотетраэтиленгликоль)), СПДП (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил-6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат) (более полно описаны ниже). После того как индивидуальная тиоловая группа внесена в пептид, его можно избирательно модифицировать при помощи соединений, содержащих сульфгидрильные реакционноспособные группы, такие как N-малеимиды, галоацетилы и пиридилдисульфиды, как описано выше.

Конъюгации между полипептидом ХТЕН и пептидом, белком или низкомолекулярным лекарственным веществом можно достичь при помощи большого количества соединительных химических веществ, включая коммерчески доступные кросс-линкерные соединения нулевой длины, гомо- или гетеробифункциональные и мультифункциональные, согласно способам, известным и доступным в данной области, таким как описанные, например, в R.F. Taylor (1991) "Protein immobilization. Fundamentals and Applications", Marcel Dekker Inc., N.Y.; G.T. Hermanson et al. (1992) "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, San Diego; G.T. Hermanson (2008) "Bioconjugate Techniques", 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, Inc., S.S. Wong (1991) "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton. Подходящие перекрестно-сшивающие вещества для применения в получении конъюгатов, являющихся объектами изобретения, являются коммерчески производимыми такими компаниями как Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific (Pierce Protein Research Products), Invitrogen, ProteoChem, G-Biosciences. Предпочтительные варианты реализации кросс-линкеров содержат тиолреакционноспособную функциональную группу или аминокислотную реакционноспособную функциональную группу. Список примеров кросс-линкеров приведен в табл. 13.



## Примеры кросс-линкеров

Кросс-линкер
<p>Малеинимиды, галоацетилы, пиридилдисульфиды, галоацетилы, пиридилдисульфиды, АБГ (<i>n</i>-азидобензоилгидразид), АМАС (<i>N</i>-(<math>\alpha</math>-малеинимидаоацетокси)сукцинимид эфир), АНБ-НОС (<i>N</i>-5-азидо-2-нитробензилокси-сукцинимид), АПДП (<i>N</i>-(4-[<i>n</i>-азидосалициламидо]бутил)-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид), АСБА (4-(<i>n</i>-азидосалициламидо)-бутиламин), БАСЭД (Бис-(<math>\beta</math>-[4-азидосалициламидо]этил)дисульфид), БМБ (1,4-Бис-малеинимидобутан), БМДБ (1,4 Бисмалеинимидил-2,3-дигидроксидобутан), БМГ (Бис-малеинимидогексан), БМОЭ (Бис-малеинимидоэтан), БМПГ (<i>N</i>-(<math>\beta</math>-малеинимидопропионово́й кислоты)гидразид), БМПС (<i>N</i>-(<math>\beta</math>-малеинимидопропилокси)сукцинимид эфир), БМ(ПЭГ)<sub>2</sub> (1,8-Бис-малеинимидоэтиленгликоль), БМ(ПЭГ)<sub>3</sub> (1,11-Бис-малеинимидотриэтиленгликоль), БС<sup>2</sup>Г (Бис(сульфосукцинимидил)глутарат), БС<sup>3</sup> (сульфо-ДСС) (Бис(сульфосукцинимидил)суберат), БС(ПЭГ)<sub>5</sub> (Бис(NHS)ПЭГ<sub>5</sub>), БС(ПЭГ)<sub>9</sub> (Бис(NHS)ПЭГ<sub>9</sub>), БСОКОЭС (Бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), С6-САНГ (С6-сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоат), ДЦК (<i>N,N</i>-дициклогексилкарбодимид), ДФДНБ (1-5-дифтор-2,4-динитробензен), ДМА (диметил адипимидат), ДМП (диметил пимелимидат), ДМС (диметил суберимидат), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)бутан), ДСГ (дисукцинимидил глутарат), ДСП (дитиобис(сукцинимидилпропионат), реагент Ломанта), ДСС (дисукцинимидил суберат), ДСТ (дисукцинимидил тартрат), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат)), ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид), ЭГС (этиленгликоль бис(сукцинимидилсукцинат)), ЭМКК (<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-малеинимидокапроновая кислота), ЭМКГ (<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-малеинимидокапроново́й кислоты)гидразид), ЭМКС (<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-малеинимидокапроилокси)сукцинимид эфир), ГМБС (<i>N</i>-(<math>\gamma</math>-малеинимидобутиролокси)сукцинимид эфир), КМУК (<i>N</i>-<math>\kappa</math>-малеинимидоундекановая кислота), КМУГ (<i>N</i>-<math>\kappa</math>-малеинимидоундеканово́й кислоты)гидразид), ЛЦ-SDA (NHS-ЛЦ-диазирин), ЛЦ-СМЦК (сукцинимидил 4-(<i>N</i>-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксии-(6-амидокапроат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)гексаноат), МБС (<i>m</i>-малеинимидобензоил-<i>N</i>-гидроксисукцинимид эфир), МФБГ (4-(4-<i>N</i>-малеинимидофенил)-масляной кислоты гидразид), NHS-АСК (<i>N</i>-гидроксисукцинимидил-4-азидосалициловая кислота), ПДПГ (3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид), ПМПИ (<i>N</i>-(<i>n</i>-малеинимидофенил)изоцианат), САДП (сукцинимидил (4-азидофенил дитио)пропионат), САЭД (сукцинимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), САНД (сукцинимидил-2-(<i>m</i>-азидо-<i>o</i>-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), САНГ (сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), САНФАГ (<i>N</i>-сукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), САСД (сукцинимидил-2-(<i>p</i>-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), СБАП (сукцинимидил 3-(бромоацетамидо)пропионат), СДА (NHS-диазирин), СДАД (NHS-СС-диазирин), СФАД (сукцинимидил(перфторазидабензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоат), СГТГ (сукцинимидил 4-гидразидотерефталат), СИА (<i>N</i>-сукцинимидил йодоацетат), СИАБ (<i>N</i>-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), СМФБ (сукцинимидил 4-(<i>p</i>-малеинимидофенил)бутират), СМЦК (сукцинимидил 4-(<i>N</i>-малеинимидо-метил)циклогексан-1-карбоксиилат), СМ[ПЭГ]<sub>2</sub> (NHS-ПЭГ<sub>2</sub>-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>4</sub> (NHS-ПЭГ<sub>4</sub>-малеинимид), СМ(ПЭГ)<sub>6</sub> (NHS-ПЭГ<sub>6</sub>-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>8</sub> (NHS-ПЭГ<sub>8</sub>-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>12</sub> (NHS-ПЭГ<sub>12</sub>-малеинимид), СМ(ПЭГ)<sub>24</sub> (NHS-ПЭГ<sub>24</sub>-малеинимид), СМФБ (сукцинимидил 4-(<i>n</i>-малеинимидо-фенил)бутират), СМПГ (сукцинимидил-6-(<math>\beta</math>-малеинимидопропионамидо)гексаноат), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-<math>\alpha</math>-(2-пиридилдитио)толуол), СПБ (сукцинимидил-(4-псорален-8-илокси)бутират), СПДП (<i>N</i>-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ДСТ (сульфодисукцинимидил тартрат), сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис(сульфо-сукцинимидил сукцинат)), сульфо-ЭМКС (<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-малеинимидокапроилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГМБС (<i>N</i>-(<math>\gamma</math>-малеинимидобутиролокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГСАБ (<i>N</i>-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат), сульфо-КМУС (<i>N</i>-<math>\kappa</math>-малеинимидоундеканилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ЛЦ-СДА (сульфо-NHS-ЛЦ-диазирин), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-(<math>\alpha</math>-метил-<math>\alpha</math>-(2-пиридилдитио)-толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо)гексаноат), сульфо-МБС (<i>m</i>-малеинимидобензоил-<i>N</i>-гидроксисульфосукцинимид эфир), сульфо-NHS-ЛЦ-АСА (сульфосукцинимидил(4-азидо-салициламидо)гексаноат), сульфо-САДП (сульфосукцинимидил (4-азидофенил дитио)пропионат), сульфо-САЭД (сульфосукцинимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНД (сульфосукцинимидил-2-(<i>m</i>-азидо-<i>o</i>-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНФАГ (сульфосукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), сульфо-САСД (сульфосукцинимидил-2-(<i>p</i>-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), сульфо-СДА (сульфо-NHS-диазирин), сульфо-СДАД (сульфо-NHS-СС-диазирин), сульфо-СФАД (сульфосукцинимидил(перфторазидабензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-СИАБ (сульфосукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(<i>N</i>-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксиилат), сульфо-СМФБ (сульфосукцинимидил 4-(<i>n</i>-малеинимидофенил)бутират), ТГФП (<math>\beta</math>-трис[гидроксиметил]фосфиновая)пропионо́вая кислота (бетанин), ТМЭА (<i>трис</i>-(2-малеинимидоэтил)амин), ТСАТ (<i>трис</i>-(сукцинимидил аминотриацетат)), 3-пропаргилоксипропановая кислота, NHS эфир, ацетилсн-ПЭГ-NHS эфир, дибензилциклооктин, (ДБЦО)-NHS эфир, ДБЦО-ПЭГ-NHS эфир, циклооктин (ЦОТ)-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ-пентафторфенил (ПФФ) эфир, БЦОТ-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ-пентафторфенил (ПФФ) эфир, ацетилен-ПЭГ<sub>4</sub>-малеинимид, ДБЦО-малеинимид, ЦОТ-малеинимид, БЦОТ-малеинимид, 3-азид-пропионо́вая кислота, NHS эфир, 6-азид-гексановая кислота, NHS эфир, 3-азид-пропионо́вая кислота, ПФФ эфир, 6-азид-гексановая кислота, ПФФ эфир, азид-ПЭГ-NHS эфир, азид-ПЭГ-ПФФ эфир, азид-ПЭГ-малеинимид, <i>N</i>-(5-аминопентил)малеинимид, аминопентил-малеинимид</p>

Неограничивающими примерами кросс-линкеров являются АБГ (*n*-азидобензоилгидразид), АМАС (*N*-( $\alpha$ -малеинимидаоацетокси)сукцинимид эфир), АНБ-НОС (*N*-5-азидо-2-нитробензилокси)сукцинимид), АПДП (*N*-(4-[*n*-азидосалициламидо]бутил)-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид), АСБА (4-(*n*-азидосалициламидо)бутиламин), БАСЭД (бис-( $\beta$ -[4-азидосалициламидо]этил)дисульфид), БМБ (1,4-бис-малеинимидобутан), БМДБ (1,4-бис-малеинимидил-2,3-дигидроксидобутан), БМГ (бис-малеинимидо-гексан), БМОЭ (бис-малеинимидоэтан), БМПГ (*N*-( $\beta$ -малеинимидопропионово́й кислоты)гидразид),

БМПС (N-(β-малеинимидопропилокси)сукцинимид эфир), БМ(ПЭГ)<sub>2</sub> (1,8-бис-малеинимидо-этиленгликоль), БМ(ПЭГ)<sub>3</sub> (1,11-бис-малеинимидотриэтиленгликоль), БС<sup>2</sup>Г (бис-(сульфосукцинимидил)глутарат), БС<sup>3</sup> (сульфо-ДСС) (бис-(сульфосукцинимидил)суберат), БС[ПЭГ]<sub>5</sub> (бис-(NHS)ПЭГ<sub>5</sub>), БС(ПЭГ)<sub>9</sub> (бис (NHS)ПЭГ<sub>9</sub>), БСОКОЭС (бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), С6-САНГ (С6-сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоат), ДЦК (N,N-дициклогексилкарбодимид), ДФДНБ (1-5-дифтор-2,4-динитробензен), ДМА (диметил адипимидат), ДМП (диметил пимелимидат), ДМС (диметил суберимидат), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)бутан), ДСГ (дисукцинимидил глутарат), ДСП (дитиобис(сукцинимидилпропионат), реагент Ломанта), ДСС (дисукцинимидил суберат), ДСТ (дисукцинимидил тартарат), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис-(сульфосукцинимидилпропионат)), ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид), ЭГС (этиленгликоль бис(сукцинимидилсукцинат)), ЭМКК (N-ε-малеинимидокапроновая кислота), ЭМКГ (N-(ε-малеинимидокапроновой кислоты)гидразид), ЭМКС (N-(ε-малеинимидокапроилокси)сукцинимид эфир), ГМБС (N-(γ-малеинимидобутирилокси)сукцинимид эфир), КМУК (N-κ-малеинимидоундекановая кислота), КМУГ (N-(κ-малеинимидоундекановой кислоты)гидразид), ЛЦ-СДА (NHS-ЛЦ-диазириин), ЛЦ-СМЦК (сукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксо-(6-амидокапроат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), МБС (малеинимидобензоил-N-гидроксисукцинимид эфир), МФБГ (4-(4-N-малеинимидофенил)масляной кислоты гидразид), NHS-АСК (N-гидроксисукцинимидил-4-азидосалициловая кислота), ПДПГ (3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид), ПМПИ (N-(η-малеинимидофенил)изоцианат), САДП (сукцинимидил (4-азидофенил дитио)пропионат), САЭД (сукцинимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), САНД (сукцинимидил-2-(м-азидо-о-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), САНГ (сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), САНФАГ (N-сукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), САСД (сукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), СБАП (сукцинимидил 3-(бромоацетамидо)пропионат), СДА (NHS-диазириин), СДАД (NHS-СС-диазириин), СФАД (сукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоат), СГТГ (сукцинимидил 4-гидразидотерефталат), СИА (N-сукцинимидил йодоацетат), СИАБ (N-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), СМФБ (сукцинимидил 4-(п-малеинимидофенил)бутират), СМЦК (сукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), СМ[ПЭГ]<sub>2</sub> (NHS-ПЭГ<sub>2</sub>-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>4</sub> (NHS-ПЭГ<sub>4</sub>-малеинимид), СМ(ПЭГ)<sub>6</sub> (NHS-ПЭГ<sub>6</sub>-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>8</sub> (NHS-ПЭГ<sub>8</sub>-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>12</sub> (NHS-ПЭГ<sub>12</sub>-малеинимид), СМ(ПЭГ)<sub>24</sub> (NHS-ПЭГ<sub>24</sub>-малеинимид), СМФБ (сукцинимидил 4-(η-малеинимидо-фенил)бутират), СМПГ (сукцинимидил-6-(β-малеинимидопропионамидо)гексаноат), СМПП (4-сукцинимидил-оксикарбонил-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол), СПБ (сукцинимидил-(4-псорален-8-илокси)бутират), СПДП (N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ДСТ (сульфодисукцинимидил тартрат), сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис-(сульфосукцинимидил суцинат)), сульфо-ЭМКС (N-(ε-малеинимидокапроилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГМБС (N-(γ-малеинимидобутрилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГСАБ (N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат), сульфо-КМУС (N-(κ-малеинимидоундеканилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ЛЦ-СДА (сульфо-NHS-ЛЦ-диазириин), сульфо-ЛЦ-СМПП (сульфосукцинимидил 6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-МБС (малеинимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимид эфир), сульфо-NHS-ЛЦ-АСА (сульфосукцинимидил(4-азидо-салициламидо) гексаноат), сульфо-САДП (сульфосукцинимидил (4-азидофенил дитио) пропионат), сульфо-САЭД (сульфосукцинимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНД (сульфосукцинимидил-2-(м-азидо-о-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНФАГ (сульфосукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), сульфо-САСД (сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), сульфо-СДА (сульфо-NHS-диазириин), сульфо-СДАД (сульфо-NHS-СС-диазириин), сульфо-СФАД (сульфосукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-СИАБ (сульфосукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-СМФБ (сульфосукцинимидил 4-(п-малеинимидофенил)бутират), ТГФП (β-(трис[гидроксиметил]фосфиновая)пропионовая кислота (бетаин)), ТМЭА (трис-(2-малеинимидоэтил) амин), ТСАТ (трис-(сукцинимидил аминотриацетат)).

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, в которых используются перекрестно-сшивающие реагенты, включают в себя спейсерную "ножку" не природного происхождения. Однако в тех случаях, когда предпочтительной является пептидная связь природного происхождения, изобретение предполагает, что реакцию можно проводить, применяя кросс-линкеры нулевой длины, которые действуют посредством активации карбоксилатной группы. В соответствующих вариантах реализации для того, чтобы достичь избирательности реакции, первый полипептид должен содержать только свободную С-концевую карбоксильную группу, в то время как все боковые цепи лизина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты являются защищенными, а N-концевой α-

амин второго пептида/белка должен являться единственной доступной незащищенной аминогруппой (т.е. необходимо, чтобы любые лизины, аспарагины или глутамины были защищены). В таких случаях предпочтительным является применение последовательностей семейства XTEN AG из табл. 2, в которых отсутствует глутаминовая кислота в качестве первого полипептида в XTEN-нагрузочное вещество или XTEN-кросс-линкер. Соответственно, в одном варианте реализации в изобретении предложены XTEN-кросс-линкер или XTEN-нагрузочное вещество, содержащие последовательности AG XTEN, при этом композиции соединены с нагрузочными веществами посредством кросс-линкеров нулевой длины. Примеры кросс-линкеров нулевой длины, применяемых в данном варианте реализации изобретения, включают, но не ограничиваются этим, ДЦК (N,N-дициклогексилкарбодиимид) и ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид), при этом кросс-линкеры используются для прямой конъюгации карбоксильных функциональных групп одной молекулы (такой как нагрузочное вещество) с первичным амином другой молекулы, такой как нагрузочное вещество с подобной функциональной группой (см. фиг. 6). Сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) и NHS (N-гидроксисукцинимид) применяют в качестве катализаторов для конъюгации, повышая тем самым эффективность реакции (Grabarek Z., Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. (1990) Anal. Biochem. 185(1), 131-135). ЭДК реагирует с группой карбоновой кислоты и активирует карбоксильную группу до образования активного промежуточного продукта O-ацилизо мочевины, обеспечивая возможность ее сопряжения с аминогруппой в реакционной смеси. Промежуточный продукт O-ацилизо мочевины нестабилен в водных растворах, что делает ее неэффективной в двухэтапных процессах конъюгации без повышения стабильности промежуточного продукта при помощи N-гидроксисукцинимид. Этот промежуточный продукт реагирует с первичным амином до образования производного амида. Реакция перекрестного сшивания обычно проходит при уровне pH между 4,5 и 5, и для многих применений она требует всего нескольких минут. При этом выход реакции является одинаковым для pH от 4,5 до 7,5. Гидролиз ЭДК является параллельной реакцией, проходящей во время сопряжения, и зависит от температуры, pH и буферного состава. 4-Морфолиноэтансульфоновая кислота (МЭС) является эффективным карбодиимидным реакционным буфером. Фосфатные буферы снижают эффективность реакции ЭДК, но увеличение количества ЭДК может компенсировать сниженную эффективность. Трис-буферы, а также глициновые и ацетатные буферы лучше не применять в качестве конъюгационных буферов. Также в изобретении предложены композиции, в которых XTEN связаны посредством трехвалентных кросс-линкеров, что приводит к образованию тримерных конъюгатов XTEN-кросс-линкер. Тримерные кросс-линкеры можно создать путем соединения трехвалентной основы, такой как третичный амин, тризамещенный метан или 1,3,5-тризамещенный бензен, или ассиметричной трехвалентной молекулы, такой как дипептид LysLys, или дипептид GluGlu, или дипептид AspAsp, или трипептид CysCysCys, посредством спейсеров с различными реакционноспособными боковыми группами, перечисленными в табл. 14, при помощи стандартных конъюгационных методов. В одном варианте реализации в изобретении предложены композиции, в которых три XTEN ковалентно связаны трехвалентным кросс-линкером, выбранным из группы, состоящей из тиолреакционноспособного Трис-(2-малеинимидоэтил)амин (ТМЭА), аминреакционноспособного Трис-(сукцинимидил аминотриацетата) (ТСАТ) и кросс-линкеров, приведенных в табл. 14.

Таблица 14

## Трехвалентные кросс-линкеры

Трехвалентный кросс-линкер*			
Трехвалентная основа	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Третичный амин тризамещенный метан 1,3,5- тризамещенный бензен LysLys GluGluGlu AspAspAsp CysCysCys	азид	азид	азид
	алкин	алкин	алкин
	NHS	NHS	NHS
	малеинимид	малеинимид	малеинимид
	йодоацетил	йодоацетил	йодоацетил
	азид	NHS	NHS
	азид	азид	NHS
	азид	йодоацетил	йодоацетил
	азид	азид	йодоацетил
	алкин	NHS	NHS
	алкин	алкин	NHS
	алкин	йодоацетил	йодоацетил
	алкин	алкин	йодоацетил
	алкин	малеинимид	малеинимид
	алкин	алкин	малеинимид
	NHS	малеинимид	малеинимид
	NHS	NHS	малеинимид
NHS	алкин	малеинимид	

\* Состоящий из трехвалентной основы + любой компонент из группы 1 + любой компонент из группы 2 + любой компонент из группы 3.

В других вариантах реализации изобретения ХТЕН и нагрузочные вещества можно конъюгировать посредством широкой группы кросс-линкеров, включая те, которые состоят из спейсерной "ножки" (линейной или разветвленной) и двух или более реакционноспособных концов, которые способны присоединяться к определенным функциональным группам (например, первичным аминам, сульфгидрилам и т.д.) на белках или других молекулах. Линейные кросс-линкеры могут быть гомобифункциональными или гетеробифункциональными. Гомобифункциональные кросс-линкеры содержат две идентичные реакционноспособные группы, которые используются для перекрестного сшивания белков в одноэтапном процессе реакции. Неограничивающими примерами аминреакционноспособных гомобифункциональных кросс-линкеров являются БС2Г (бис-(сульфосукцинимидил)глутарат), БС3 (сульфо-ДСС) (бис-(сульфосукцинимидил)суберат), БС[ПЭГ]5 (бис-(NHS)ПЭГ5), БС(ПЭГ)9 (бис (NHS)ПЭГ9), БСОКОЭС (бис-(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), ДФДНБ (1-5-дифтор-2,4-динитробензен), ДМА (диметил адипимидат), ДМП (диметил пимелимидат), ДМС (диметил суберимидат), ДСГ (дисукцинимидил глутарат), ДСП (дитиобис(сукцинимидилпропионат), реагент Ломанта), ДСС (дисукцинимидил суберат), ДСТ (дисукцинимидил тартарат), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат)), ЭГС (этиленгликоль бис(сукцинимидил-сукцинат)), сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис-(сульфосукцинимидил-сукцинат)).

Вдобавок примерами гомобифункциональных кросс-линкеров, применяемых в композициях и в способах для создания композиций ХТЕН-нагрузочное вещество и/или ХТЕН-кросс-лиinker, являются сульфгидрилреакционноспособные вещества, такие как БМБ (1,4-бис-малеинимидобутан), БМГ (бис-малеинимидогексан), БМДБ (1,4-бис-малеинимидил-2,3-дигидроксибутан), БМОЭ (бис-малеинимидоэтан), БМ(ПЭГ)2 (1,8-бис-малеинимидоэтиленгликоль), БМ(ПЭГ)3 (1,11-бис-малеинимидотриэтиленгликоль), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)бутан), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан). Для создания конъюгатов ХТЕН-кросс-лиinker для последующей конъюгации с нагрузочными веществами, а также конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество предпочтительными являются гетеробифункциональные кросс-линкеры, так как они обеспечивают возможность управления последовательными реакциями. Так как гетеробифункциональные кросс-линкеры содержат две разные реакционноспособные группы, их использование в композициях обеспечивает возможность последовательной двухэтапной конъюгации. Гетеробифункциональный реагент вступает в реакцию с первым белком посредством более лабильной группы. В одном варианте реализации изобретения конъюгация гетеробифункционального кросс-линкера с реакционноспособной группой ХТЕН приводит к образованию конъюгата ХТЕН-кросс-лиinker. После завершения реакции и удаления излишка непрореагировавшего кросс-линкера модифицированный белок (такой как ХТЕН-кросс-лиinker) можно добавлять к нагрузочному веществу, которое взаимодействует со второй реакционноспособной группой кросс-линкера, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество. Наиболее часто применяемые гетеробифункциональные кросс-линкеры содержат аминреакционноспособную группу на одном конце и сульфгидрилреакционноспособную группу на другом конце. Соответственно, эти кросс-линкеры подходят для применения с цистеин- или лизин-сконструированными ХТЕН или с  $\alpha$ -аминогруппой N-конца ХТЕН. Неограничивающими примерами гетеробифункциональных кросс-линкеров являются АМАС (N-( $\alpha$ -малеинимидоацетокси)сукцинимид эфир), БМПС (N-( $\beta$ -малеинимидопропилокси)сукцинимид эфир), ЭМКС (N-( $\epsilon$ -малеинимидокапроилокси)сукцинимид эфир), ГМБС (N-( $\gamma$ -малеинимидобутирилокси)сукцинимид эфир), ЛЦ-СМЦК (сукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), МБС (m-малеинимидобензоил-N-гидроксисукцинимид эфир), СБАП (сукцинимидил 3-(бромоацетамидо)пропионат), СИА (N-сукцинимидил йодоацетат), СИАБ (N-сукцинимидил-(4-йодоацетил)аминобензоат), СМФБ (сукцинимидил 4-(n-малеинимидофенил)бутират), СМЦК (сукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), СМ[ПЭГ]<sub>2</sub> (NHS-ПЭГ2-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>4</sub> (NHS-ПЭГ4-малеинимид), СМ(ПЭГ)<sub>6</sub> (NHS-ПЭГ6-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>8</sub> (NHS-ПЭГ8-малеинимид), СМ[ПЭГ]<sub>12</sub> (NHS-ПЭГ12-малеинимид), СМ(ПЭГ)<sub>24</sub> (NHS-ПЭГ24-малеинимид), СМФБ (сукцинимидил 4-(n-малеинимидофенил)бутират), СМПГ (сукцинимидил-6-( $\beta$ -малеинимидопропионамидо)гексаноат), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил- $\alpha$ -(2-пиридилдитио)толуол), СПДП (N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ЭМКС (N-( $\epsilon$ -малеинимидокапроилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГМБС (N-( $\gamma$ -малеинимидобутирилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-КМУС (N-( $\kappa$ -малеинимидоундеканилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-( $\alpha$ -метил- $\alpha$ -[2'-пиридилдитио]толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-МБС (m-малеинимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимид эфир), сульфо-СИАБ (сульфосукцинимидил-(4-йодоацетил)аминобензоат), сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-СМФБ (сульфосукцинимидил 4-(n-малеинимидофенил)бутират). Примером гетеробифункционального кросс-линкера, который обеспечивает возможность ковалентной конъюгации амин- и сульфгидрил-содержащих молекул, является сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(N-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат). Сульфо-СМЦК представляет собой водорастворимый аналог СМЦК, который

можно получать в водных буферах вплоть до концентрации в 10 мМ. Циклогексановое кольцо в составе спейсерной "ножки" данного кросс-линкера снижает скорость гидролиза малеинимидной группы по сравнению с аналогичными реагентами, не содержащими такое кольцо. Данный факт делает возможными лиофилизацию ХТЕН, который был малеинимидактивирован при помощи СМЦК или сульфо-СМЦК, и его сохранение для дальнейшей конъюгации с сульфгидрилсодержащей молекулой. Таким образом, в одном варианте реализации в изобретении предложен ХТЕН-кросс-линкер, содержащий ХТЕН, обладающий по меньшей мере около 80% идентичности в последовательности, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% идентичности в последовательности, либо является идентичным последовательности или фрагменту последовательности, выбранной из табл. 3, в случае оптимального выравнивания, при этом ХТЕН-кросс-линкер содержит один или более кросс-линкеров сульфо-СМЦК, связанных с  $\alpha$ -аминогруппой ХТЕН или  $\epsilon$ -амином лизин-сконструированного ХТЕН. В другом варианте реализации в изобретении предложен ХТЕН-кросс-линкер, содержащий ХТЕН, обладающий по меньшей мере около 80% идентичности в последовательности, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% идентичности в последовательности, либо является идентичным последовательности или фрагменту последовательности, выбранной из табл. 2, в случае оптимального выравнивания, при этом ХТЕН-кросс-линкер содержит один сульфо-СМЦК, связанный с аминогруппой N-конца ХТЕН. Вышеописанные гетеробифункциональные кросс-линкеры соединяют две молекулы посредством одиночного амина или одиночного цистеина. Для сайт-специфической конъюгации к дисульфидным мостикам в белках был разработан особый тип кросс-линкеров (Balan S. et al. Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge. (2007) *Bioconjugate Chem.* 18, 61-76; Brocchini S. et al. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. (2008) *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 3-12). Сначала синтезируют линкер в виде амин-специфического эфира 4-[2,2-бис(п-толилсульфонил)метил]ацетилбензойной кислоты-NHS. Эту молекулу можно ковалентно присоединить к аминогруппе ХТЕН, чтобы получить ХТЕН-бис(сульфон). Инкубация последней молекулы в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,8, приведет к устранению толуолсульфиновой кислоты и получению ХТЕН- $\alpha,\beta$ -ненасыщенного  $\beta^1$ -моносулфона. Полученная в результате молекула будет вступать в реакцию с содержащим дисульфидный мостик нагрузочным белком сайт-специфическим способом. На первом этапе дисульфидный мостик преобразуется посредством восстановления в два тиола. На втором этапе ХТЕН-моносулфон бис-алкилирует два цистеина, что приводит к образованию химически стабильного трехуглеродного мостика. Тот же самый  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный  $\beta^1$ -моносулфон можно применять не только для конъюгации двух тиоловых групп, полученных из дисульфидного мостика, но также для конъюгации с полигистидиновыми маркерами (Cong Y. et al. Site-specific PEGylation athistidine tags. (2012) *Bioconjugate Chem.* 23, 248-263).

Конъюгацию с использованием композиций ХТЕН-кросс-линкер с сульфо-СМЦК обычно проводят в два этапа. В одном варианте реализации изобретения аминсодержащий белок готовят в конъюгационном буфере, например фосфатно-солевом буфере (ФСБ = 100 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, рН 7,2) или подобном буфере, не содержащем аминов и сульфгидрилов, при рН 6,5-7,5. Добавление ЭДТК до 1-5 мМ помогает хелатировать двухвалентные металлы, тем самым снижая образование дисульфидов в сульфгидрилсодержащем белке.

Концентрация аминсодержащего белка определяет необходимый молярный выход кросс-линкера. В общем случае в белковых образцах <1 мг/мл используется 40-80-кратный молярный выход, в белковых образцах в 1-4 мг/мл используется 20-кратный молярный выход, а в белковых образцах в 5-10 мг/мл используется 5-10-кратный молярный выход кросс-линкера. Реакционную смесь (аминсодержащий белок и кросс-линкер) инкубируют на протяжении 30 мин при комнатной температуре или на протяжении 2 ч при 4°C, а затем излишек кросс-линкеров удаляют при помощи обессоливающей колонки, уравновешенной конъюгационным буфером. В случае получения ХТЕН-кросс-линкер композицию удерживают в этой точке. В вариантах реализации, в которых ХТЕН-кросс-линкер конъюгируют с нагрузочным веществом, сульфгидрилсодержащее нагрузочное вещество и конъюгат ХТЕН-кросс-линкер смешивают в молярном соотношении, соответствующим тому, которое требуется для результирующего конъюгата (принимая во внимание количество ожидаемых кросс-линкеров, конъюгированных с одной или более аминогруппами, на молекулу ХТЕН), и в соответствии с единственной сульфгидрильной группой, содержащейся в нагрузочном веществе. Реакционную смесь инкубируют на протяжении 30 мин или 2 ч при 4°C. Эффективность конъюгации можно оценить при помощи SDS-PAGE, сопровождающимся окрашиванием белка, или при помощи соответствующего метода аналитической хроматографии, такого как обращенно-фазовая HPLC или катионо/анионообменная хроматография.

В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции ХТЕН-кросс-линкер, созданные с применением мультивалентных кросс-линкеров, что приводит к образованию композиций, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6 или более ХТЕН. В другом варианте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции ХТЕН-кросс-линкер-нагрузочное вещество, созданные с

применением мультивалентных кросс-линкеров, что приводит к образованию композиций, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6 или более ХТЕН, связанных с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более различными нагрузочными веществами. Неограничивающими примерами мультивалентных трифункциональных кросс-линкеров являются "Y-образный" сульфидрилреакционноспособный ТМЭА (трис-(2-малеинимидоэтил)амин) и ТСАТ (трис-(сукцинимидил аминотриацетат)). Используя каркасный полимер, как линейный, так и разветвленный, можно разработать любую комбинацию реакционноспособных веществ для мультивалентных композиций. Примеры показаны на фиг. 7, где конструкции могут содержать любую комбинацию гомо- или гетерофункциональных реакционноспособных групп. Особый интерес представляют тримерные конфигурации, схематически показанные на фиг. 21-23 и 97-105, а также тетрамерные конфигурации, показанные на фиг. 21 и 105-106. Не привязываясь к конкретной теории, предполагается, что в конъюгационной композиции, содержащей три ХТЕН, связанных трифункциональным линкером (с нагрузочными веществами, в свою очередь связанными с ХТЕН посредством включенных остатков лизина или цистеина), можно использовать пропорционально более короткий ХТЕН для каждой "ножки" конструкции по сравнению с моновалентной композицией ХТЕН-нагрузочное вещество, в которой такое же самое количество нагрузочных веществ связано с цистеином или лизином либо N-концевыми аминокислотами каждого из ХТЕН, а результирующая тримерная композиция ХТЕН-нагрузочное вещество будет иметь кажущуюся молекулярную массу и гидродинамический радиус сравнимые с мономерной композицией ХТЕН-нагрузочное вещество, но при этом будет иметь меньшую вязкость, что способствует введению композиции пациенту через иглы малого диаметра, и обеспечит равноценное или лучшее действие нагрузочных веществ благодаря сниженному стерическому несоответствию и повышенной гибкости композиции по сравнению с мономерной композицией ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащей такое же самое количество аминокислот.

В одном варианте реализации в изобретении предложена композиция, содержащая три ХТЕН, связанных трехвалентным кросс-линкером, при этом раствор, содержащий приблизительно 100 мг/мл белка данной композиции, имеет вязкость, которая по меньшей мере на около 5 сП, или около 6 сП, или около 7 сП, или около 8 сП, или около 9 сП, или около 10 сП ниже, чем соответствующая ей величина для линейного ХТЕН с такими же молекулярной массой и концентрацией. В другом варианте реализации в изобретении предложена композиция, содержащая четыре ХТЕН, связанных четырехвалентным кросс-линкером, при этом раствор, содержащий приблизительно 100 мг/мл белка данной композиции, имеет вязкость, которая по меньшей мере на около 5 сП, или около 6 сП, или около 7 сП, или около 8 сП, или около 9 сП, или около 10 сП ниже, чем соответствующая ей величина для линейного ХТЕН с такими же молекулярной массой и концентрацией.

В способах получения таких композиций, в которых используются мультивалентные кросс-линкеры, можно применять такие же условия реакций, так те, что описаны в данном тексте выше, а пример реализации данного способа и сопутствующие данные приведены ниже в примерах. Вдобавок, мультивалентные кросс-линкеры можно легко получить посредством модификации олигомеров лизина. Например, пептид Lys-Lys содержит три аминокислотные группы, одну  $\alpha$ -аминокислотную группу и две  $\epsilon$ -аминокислотные группы на каждом остатке Lys. Эти аминокислотные группы можно преобразовать в большое количество других реакционноспособных групп, посредством проведения реакции с бифункциональными кросс-линкерами, которые имеют одну аминреакционноспособную группу. Например, реакция Lys-Lys с кросс-линкером ДБЦО-NHS дает на выходе продукт, который содержит три ДБЦО группы. Реакция Lys-Lys с кросс-линкером N-мал-NHS дает на выходе продукт, который содержит три N-мал группы. Аналогичным путем можно получить четырехвалентные кросс-линкеры на основе Lys-Lys-Lys и кросс-линкеры большей валентности при помощи более длинных пептидов лизина.

Кросс-линкеры могут быть классифицированы как "гомобифункциональные" или "гетеробифункциональные", при этом гомобифункциональные кросс-линкеры содержат две или более идентичных реакционно-способных группы и применяются в одноэтапных реакционных процессах для произвольного связывания или полимеризации молекул, содержащих подобные функциональные группы, а гетеробифункциональные кросс-линкеры обладают различными реакционно-способными группами, которые обеспечивают возможность одноэтапной конъюгации молекул, которые имеют соответствующие целевые функциональные группы, или обеспечивают возможность последовательной (двухэтапной) конъюгации, что минимизирует нежелательную полимеризацию или самоконъюгацию. В предпочтительном варианте реализации изобретения, в котором ХТЕН-кросс-линкеры получены и выделены в виде композиций для последующей реакции, ХТЕН-кросс-линкер связан с гетеробифункциональным кросс-линкером и содержит по меньшей мере одну реакционноспособную группу, доступную для последующей реакции. В одном варианте реализации в изобретении предложены ХТЕН-кросс-линкеры и ХТЕН-нагрузочные вещества, которые конъюгированы посредством отщепляемых кросс-линкеров с дисульфидными связями. Обычно отщепление стимулируется веществами, восстанавливающими дисульфидные связи, такими как  $\beta$ -меркаптоэтанол, ДТТ, ТХЭФ, при этом предполагается, что такие композиции будут эндогенно отщепляться эндогенными восстановительными веществами (такими как цистеин и глутатион) способом, предусматривающим медленное высвобождение. Далее приведены неограничиваю-

шие примеры таких кросс-линкеров: АПДП (N-(4-[n-азидосалициламидо]бутил)-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид), БАСЭД (бис-(β-[4-азидосалициламидо]этил)дисульфид), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)бутан), ДСП (дитиобис(сукцинимидилпропионат), реагент Ломанта), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис-(сульфосукцинимидилпропионат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), ПДПГ (3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид), СДАД (NHS-СС-диазириин), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол), СПДП (N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-САЭД (сульфосукцинимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНД (сульфосукцинимидил-2-(m-азидо-о-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-СДАД (сульфо-NHS-СС-диазириин), сульфо-СФАД (сульфосукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат). В другом варианте реализации изобретения конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащие БСОКОЭС (бис(2-[сукцинимидилоксикарбонилокси]этил)сульфон), могут расщепляться в щелочных средах. В другом варианте реализации изобретения конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащие ДСТ (дисукцинимидил тартарат) и БМДБ (1,4-бисмалеинимидил-1,2,3-дигидроксидобутан), могут расщепляться посредством окисления периодатом. ЭГС (этиленгликоль бис(сукцинимидилсукцинат)) и сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис(сульфо-сукцинимидилсукцинат)) расщепляются гидроксиламинном, но, как ожидается, должны расщепляться эндогенно так, что будет происходить высвобождение активного нагрузочного вещества из конъюгата.

В общем случае для вышеописанных конъюгационных реагентов предполагается, что кросс-лиinker вступает в реакцию с группами, являющимися в других случаях стабильными и инертными, такими как амины, сульфгидрилы и карбоксилы. В других вариантах реализации в изобретении предложен отличный подход к конъюгации, основанный на отдельных модификациях ХТЕН и нагрузочного вещества с двумя функциональными группами, которые в общем случае являются стабильными и неактивными в отношении биополимеров, но при этом высокореактивны по отношению друг к другу. В соответствии с концепцией клик-химии было отобрано несколько ортогональных реакций, которые обеспечивают выход реагентов ХТЕН-азид/алкин, которые обладают высокостабильными свойствами и, следовательно, исключительно подходят для последующей конъюгации с нагрузочными веществами в отдельной реакции (Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40(11), 2004-2021). В общем случае клик-химия используется в качестве концепции для проведения реакций, которые включают реакции с участием (1) алкин-азид; (2) "ен"-тиола и (3) альдегид-гидразида, а в изобретении предусматривается применение всех трех этих реакций. Одним из примеров является реакция Хьюсена - 1,3-диполярное циклоприсоединение алкинов к азидам до образования 1,4-двузамещенных-1,2,3-триазолов, как показано на фиг. 8. Азидные и алкиновые компоненты можно внести в пептид/белок, или нагрузочные лекарственные вещества, или в ХТЕН путем химической модификации N-концевых α-аминогрупп, ε-аминогрупп лизина и сульфгидрильных групп цистеина. В табл. 15 приведены неограничивающие примеры реагентов клик-химии, предназначенных для применения в получении конъюгационных композиций, причем один компонент предполагаемого конъюгата (и ХТЕН либо нагрузочное вещество) реагирует с реагентом 1 из таблицы, а второй компонент (нагрузочное вещество или ХТЕН) реагирует с азидным реагентом 2 из таблицы. Например, одну молекулу модифицируют при помощи алкинового компонента, используя аминреакционноспособный алкин, такой как 3-пропаргилноксипропановая кислота, NHS эфир, ацетилен-ПЭГ4-NHS эфир, дибензилциклооктин (ДБСО)-NHS эфир, ДБСО-ПЭГ4-NHS эфир, циклооктин (ЦОТ)-ПЭГ2-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ3-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ4-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ2-пентафторфенил (ПФФ) эфир, ЦОТ-ПЭГ3-ПФФ эфир, ЦОТ-ПЭГ4-ПФФ эфир, БЦОТ-ПЭГ2-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ3-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ4-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ2-ПФФ эфир, БЦОТ-ПЭГ3-ПФФ эфир, БЦОТ-ПЭГ4-ПФФ эфир. В альтернативном варианте молекулу модифицируют сульфгидрилреакционноспособным алкином, таким как ацетилен-ПЭГ4-малеинимид, ДБЦО-малеинимид или ДБЦО-ПЭГ4-малеинимид. Вторую молекулу модифицируют азид-ПЭГ2-NHS эфиром, азид-ПЭГ3-NHS эфиром, азид-ПЭГ4-NHS эфиром, азид-ПЭГ2-ПФФ эфиром, азид-ПЭГ3-ПФФ эфиром, азид-ПЭГ4-ПФФ эфиром или азид-ПЭГ4-малеинимидом. Азидный и алкиновый компоненты можно использовать взаимозаменяемо; они являются биологически уникальными, стабильными и инертными в отношении биологических молекул и водных сред. При смешивании азидные и алкиновые реагенты образуют необратимую ковалентную связь без каких-либо побочных реакций (Moses J.E. and Moorhouse A.D. The growing applications of click chemistry. (2007) *Chem. Soc. Rev.* 36, 1249-1262; Breinbauer R. and Köhn M. Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry. (2003) *ChemBioChem* 4(11), 1147-1149; Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41(14), 2596-2599). В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий первый ХТЕН, соединенный со вторым ХТЕН, при этом первый ХТЕН связан с алкиновым реагентом 1 из табл. 15, второй ХТЕН связан с азидным реагентом 2 из табл. 15, и первый

ХТЕН и второй ХТЕН соединяют в условиях, стимулирующих реакцию между алкиновым реактантом 1 и азидным реактантом 2, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-ХТЕН. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий первый ХТЕН, соединенный с нагрузочным веществом, при этом ХТЕН связан с алкиновым реактантом 1 из табл. 15, нагрузочное вещество связано с азидным реактантом 2 из табл. 15, и затем ХТЕН и нагрузочное вещество соединяют в условиях, стимулирующих реакцию между алкиновым реактантом 1 и азидным реактантом 2, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий первый ХТЕН, соединенный с нагрузочным веществом, при этом ХТЕН связан с азидным реактантом 2 из табл. 15, нагрузочное вещество связано с алкиновым реактантом 1 из табл. 15, и затем ХТЕН и нагрузочное вещество соединяют в условиях, стимулирующих реакцию между алкиновым реактантом 1 и азидным реактантом 2, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество. В вышеприведенных вариантах реализации условия, которые стимулируют реакцию, являются такими, как описанные в данном тексте, или являются реакционными условиями, известными в данной области для конъюгации подобных реактантов. Изобретение также предусматривает различные комбинации вышеприведенных конъюгатов; например конъюгат ХТЕН-ХТЕН, в котором ХТЕН связаны посредством реактантов клик-химии и в котором один из ХТЕН дополнительно содержит одну или более молекул нагрузочного вещества, соединенную с ХТЕН при помощи клик-химии, конъюгат ХТЕН-ХТЕН, в котором ХТЕН связаны посредством реактантов клик-химии, в котором один ХТЕН дополнительно содержит одну или более молекул первого нагрузочного вещества, соединенную с ХТЕН при помощи клик-химии, а второй ХТЕН дополнительно содержит одну или более молекул второго нагрузочного вещества, соединенную с ХТЕН при помощи клик-химии. Дополнительные варианты подобных комбинаций будут очевидны для специалиста в данной области.

Таблица 15

Алкиновые и азидные реактанты клик-химии

Алкиновый реактант 1	Присоединен к:	Азидный реактант 2	Присоединен к:
3-пропаргилоксипропановая кислота, NHS эфир*	Амин	3-азид-пропионовая кислота, NHS эфир*	Амин
ацетилен-(оксиэтил) <sub>n</sub> -NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин	6-азид-гексановая кислота, NHS эфир*	Амин
дибензилциклооктин (ДБЦО)-NHS эфир*	Амин	3-азид-пропионовая кислота, ПФФ эфир	Амин
ДБЦО-(оксиэтил) <sub>n</sub> -NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин	6-азид-гексановая кислота, ПФФ эфир	Амин
циклооктин (ЦОТ)-NHS эфир*	Амин	азид-(оксиэтил) <sub>n</sub> -NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин
ЦОТ-(оксиэтил) <sub>n</sub> -NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин	азид-(оксиэтил) <sub>n</sub> -PFP эфир, где n равно 1-10	Амин
ЦОТ-(оксиэтил) <sub>n</sub> -пентафторфенил (ПФФ) эфир, где n равно 1-10	Амин	1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-овая кислота N-гидроксисукцинимид эфир	Амин
БЦОТ-NHS эфир*	Амин	азид-(оксиэтил) <sub>n</sub> -маленинимид, где n равно 1-10	Тиол
БЦОТ-(оксиэтил) <sub>n</sub> -NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин		
БЦОТ-(оксиэтил) <sub>n</sub> -пентафторфенил (ПФФ) эфир, где n равно 1-10	Амин		
6-(11,12-дидегидродибензо[b,f]азоцин-5(6H)-ил)-6-оксогексановая кислота N-гидроксисульфосукцинимид эфир	Амин		
ацетилен-(оксиэтил) <sub>n</sub> -маленинимид, где n равно 1-10	Тиол		
ДБЦО-маленинимид	Тиол		
ЦОТ-маленинимид	Тиол		
БЦОТ-маленинимид	Тиол		

\* может являться как NHS эфиром, так и сульфо-NHS эфиром.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты ХТЕН-ХТЕН и конъюгаты ХТЕН-



нагрузочное вещество конъюгированы при помощи клик-химии на основании тиол-енов, реакции которой протекают как свободнорадикальная реакция, называемая тиол-еновой реакцией, или как анионная реакция, называемая тиоловым присоединением по Михаэлю (см. фиг. 9) (Hoyle C.E. and Bowman C.N. Thiol-ene click chemistry. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1540-1573). В частности, считается, что тиоловое присоединение по Михаэлю больше подходит для конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество в случае, если нагрузочное вещество является белком (Pounder R.J. et al. Metal free thiol-maleimide 'Click' reaction as a mild functionalisation strategy for degradable polymers. (2008) *Chem Commun (Camb)*. 41, 5158-5160). Так как необходимо, чтобы по меньшей мере одна молекула содержала тиоловую группу, цистеин-сконструированный ХТЕН можно использовать в случае, если нагрузочное вещество не содержит цистеин. В альтернативном варианте тиоловую группу можно внести путем химической модификации N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы или  $\epsilon$ -аминогруппы лизина, принадлежащих ХТЕН или пептиду/белку нагрузочного вещества, при помощи тиолирующих реагентов, таких как 2-иминотиолан (реагент Траута), САТА (N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат), САТП (N-сукцинимидил S-ацетилтиопропионат), САТ-РЕО<sub>4</sub>-Ац (N-сукцинимидил S-ацетил(тиотетраэтиленгликоль)), СПДП (N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат). Подобные методы известны в данной области (Carlsson J. et al. (1978) *Biochem. J.* 173, 723-737; Wang D. et al. (1997) *Bioconjug. Chem.* 8, 878-884; Traut R.R. et al. (1973) *Biochemistry* 12(17), 3266-3273; Duncan, R.J.S. et al. (1983) *Anal. Biochem.* 132. 68-73; патент США № 5,708,146). Для второго компонента реакции тиолового присоединения по Михаэлю необходим реагент с электронодефицитной двойной связью углерод-углерод, такой, какая существует в (мет)акрилатах, малеинидах,  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонах, эфирах фумаровой кислоты, акрилонитриле, циннаматах и кротонатах. Обычно в качестве сульфгидрил-реакционноспособных функциональных элементов применяют N-малеинимиды, которые можно внести в белок нагрузочного вещества или молекулу ХТЕН путем модификации N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы или  $\epsilon$ -аминогруппы лизина, используя коммерчески доступные гетеробифункциональные кросс-линкеры, такие как АМАС (N-( $\alpha$ -малеинимидоацетокси)сукцинимид эфир), БМПС (N- $\beta$ -малеинимидопропилокси)сукцинимид эфир) и другие вышеописанные линкеры. Полученные в результате две молекулы, содержащие свободные тиоловые и малеинимидные компоненты соответственно, образуют стабильную ковалентную связь в нежестких условиях, что приводит к образованию ХТЕН-нагрузочное вещество, связанного малеинимидом.

В других вариантах реализации изобретения конъюгаты ХТЕН-ХТЕН и конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество создают, используя клик-химию, основанную на реакциях между гидразидами и альдегидами, такими как те, что описаны у Ganguly et al. и показаны на фиг. 10 (Ganguly T. et al. The hydrazide/hydrazone click reaction as a biomolecule labeling strategy for M(CO)<sub>3</sub> (M = Re, <sup>99m</sup>Tc) radiopharmaceuticals. (2011) *Chem. Commun.* 47, 12846-12848). Например, ХТЕН можно модифицировать так, чтобы он содержал гидразин или гидразид, который смешан с нагрузочным веществом, содержащим альдегидную группу, чтобы получить необходимый конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество. В одном варианте реализации в изобретении предложен ХТЕН по меньшей мере с одним гидразином или гидразидом, внесенным в  $\alpha$ -N-концевую аминогруппу или, в альтернативном варианте, с модифицированными одной или более  $\epsilon$ -аминогруппами лизина, для того, чтобы получить ХТЕН, подходящий в качестве реагента для конъюгации с целевым нагрузочным веществом, так как он считается стабильным. Полученные в результате бис-арилгидразоны, образуемые ароматическими гидразинами и ароматическими альдегидами, стабильны вплоть до 92°C в широком диапазоне величин pH от 2,0-10,0 (Solulink, Inc., Protein-Protein Conjugation Kit, Technical Manual, Catalog # S-9010-1). Замещаемой группой в реакции является вода, и для стабилизации связи не требуются восстанавливающие вещества (например, цианоборогидрид натрия). Молекулы, модифицированные гидразином/гидразидными или альдегидными компонентами, обладают высокой стабильностью в водных средах и остаются активными, не требуя специальной обработки. Аминогруппу(ы) молекулы ХТЕН модифицируют при помощи NHS-эфир/гидразида, такого как САНГ (сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразона), С6-САНГ (С6-сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразона), СГТГ (сукцинимидил 4-гидразидотерефталат гидрохлорида). В стандартной реакции белок готовят в виде 1-5 мг/мл раствора в модифицирующем буфере (100 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 7,4), модифицирующее вещество добавляют с 5-20-кратным молярным избытком, а реакцию проводят на протяжении 2 ч при комнатной температуре. Молекулу нагрузочного вещества отдельно модифицируют при помощи NHS-эфир/альдегида СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоата) или С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоата) в аналогичных условиях. Затем обе модифицированные молекулы обессоливают в конъюгационном буфере (100 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 6,0). Полученные в результате компоненты смешивают вместе, используя 1 мол.экв. ограничивающего белка и 1,5-2 мол.экв. белка, который можно использовать в большом количестве. Каталитический буфер из 100 мМ анилина в 100 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 6,0 добавляют для доведения конечной концентрации анилина до 10 мМ, а реакцию проводят на протяжении 2 ч при комнатной температуре. В другом варианте реализации изобретения конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество можно получить посредством реакции между альдегидом и первичной аминогруппой с последующим восстановлением основания Шиффа бо-

рогидридом или цианоборогидридом натрия. На первом этапе данного способа молекулу ХТЕН, такую как ХТЕН с первичной  $\alpha$ -аминогруппой или Lys-содержащий ХТЕН с  $\varepsilon$ -аминогруппой, модифицируют при помощи NHS-эфир/альдегида СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоата), С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоата) или СФФА (сукцинимидил 4-формилфеноксиацетата), используя стандартную химию амин-NHS в не содержащем аминов соединительном буфере, таком как 0,1М фосфата натрия, 0,15М NaCl, pH 7,2. Полученный в результате модифицированный альдегид-ХТЕН можно удерживать в этой точке в качестве композиции ХТЕН-кросс-линкер либо можно использовать в качестве реагента для создания конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество. Для получения ХТЕН-нагрузочное вещество модифицированный альдегид-ХТЕН смешивают с нагрузочным веществом с реакционноспособной аминогруппой и слабым восстанавливающим веществом, таким как 20-100 мМ цианоборогидрид натрия. Реакционную смесь инкубируют до 6 ч при комнатной температуре либо на протяжении ночи при 4°C. Затем непрореагировавшие альдегидные группы блокируют 50-500 мМ Трис HCl, pH 7,4 и 20-100 мМ цианоборогидрида натрия, делая возможным отделение конъюгированного очищенного ХТЕН-нагрузочное вещество.

В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащие пептидные или белковые нагрузочные вещества, при этом нагрузочное вещество присоединено посредством химического лигирования на основе реакционной способности С-концевого ацилазида пептида/белка нагрузочного вещества. Как пример, когда пептид либо белок получают, используя твердофазный пептидный синтез (ТФПС) со смолой гидроксиметилбензойной кислоты (ГМБК), конечный пептид можно отщепить от смолы при помощи большого количества нуклеофильных реагентов, чтобы обеспечить доступ к пептидам с различными С-концевыми функциональными элементами. В одном варианте реализации изобретения данный способ включает гидразинолизис пептидных/белковых смол для получения гидразидов пептидов или белков. Нитрозирование полученных в результате ацилгидразидов с нитритом натрия или трет-бутил нитритом в разведенной соляной кислоте приводит к образованию ацилазидов. Полученный в результате карбонилазид (или ацилазид) представляет собой активированную карбоксилатную группу (эфиры), которая может вступать в реакцию с первичным амином ХТЕН до образования стабильной амидной связи, что приводит к получению конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество. В альтернативных вариантах реализации изобретения первичный амин может представлять собой  $\alpha$ -амин N-конца ХТЕН либо один или более  $\varepsilon$ -аминов сконструированных остатков лизина в последовательности ХТЕН. В реакции конъюгации азид выполняет роль замещаемой группы, как показано на фиг. 11. Реакция конъюгации с аминными группами происходит посредством воздействия нуклеофила на электронодефицитную карбонильную группу (Meienhofer, J. (1979) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 1, Academic Press: N.Y.; ten Kortenaar P.B.W. et al. *Semisynthesis of horse heart cytochrome c analogues from two or three fragments*. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8279-8283).

В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-нагрузочное вещество, в которых конъюгацию проводят при помощи метода ортогонального лигирования белка, в котором начальный хемоселективный захват сопровождается внутримолекулярной перегруппировкой ацила, как показано на фиг. 12. Для хемоселективного захвата необходим нуклеофил или электрофил, расположенный непосредственно вблизи N-концевого амина, и другой совместимый электрофил или нуклеофил, расположенный непосредственно вблизи С-концевого эфира карбоновой кислоты. В одном варианте реализации изобретения отдельно предусматривается, что ХТЕН может служить как в качестве белка1, так и белка2 на фиг. 12. Таким образом, в альтернативных вариантах реализации изобретения ХТЕН может вступать в реакцию с соответствующими реагентами для получения тиоэфира на С-конце или вносить цистеин в N-конец для получения альтернативных композиций ХТЕН-кросс-линкер. При использовании вышеописанных конъюгатов ХТЕН-кросс-линкер для получения ХТЕН-нагрузочное вещество хемоселективный захват нуклеофильной и электрофильной пары, образующей эфир или тиоэфир, приводит N-концевую аминогруппу или С-концевой эфир соответствующих реагентов в такую непосредственную близость, которая обеспечивает возможность спонтанного внутримолекулярного перемещения ацила до образования амидной связи. Для большинства реакций ортогонального лигирования не требуется защита групп боковых цепей, и они проходят в жестких условиях, которые сходны с биологическими средами (Tam J.P., Xu J., Eom K.D. *Methods and strategies of peptide ligation*. (2001) *Biopolymers (Peptide Science)* 60, 194-205).

В другом варианте реализации изобретения конъюгаты можно создавать при помощи способа реакции, известной как нативное химическое лигирование (НХЛ), в котором участвует С-концевой тиоэфир в качестве электрофила и N-концевой цистеин в качестве нуклеофила. Результатом этой реакции является образование нативной амидной связи на участке лигирования конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество (Dawson P.E., Muir T.W., Clark-Lewis I., Kent S.B. *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. (1994) *Science* 266, 776-779; Tam J.P.; Lu Y.-A.; Liu C.F.; Shao, J. *Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods*. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 12485-12489; Johnson, E.C.B.; Kent, S.B.H. *J. Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction*. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6640-6646; Kent S.B. (2009) *Total chemical synthesis of proteins*. (2009) *Chem. Soc. Rev.* 38:338-351). Первой аминокислотой С-концевого компонента в реакции НХЛ (показан как белок2 на фиг.

12) является цистеин. Таким белком может являться XTEN, содержащий цистеин в первой позиции или любой другой белок, полученный посредством стандартного рекомбинантного белкового биосинтеза, включая пептидное/белковое нагрузочное вещество. N-концевой компонент (показан как нагрузочное вещество на фиг. 13) приготовлен как C-концевой тиоэфир при помощи химического синтеза. Примеры способов синтеза тиоэфиров известны и доступны в данной области, например такие, которые описаны в Li X., Kawakami T., Aimoto S., Direct preparation of peptide thioesters using an Fmoc solid-phase method. (1998) *Tetrahedron Lett.*, 39, 8660-8672; Ingenito R., Bianchi E., Fattori D., Pessi A. Solid-phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/tBu chemistry. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 11369-11374; Sewing A., Hilvert D. Fmoc-compatible solid-phase peptide synthesis of long C-terminal peptide thioesters. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 3395-3398; Brask J., Albericio F., Jensen K.J., Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters by masking as trithioorthoesters. (2003) *Org. Lett.*, 2003, 5, 2951-2953; Ollivier N., Behr J.-B., El-Mahdi O., Blanpain A., Melnyk O. Fmoc-solid-phase synthesis of peptide thioesters using an intramolecular N, S-acyl shift. (2005) *Org. Lett.*, 7, 2647-2650. Обычно предпочтительными являются  $\alpha$ -алкилтиоэфиры, так как они просты в получении и хранении. Однако из-за того что они довольно инертны, реакцию лигирования катализируют путем *in situ* транстиоэтерификации с тиоловыми добавками, при этом наиболее обычными тиоловыми катализаторами являются меркаптоэтансульфонат (МЭСНа) или 4-меркаптофенилуксусная кислота (МФУК). Химическая конъюгация обычно длится несколько часов и дает высокий выход. В то время как все 20 аминокислот природного происхождения подходят в качестве последнего остатка N-концевого компонента, наиболее высокие уровни лигирования наблюдали для глицина и гистидина, что делает XTEN исключительно подходящим для подобной реакции, так как примеры XTEN, приведенные в табл. 2, практически все являются полипептидами, содержащими глицин в N-конце (Hackeng T.M. et al. Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10068-10073). В других вариантах реализации данного конъюгационного способа реакции ортогонального лигирования включают: (1) C-концевую тиокислоту с N-концевым бромаланином или N-концевым азиридином (Tam J.P.; Lu Y.-A.; Liu C.F.; Shao, J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 12485-12489); (2) C-концевую тиокислоту с N-концевым цистеин-пертиоэфиром (Liu, C.F., Rao, C, Tam, J.P. (1996) *Tetrahedron Lett.*, 37, 933-936); (3) C-концевую тиокислоту с N-концевым гомоцистеином (Tam J.P., Yu Q. Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones. (1998) *Biopolymers* 46(5), 319-327); и (4) C-концевую тиокислоту и N-концевой гистидин (Zhang L., Tam J.P. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 3-6). В данном способе получение C-концевых тиоэфиров при помощи химического синтеза накладывает ограничение на размер N-концевого компонента в реакции НХЛ. Однако применение метода лигирования экспрессированного белка (ЛЭБ) преодолевает ограничения по размеру пептидного  $\alpha$ -тиоэфира, налагаемые особенностями химического синтеза (Muir T.W.; Sondhi D.; Cole P.A. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6705-6710; Muir T.W. Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72, 249-289). Метод ЛЭБ основан на белковом сплайсинге - процессе, в котором белок подвергается внутримолекулярной перегруппировке, которая приводит к вытеснению внутренней последовательности (интеина) и присоединению боковых последовательностей (экстеинов). Последний процесс включает образование эфирных или тиоэфирных промежуточных продуктов. В практической реализации изобретения коммерчески доступные белковые экспрессионные векторы *Escherichia coli* обеспечивают возможность получения представляющих интерес белков, таких как XTEN, экспрессируемых в рамке, сшитой с последовательностью интеин-хитин-связывающего домена (CBD). В данном способе гибридный белок подвергается N-S-сдвигу, когда боковая цепь первого остатка цистеина интеиновой части белка-предшественника нуклеофильно воздействует на пептидную связь остатка, находящегося непосредственно выше (которым, например, является последний остаток XTEN), для образования линейного тиоэфирного промежуточного продукта, как показано на фиг. 13. Этап химического лигирования стимулируют посредством инкубации белка с тиофенолом (или другим тиоловым катализатором, таким как МЭСНа или МФУК) и цистеинсодержащим синтетическим пептидом или белком. Это приводит к *in situ* образованию высокореактивного фенол- $\alpha$ -тиоэфир производного, например белка XTEN, который затем быстро лигируется с синтетическим пептидным/белковым нагрузочным веществом для того, чтобы дать в результате необходимый конъюгат XTEN-нагрузочное вещество. В другом варианте реализации изобретения XTEN-тиоэфирный промежуточный продукт может быть отщеплен при помощи 50 мМ 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (МЭСК) в 20 мМ Na-ГЭПЭС, pH 8,5, 50-1000 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТК (по усмотрению), а полученный в результате меченный МЭСК белок может быть очищен и храниться при -80°C в 5 мМ бис Трис, pH 6,5, 250 мМ NaCl до применения его как конъюгата XTEN-кросс-линкер для реакций НХЛ в качестве N-концевого компонента вышеописанной конъюгации. C-концевым компонентом может быть нагрузочное вещество с пептидом/белком как природного происхождения, так и синтетическим, с N-концевым цистеином.

В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество, в которых конъюгацию между XTEN и нагрузочным веществом проводят

при помощи бесследного лигирования по Штаудингеру, которое, как и нативное химическое лигирование (НХЛ), приводит к образованию нативной амидной связи в участке лигирования. Преимуществом данного метода является отсутствие необходимости в цистеине в месте лигирования (Saxon, E.; Armstrong, C.R.; Bertozzi, C.R. A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. (2000) *Org. Lett.* 2, 2141-2143; Nilsson, B.L.; Kiessling, L.L.; Raines, R.T. Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide. (2000) *Org. Lett.* 2, 1939-1941). Вместо этого, N-концевой белок1 получают как C-концевой тиоэфир, используя дифенилфосфинметантиол (см. фиг. 14), а C-концевой белок2 получают как N-концевой азид, который может быть образован в процессе реакции диазоперемещения (Cavender C.J.; Shiner V.J., Jr. (1972) *J. Org. Chem.* 22, 3567-3569; Lundquist J.T., IV, Pelletier J. C Improved solid-phase peptide synthesis method utilizing alpha-azide-protected amino acids. (2001) *Org. Lett.* 3, 781-783). Остаток фосфина вступает в реакцию с азидом белка2 до образования иминофосфорана после удаления азота (реакция Штаудингера). Полученный в результате иминофосфоран со своим высококонукофильным атомом азота также может считаться азилидом. Затем нуклеофильный атом азота азилида воздействует на карбонильную группу белка1, отщепляя тиоэфир. Нужно отдельно отметить, что как XTEN, так и нагружаемое вещество могут быть в этой реакции белком1 или белком2. Гидролиз перегруппированного продукта XTEN-нагружаемое вещество дает в конце нативный амид и выделяет фосфиновый компонент в виде оксида фосфина(V). бис(п-диметиламиноэтилфенил)фосфинометантиол - водорастворимый вариант дифенилфосфинметантиола - опосредует быстрое лигирование эквимольных субстратов в воде (Tam, A.; Soellner, M.B.; Raines, R.T. Water-soluble phosphinothiols for traceless Staudinger ligation and integration with Expressed Protein Ligation. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1142111-430). В другом варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагружаемое вещество, полученные при помощи ферментативного лигирования. Трансглутаминазы представляют собой ферменты, которые катализируют образование изопептидной связи между  $\gamma$ -карбоксамидной группой глутамина нагружаемого пептида или белка и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина в лизин-сконструированном XTEN, тем самым создавая между- и внутримолекулярные перекрестные связи между XTEN и нагружаемым веществом (см. фиг. 15), что приводит к образованию композиции (Lorand L., Conrad S.M. Transglutaminases. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* 58(1-2), 9-35). Неограничивающими примерами ферментов, которые успешно применялись для лигирования, являются фактор XIIIa (Schense J.C., Hubbell J.A. Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa. (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(1):75-81) и тканевая трансглутаминаза (Collier J.H., Messersmith P.B. Enzymatic modification of self-assembled peptide structures with tissue transglutaminase. (2003) *Bioconjug. Chem.* 14(4), 748-755; Davis N.E., Karfeld-Sulzer L.S., Ding S., Barron A.E. Synthesis and characterization of a new class of cationic protein polymers for multivalent display and biomaterial applications. (2009) *Biomacromolecules* 10 (5), 1125-1134). Известно, что последовательность глутаминового субстрата GQQQL обладает высокой специфичностью к тканевой трансглутаминазе (Hu B.H., Messersmith P.B. Rational design of transglutaminase substrate peptides for rapid enzymatic formation of hydrogels. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125(47), 14298-14299). Специфичность последовательности тканевой трансглутаминазы оказалась менее жесткой для ацил-акцептора (лизина), чем для ацил-донора (глутамина) (Greenberg C.S., Birckbichler P.J., Rice R.H. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. (1991) *FASEB J.* 1991, 5, 3071-3077).

В альтернативном варианте реализации ферментативно-созданной композиции XTEN-нагружаемое вещество используется фермент сортаза А транспептидаза из *Staphylococcus aureus* для катализования расщепления короткой 5-аминокислотной последовательности распознавания LPXTG между остатками треонина и глицина белка1 и последующего переноса ацил-фрагмента к N-концевому нуклеофилу олигоглицина белка1 (см. фиг. 16). Функционализируя белок2 так, чтобы он содержал олигоглицин, возможно ферментативно конъюгировать два белка сайт-специфическим способом для получения необходимой композиции XTEN-нагружаемое вещество. (Поли)пептид, несущий распознающий сортазу сайт (LPXTG), можно легко изготовить, используя стандартные протоколы молекулярного биологического клонирования. Глутаминовую кислоту удобно вносить в X-позицию сайта распознавания, так как этот остаток обычно обнаруживается в природных субстратах для сортазы А (Voekhorst J., de Been M.W., Kleerebezem M., Siezen R.J. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 4928-4934). Высокого уровня трансацилирования можно достичь путем размещения сайта расщепления сортазой в C-конце субстрата (Popp M.W., Antos J.M., Grotenbreg G.M., Spooner E., Ploegh H.L. Sortagging: A versatile method for protein labeling. (2007) *Nat. Chem. Biol.* 311,707-708) и в гибких петлях (Popp M.W., Artavanis-Tsakonas K., Ploegh H.L. Substrate filtering by the active-site crossover loop in UCHL3 revealed by sortagging and gain-of-function mutations. (2009) *J. Biol. Chem.* 284(6), 3593-3602). Для белков, меченных в C-конце, важно, чтобы глицин в минимальном маркере LPETG не был размещен в C-конце; он должен находиться в пептидной связи по меньшей мере с одной дополнительной C-концевой аминокислотой. Вдобавок, лучшее связывание достигается путем добавления избыточного глицина в C-конец сайта расщепления для получения LPETGG (Pritz S., Wolf Y., Kraetke O., Klose J., Bienert M., Beyermann M. Synthesis of biologically active peptide nucleic acid-peptide conjugates by sortase-mediated ligation. (2007) *J. Org. Chem.* 72, 3909-3912; Tanaka T., Yamamoto T., Tsukiji

S., Nagamune T. Site-specific protein modification on living cells catalyzed by sortase. (2008) *Chembiochem* 95, 802-807). Нуклеофилы, совместимые с опосредованной сортазой транспептидацией, имеют единственное структурное требование к удлинению остатков глицина со свободным аминоконцом. Успешной транспептидации можно достичь при помощи нуклеофилов, содержащих в любом месте от одного до пяти глицинов; при этом в предпочтительном варианте реализации изобретения максимальную скорость реакции получали в присутствии двух или трех глицинов.

Хотя различные варианты реализации конъюгационной химии были описаны в контексте белок-белковой конъюгации, стоит отдельно отметить, что в практической реализации изобретения нагрузочный компонент конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество может являться низкомолекулярным лекарственным веществом в тех конъюгационных способах, которые применимы к функциональным группам, таким как амины, сульфгидрилы, карбоксилы, которые присутствуют в целевых низкомолекулярных лекарственных веществах. Специалисту в данной области будет понятно, что здесь можно применять более широкий диапазон химических методов по сравнению с белками и пептидами, чьи функциональные элементы обычно ограничены амино-, сульфгидрильными и карбоксильными группами. Лекарственные нагрузочные вещества можно конъюгировать к ХТЕН посредством функциональных групп, включая, но не ограничиваясь этим, первичные аминогруппы, аминокси, гидразид, гидроксил, тиол, тиолат, сукцинат (СУК), сукцинимидил сукцинат (СС), сукцинимидил пропионат (СПА), сукцинимидил бутаноат (СБА), сукцинимидил карбоксиметилат (СКМ), бензотриазол карбонат (БТК), N-гидроксисукцинимид (NHS), п-нитрофенилкарбонат (НФК). Другие подходящие реакционноспособные функциональные группы нагрузочных лекарственных молекул включают ацеталь, альдегиды (например, ацетальдегид, пропиональдегид и бутиральдегид), альдегид гидрат, алкенил, акрилат, метакрилат, акриламид, активный сульфон, кислотный галид, изоцианат, изотиоцианат, маленимид, винилсульфон, дитиопиридин, винилпиридин, йодоацетамид, эпоксид, глиоксаль, дион, мезилат, тозилат и трезилат.

В другом варианте реализации изобретения нагрузочные лекарственные вещества можно также конъюгировать с конъюгатами ХТЕН-кросс-линкер, используя гетероциклическую кольцевую систему, в которой один или более из атомов кольца является гетероатомом, например атомом азота, кислорода, фосфора или серы. Гетероциклическая группа содержит по меньшей мере от одного и вплоть до 20 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. В одном из вариантов реализации изобретения гетероцикл может являться моноциклом, содержащим от 3 до 7 элементов кольца (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), или бициклом, содержащим от 7 до 10 элементов кольца (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] систему. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A. "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry", W.A. Benjamin, New York, (1968); "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности, в тт. 13, 14, 16, 19 и 28. Неограничивающие примеры гетероциклов, которые можно обнаружить в лекарственных веществах, подходящих для конъюгации, включают пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, пиразолил, тетрагидропиридил, серноокислый тетрагидропиридил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталинил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азоцинил, триазилил, 6Н-1,2,5-тиадиазилил, 2Н,6Н-1,5,2-дитадиазилил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксантинил, 2Н-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3Н-индолил, 1Н-индазолил, пиринил, 4Н-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4Аh-карбазолил, карбазолил, β-карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперазинил, индолинил, изоиндолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолинил и изатиноил.

В некоторых вариантах реализации конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество с лекарственным веществом в качестве нагрузочного молекулы лекарственного вещества присоединены к лизин- или цистеин-сконструированному ХТЕН (такому как последовательности из табл. 3) посредством кросс-линкеров, содержащих два реакционноспособных участка для связывания с лекарственным веществом и ХТЕН. Предпочтительными перекрестно-сшивающими группами являются те, которые относительно стабильны к гидролизу во время циркуляции, биоразлагаемы и нетоксичны во время отщепления от конъюгата. Вдобавок, использование кросс-линкеров может обеспечить возможность создания конъюгатов, обладающих большей вариативностью между лекарственным веществом и ХТЕН, либо обеспечить достаточное пространство между лекарственным веществом и ХТЕН так, что ХТЕН не будет препятствовать связыванию между фармакофором и участком связывания. В одном варианте реализации изобретения кросс-линкер содержит реакционноспособный участок, который содержит электрофильную группу, которая является реакционноспособной по отношению к нуклеофильной группе, присутствующей в составе ХТЕН. Предпочтительные нуклеофилы включают тиол, тиолат и первичный амин. Гетероатом нук-

леофильной группы лизин- или цистеин-сконструированного ХТЕН является реакционноспособным по отношению к электрофильной группе в составе кросс-линкера и образует ковалентную связь с единицей кросс-линкера, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-кросс-линкер. Подходящие электрофильные группы для кросс-линкеров включают, но не ограничиваются этим, малеинимидные и галоацетамидные группы и обеспечивают наличие участка, подходящего для присоединения к ХТЕН. В другом варианте реализации изобретения кросс-линкер содержит реакционноспособный участок, который содержит нуклеофильную группу, которая является реакционноспособной по отношению к электрофильной группе, присутствующей в составе лекарственного вещества, так, что конъюгация может произойти между ХТЕН-кросс-линкером и нагрузочным лекарственным веществом, что приводит к образованию конъюгата ХТЕН-лекарственное вещество. Подходящие электрофильные группы для лекарственного вещества включают, но не ограничиваются этим, гидроксильные, тиоловые, альдегидные, алкеновые, алкановые, азидные группы и карбонильные группы кетонов. Гетероатом нуклеофильной группы кросс-линкера может реагировать с электрофильной группой в составе лекарственного вещества и образовывать ковалентную связь. Подходящие нуклеофильные группы в составе кросс-линкера включают, но не ограничиваются этим, гидразид, оксим, амино, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразид. Электрофильная группа в составе лекарственного вещества обеспечивают наличие участка, подходящего для присоединения к кросс-линкеру.

В конкретном варианте реализации изобретения для конъюгации лекарственных веществ к  $\epsilon$ -аминогруппе лизина лизин-сконструированных ХТЕН, являющихся предметом изобретения, используется реакционноспособное соединение лекарственное вещество-N-гидроксилсукцинимид или эфиры, такие как лекарственное вещество-сукцинимидил пропионат, или лекарственное вещество-сукцинимидил бутаноат, или другие конъюгаты лекарственное вещество-сукцинимид. В альтернативном варианте остатки лизина лизин-сконструированных ХТЕН, являющихся предметом изобретения, можно использовать для внесения свободных сульфгидрильных групп при помощи реакции с 2-иминотиолоаном. В альтернативном варианте нацеленные на вещество лизина лизин-сконструированных ХТЕН, являющихся предметом изобретения, могут быть связаны с гетеробифункциональным реагентом, содержащим свободную гидразидную или альдегидную группу, доступную для конъюгации с активным лекарственным веществом. Реакционноспособные эфиры могут конъюгироваться при физиологическом уровне рН, но для менее активных производных обычно требуются более высокие значения рН. При применении лабильного белка можно также использовать низкие температуры. В условиях низкой температуры для реакции конъюгации может понадобиться более длительное реакционное время. В другом конкретном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество с конъюгацией аминогруппы с остатками лизина лизин-сконструированных ХТЕН, являющихся предметом изобретения, при этом конъюгация стимулируется разницей между величинами рКа  $\alpha$ -аминогруппы N-концевой аминокислоты (приблизительно от 7,6 до 8,0) и рКа  $\epsilon$ -аминогруппы лизина (приблизительно 10). Для конъюгации концевой аминогруппы часто используют реакционноспособные соединения лекарственное вещество-альдегид (такие как лекарственное вещество-пропиональдегид или лекарственное вещество-бутилальдегид), которые являются более избирательными в отношении аминов и, таким образом, существует меньшая вероятность, что они будут реагировать, например, с имидазольной группой гистидина. Вдобавок, аминоостатки вступают в реакцию с ангидридами янтарной или другой карбоновой кислоты, или с N,N'-дисукцинимидил карбонатом (ДСК), N,N'-карбонил диимидазолом (КДИ), или п-нитрофенил хлороформатом для получения активированного сукцинимидилкарбоната, имидазолкарбамата или п-нитрофенилкарбоната соответственно. Дериватизация этими веществами приводит к эффекту изменения заряда остатков лизина. Конъюгацию соединения лекарственное вещество-альдегид к концевой аминогруппе ХТЕН, являющегося предметом изобретения, обычно проводят в подходящем буфере при уровне рН, который дает возможность получить преимущество из разницы в рКа между  $\epsilon$ -аминогруппами остатков лизина и  $\alpha$ -аминогруппой N-концевого остатка белка. В способе данного варианта реализации изобретения в реакции сопряжения используют рН в диапазоне от около рН 7 до около 8. Способы, подходящие для конъюгации  $\epsilon$ -аминогруппы лизина были описаны в патенте США № 4904584 и в патенте США № 6048720.

Специалист в данной области примет во внимание то, что активационный способ и/или конъюгационная химическая реакция для применения в создании конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество зависит от реакционноспособных групп полипептида ХТЕН, а также от функциональных групп лекарственного компонента (например, amino, гидроксильных, карбоксильных, альдегидных, сульфгидрильных, алкеновых, алкановых, азидных и т.д.), функциональной группы реактанта лекарственное вещество-кросс-линкер или функциональной группы реактанта ХТЕН-кросс-линкер. Конъюгация лекарственного вещества может происходить в направлении конъюгации ко всем доступным присоединенным группам сконструированного полипептида ХТЕН, таким как специально сконструированные присоединенные группы инкорпорированных остатков цистеина или остатков лизина. Для того чтобы контролировать реактанты таким образом, чтобы конъюгация происходила в направлении подходящего реакционноспособного участка, в изобретении предусматривается использование защитных групп во время реакции конъюгации.

"Защитная группа" представляет собой компонент, который предотвращает или блокирует реакцию конкретной химически реакционноспособной функциональной группы в молекуле при определенных условиях. Защитная группа будет варьироваться в зависимости от типа химически реакционноспособной группы, которую нужно защитить, а также от наличия дополнительных реакционноспособных групп в молекуле. Неограничивающие примеры функциональных групп, которые могут быть защищены, включают группы карбоновой кислоты, гидроксильные группы, аминогруппы, тиоловые группы и карбонильные группы. Типичные защитные группы для карбоновых кислот и гидроксидов включают эфиры (такие как *p*-метоксибензилэфир), амиды и гидразиды; для аминогрупп это карбаматы (такие как трет-бутоксикарбонил) и амиды; для карбонильных групп это ацетали и кетали и т.п. Такие защитные группы хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в T.W. Greene and G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis, Third Edition, Wiley, New York, 1999*, и перечисленных в работе ссылок. Конъюгацию можно провести в один этап или постадийным способом (например, как описано в WO 99/55377), например, посредством добавления промежуточного реакционного кросс-линкера, используя описанные в данном тексте кросс-линкеры или те, которые, как известно в данной области, подходят для конъюгации с остатками цистеина или лизина полипептидов, которые необходимо присоединить к реакционноспособным функциональным группам лекарственных молекул. В некоторых вариантах реализации изобретения способ конъюгации кросс-линкера с цистеин-сконструированным ХТЕН может предполагать, что ХТЕН был предварительно обработан восстанавливающим веществом, таким как дитиотреитол (ДТТ), для того, чтобы восстановить любые дисульфидные остатки цистеина до образования высококонулеофильных тиоловых групп цистеина ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ ). Восстанавливающее вещество удаляют впоследствии при помощи любого стандартного метода, такого как обессоливание. Восстановленный ХТЕН реагирует, таким образом, с соединениями лекарственного вещества-линкер или перекрестно-сшивающими реагентами с электрофильными функциональными группами, такими как малеинимид или  $\alpha$ -галокарбонил, в соответствии, например, с конъюгационным методом по Klussman et al. (2004) *Bioconjugate Chemistry* 15(4), 765-773. Конъюгацию кросс-линкера или лекарственного вещества с остатком цистеина обычно проводят в подходящем буфере с уровнем pH 6-9 при температурах, составляющих от 4 до 25°C на протяжении периодов времени до около 16 ч. В альтернативном варианте остатки цистеина могут быть дериватизированы. Подходящие дериватизационные вещества и способы хорошо известны в данной области. Например, остатки цистеина наиболее часто вступают в реакцию с  $\alpha$ -галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как йодоуксусная кислота или йодоацетамид, до образования карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Остатки цистеина также дериватизируют при помощи реакции с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бромо- $\beta$ -(4-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, *N*-алкилмалеинимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил 2-пиридилдисульфидом, *p*-хлорортутьбензоатом, 2-хлорортуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-пиразолом.

В некоторых случаях конъюгацию проводят в условиях, которые требуют, чтобы как можно больше доступных присоединенных групп ХТЕН прореагировало с молекулами лекарственного вещества или молекулами лекарственного вещества-линкер. Этого достигают посредством подходящего молярного избытка лекарственного вещества по отношению к полипептиду. Типичные молярные соотношения между молекулами активированного лекарственного вещества или молекулами лекарственного вещества-линкер и полипептидом составляют вплоть до приблизительно 1000-1, например вплоть до приблизительно 200-1 или вплоть до приблизительно 100-1. В некоторых случаях соотношение может быть несколько ниже, например вплоть до 50-1, 10-1 или 5-1. Также можно использовать эквимольные соотношения. В вариантах реализации конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, являющиеся объектами изобретения, сохраняют по меньшей мере часть фармакологической активности по сравнению с соответствующим нагрузочным веществом, неприсоединенным к ХТЕН. В одном варианте реализации изобретения ХТЕН-нагрузочное вещество сохраняет по меньшей мере около 1%, или по меньшей мере около 5%, или по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% фармакологической активности нагрузочного вещества, неприсоединенного к ХТЕН. В одном варианте реализации конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество можно сконструировать так, чтобы при попадании в организм происходило высвобождение нагрузочного вещества посредством неспецифического или ферментативного гидролиза линкера, включая восстановление дисульфидной связи, pH-зависимое высвобождение, либо при помощи экзогенных или эндогенных протеаз, включая протеазы из табл. 9. Макромолекулы могут поглощаться клеткой вследствие рецептор-опосредованного эндоцитоза, адсорбционного эндоцитоза или пиноцитоза (Jain R.K. *Transport of molecules across tumor vasculature. (1987) Cancer Metastasis Rev. 6(4), 559-593*; Jain R.K. *Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. (1999) Ann. Rev. Biomed. Eng. 1, 241-263*; Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.R. *Endocytosis. (1997) Physiol. Rev. 77(3), 759-803*). После клеточного поглощения конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество нагрузочное вещество может высвобождаться вследствие низких величин pH в эндосомах (pH 5,0-6,5) и лизосомы (pH 4,5-5,0), а также при помощи липосомных ферментов (например, эстераз и про-

теаз). Примером кислотно-чувствительного кросс-линкера является 6-малеинимидокапроил гидразон, который может сочетаться с тиолсодержащими носителями. Гидразонные линкеры быстро отщепляются при величинах pH <5, обеспечивая возможность высвобождения нагрузочного вещества в кислой pH-среде эндосом и липосом с последующей интернализацией конъюгата (Trail P.A. et al. Effect of linker variation on the stability, potency, and efficacy of carcinoma-reactive BR64-doxorubicin immunoconjugates. (1997) *Cancer Res.* 57(1), 100-105; Kratz F. et al. Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin. (2007) *Hum. Exp. Toxicol.* 26(1), 19-35). Клинически одобренный конъюгат mAb-лекарственное вещество гемтузумаб озогамин (Милотарг™) представляет собой конъюгат лекарственное вещество-антитело, содержащий гуманизованное mAb P67.6 против CD33, химически связанное с цитотоксическим антибиотическим веществом калихеамицином. Линкер между антителом и лекарственным веществом содержит две лабильные связи: гидразона и стерически затрудненную дисульфидную связь. Было показано, что кислотно-чувствительная связь гидразона является фактическим сайтом расщепления (Jaracz S., Chen J., Kuznetsova L.V., Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. (2005) *Bioorg. Med. Chem.* 13(17), 5043-5054). Для тех конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, в которых нагрузочное вещество присоединено посредством дисульфидной связи, нагрузочное вещество может отделяться от XTEN при помощи восстановления дисульфидной связи в составе лабильного линкера. Например, huN901-DM1 представляет собой активирующееся при наличии опухоли иммунотерапевтическое пролекарственное вещество, разработанное ImmunoGen, Inc. для лечения мелкоклеточного рака легких. Пролекарственное вещество состоит из гуманизованного анти-CD56 mAb (huN901), конъюгированного с микротрубочным ингибитором майтанзиноидом DM1. В среднем 3,5-3,9 молекул DM1 связываются с каждым антителом при помощи затрудненных дисульфидных связей. Хотя в крови дисульфидная связь является стабильной, она быстро расщепляется при попадании в клетку, являющуюся мишенью для huM901, высвобождая, таким образом, активный DM1 (Smith S.V. Technology evaluation: huN901-DM1, ImmunoGen. (2005) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7(4), 394-401). Также DM1 соединяли с MLN-591 от Millennium Pharmaceuticals - специфическим мембранным антигеном простаты mAb. DM1 присоединен к антителу посредством затрудненной дисульфидной связи, которая обеспечивает сывороточную стабильность и в то же время делает возможным внутриклеточное высвобождение лекарственного вещества при интернализации (Henry M.D. et al. A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer. (2004) *Cancer Res.* 64(21), 7995-8001). Высвобождения нагрузочного вещества из XTEN-носителя можно достичь путем создания композиций с содержанием коротких отщепляемых пептидов в качестве линкеров между нагрузочным веществом и XTEN. Примером клинически определенного конъюгата является конъюгат доксорубин-ГПМА (N-(2-гидроксипропил)метакриламид), в котором доксорубин присоединен через свой аминокислотный остаток к кополимеру ГПМА посредством тетрапептидного спейсера GlyPheLeuGly, который отщепляется лизосомными протеазами, такими как катепсин В (Vasey P.A. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5(1), 83-94). Другими примерами конъюгатов носитель-лекарственное вещество, содержащими пептидные линкеры и достигшими клинической стадии разработки, являются макромолекулярные комплексы платины. Два кандидатных лекарственных вещества на основе ГПМА состоят из кополимерного остов ГПМА, к которому присоединены два комплексообразующих комплекса аминокислот платины посредством отщепляемого катепсином В пептидного спейсера GlyPheLeuGly или трипептидного спейсера GlyGlyGly (Rademaker-Lakhai J.M. et al. A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10(10), 3386-3395; Sood P. et al. Synthesis and characterization of AP5346, a novel polymer-linked diamino-cyclohexyl platinum chemotherapeutic agent. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17(5), 1270-1279). Был разработан высокоселективный метод, нацеленный на рак простаты, включающий применение протеазы специфического антигена простаты (САП), которая экспрессируется фактически только в тканях простаты и карциномах простаты. Было синтезировано новое альбуминсвязывающее пролекарственное вещество паклитаксел, ЭМК-ArgSerSerTyrTyrSerLeu-ПАБК-паклитаксел (ЭМК: ε-малеинимидокапроил; ПАБК: п-аминобензилоксикарбонил). Это пролекарственное вещество растворялось в воде и связывалось с эндогенным и экзогенным альбумином. Альбуминсвязанная форма пролекарственного вещества отщеплялась САП, высвобождая дипептид паклитаксела Ser-Leu-ПАБК-паклитаксел. Благодаря включению самоустраняющегося линкера ПАБК данный дипептид быстро разлагался, высвобождая в качестве конечного продукта расщепления паклитаксел (Elsadek B. et al. Development of a novel prodrug of paclitaxel that is cleaved by prostate-specific antigen: an in vitro and in vivo evaluation study. (2010) *Eur. J. Cancer* 46(18), 3434-3444).

Значительный интерес вызывают самоуничтожающиеся спейсеры благодаря своему применению в системах доставки пролекарственных веществ. В нескольких работах были описаны самоустраняющиеся системы или дендримерные структуры, которые могут высвобождать все свои структурные единицы



путем доминоподобной фрагментации цепи, инициируемой единичным актом расщепления (Haba K. et al. Single-triggered trimeric prodrugs. (2005) *Angew. Chem., Int. Ed.* 44, 716-720; Shabat D. Self-immolative dendrimers as novel drug delivery platforms. (2006) *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 44, 1569-1578; Warnecke A., Kratz F. 2,4-Bis(hydroxymethyl)aniline as a building block for oligomers with self-eliminating and multiple release properties. (2008) *J. Org. Chem.* 73, 1546-1552; Sagi A. et al. Self-immolative polymers. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130, 5434-5435). В одной работе было разработано и синтезировано самоуничтожающееся дендритное пролекарственное вещество, несущее четыре молекулы противоракового вещества камптотецина и две молекулы ПЭГ5000. Пролекарственное вещество эффективно активировалось пенициллин-G-амидазой в физиологических условиях, а свободный камптотетин высвобождался в реакционную среду для подавления клеточного роста (Gopin A. et al. Enzymatic activation of second-generation dendritic prodrugs: conjugation of self-immolative dendrimers with poly(ethylene glycol) via click chemistry. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17, 1432-1440). Внесение специфического ферментативного субстрата, расщепляемого протеазой, которая сверхэкспрессируется в опухолевых клетках, может привести к созданию высокоэффективных активационных систем для специфического к раковым клеткам дендритного пролекарственного вещества. Неограничивающие примеры спейсерных последовательностей, которые расщепляются протеазами, перечислены в табл. 9.

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены конфигурации ХТЕН-нагрузочное вещество, включающие димерные, тримерные, тетрамерные и конъюгаты более высоких порядков, в которых нагрузочное вещество присоединено к ХТЕН посредством лабильного линкера, как описано выше в данном тексте. В одном варианте реализации вышеупомянутых конъюгатов композиция дополнительно содержит нацеленный компонент для доставки композиции, или лиганда, или рецептора к клетке-мишени. В другом варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых одна, две, три или четыре композиции ХТЕН-нагрузочное вещество конъюгированы посредством лабильных линкеров к антителам или фрагментам антител, что обеспечивает наличие растворимых композиций для применений в нацеленной терапии клинических признаков, таких как, без ограничений, различного вида лечение опухолей и других раков, при этом антитело обеспечивает наличие нацеленного компонента, а затем, когда происходит интернализация клеткой-мишенью, лабильный линкер обеспечивает возможность диссоциации ХТЕН-нагрузочное вещество из композиции и способствует необходимой активности (например, цитотоксичности в опухолевой клетке). Следовательно, представленные в изобретении композиции являются иммуноконъюгатами.

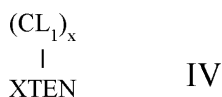
Неструктурные характеристики и одинаковый состав и заряд ХТЕН приводят к наличию свойств, которые можно использовать для очистки конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество после реакции конъюгации. Исключительно целесообразным является применение к конъюгатам ХТЕН ионного обмена, который дает возможность удалить непрореагировавшие нагрузочные вещества и производные нагрузочных веществ. Исключительно целесообразным является применение к конъюгатам хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ХГВ). Благодаря своей гидрофильной природе большинство полипептидов ХТЕН проявляют низкое связывание со смолами ХГВ, что стимулирует захват конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество вследствие гидрофобных взаимодействий между нагрузочным веществом и материалом колонки, и их отделение от неконоъюгированных ХТЕН, которым не удалось соединиться с нагрузочным веществом во время процесса конъюгации. Высокая степень очистки ХТЕН и конъюгатов ХТЕН-нагрузочное вещество обеспечивает значительное преимущество по сравнению с большинством химических или природных полимеров, в частности пэгилированными нагрузочными веществами. Большинство химических и природных полимеров получают при помощи случайной или полуслучайной полимеризации, которая приводит к образованию большого количества гомологов. Такие полимеры можно фракционировать различными способами для того, чтобы увеличить часть целевого вещества в продукте. Однако даже после обогащения большинство препаратов природных полимеров и их конъюгатов с нагрузочными веществами содержат менее чем 10% целевого вещества. Примеры ПЭГ-конъюгатов с Г-КСФ были описаны в [Bagal, D., et al. (2008) *Anal Chem.* 80: 2408-18]. Эта публикация показывает, что даже ПЭГ-конъюгат, который был одобрен для терапевтического применения, содержит более 100 гомологов, которые присутствуют в концентрации, составляющей по меньшей мере 10% от целевого вещества. Вариабельность случайных полимеров, таких как ПЭГ, является существенным препятствием для осуществления мониторинга и контроля качества во время конъюгации и очистки. В противоположность этому ХТЕН, очищенный при помощи описанных в данном тексте способов, обладает высоким уровнем очистки и однородности. Вдобавок, конъюгаты, полученные так, как это описано в данном тексте, обычно содержат более чем около 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% необходимого целевого вещества в необходимой конфигурации, результатом чего является легкость интерпретации масс-спектров и хроматограмм.

2. Мономерные конфигурации ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-нагрузочное вещество.

В другом аспекте в изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-нагрузочное вещество с одним ХТЕН, при этом конъюгат разработан в разных конфигурациях. Примеры конфигураций таких конъюгатов приведены далее.

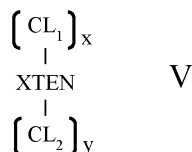
В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией со-

гласно формуле IV



где независимо в случае каждого появления  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV,  $CL_1$  является кросс-линкером, выбранным из табл. 13. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV,  $x$  принадлежит вышеприведенным диапазонам, а кросс-линкер из табл. 13 связан с каждым атомом серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV,  $x$  принадлежит вышеприведенным диапазонам, а кросс-линкер связан с каждой  $\epsilon$ -аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV,  $x$  равен 1, а кросс-линкер из табл. 13 связан с N-концевой аминогруппой XTEN. Для специалиста в данной области очевидно, что композиции вышеприведенных вариантов реализации, содержащие кросс-линкер, присоединенный к XTEN при помощи определенных компонентов, представляют собой продукт реакции отдельных реактантов и, таким образом, отличаются от точного состава реактантов. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле IV, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле V

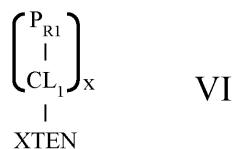


где независимо в случае каждого появления  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1;  $CL_2$  является кросс-линкером, отличным от  $CL_1$ ;  $y$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что  $x + y$  является  $\geq 2$ ; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле V, каждый из  $CL_1$  и  $CL_2$  выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в табл. 13. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле V,  $x$  принадлежит вышеприведенным диапазонам, и каждый  $CL_1$  связан с  $\epsilon$ -аминогруппой каждого лизина XTEN, а  $y$  принадлежит вышеприведенным диапазонам, и каждый  $CL_2$  связан с группой серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле V,  $x$  равен 1, и  $CL_1$  связан с N-концевой аминогруппой XTEN, а каждый  $CL_2$  связан с группой серы цистеина XTEN. Для специалиста в данной области очевидно, что композиции вышеприведенных вариантов реализации, содержащие кросс-линкер, присоединенный к XTEN при помощи определенных компонентов, представляют собой продукт реакции отдельных реактантов и, таким образом, отличаются от точного состава реактантов. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле V, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

В другом аспекте в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, имеющие определенные конфигурации. В изобретении используется преимущество описанных в данном тексте композиций реакционноспособных участников конъюгации XTEN-кросс-линкер, к которым при помощи

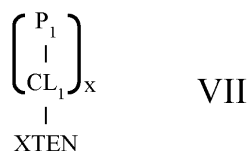
химической реакции можно присоединить реакционноспособные молекулы нагрузочного вещества.

В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле VI



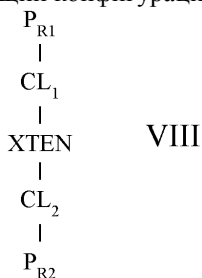
где независимо в случае каждого появления  $P_{R1}$  является одноатомным остатком нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 3, или равен 2, или равен 1; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, одноатомный остаток нагрузочного вещества принадлежит нагрузочному веществу, выбранному из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI,  $CL_1$  является кросс-линкером, выбранным из табл. 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, каждый кросс-линкер связан с атомом серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, каждый кросс-линкер связан с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI,  $x$  равен 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI,  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле VI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле VII

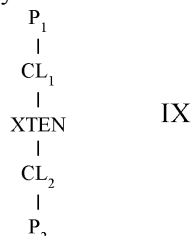


где независимо в случае каждого появления  $P_1$  является нагрузочным веществом, выбранным из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21;  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII,  $CL_1$  является кросс-линкером, выбранным из табл. 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, каждый кросс-линкер связан с атомом серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, каждый кросс-линкер связан с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII,  $x$  равен 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В одном варианте реализации конъюгат, соответствующий формуле VII, выбран из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в табл. 21. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII,  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. Для специалиста в данной области очевидно, что композиции вышеприведенных вариантов реализации, содержащие нагрузочное вещество, присоединенное к XTEN-кросс-линкеру при помощи определенных компонентов, представляют собой продукт реакции отдельных реактантов и, таким образом, отличаются от точного состава реактантов. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле VII, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере

около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул ХТЕН данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле VIII



где независимо в случае каждого появления  $P_{R1}$  является одноатомным остатком нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $P_{R2}$  является одноатомным остатком нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1;  $CL_2$  является кросс-линкером, отличным от  $CL_1$ ;  $y$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что  $x + y$  является  $\geq 2$ ; а ХТЕН представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, одноатомный остаток нагрузочного вещества принадлежит нагрузочному веществу, выбранному из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, каждый из  $CL_1$  и  $CL_2$  выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в табл. 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, каждый  $CL_1$  связан с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина ХТЕН, а каждый  $CL_2$  связан с группой серы цистеина ХТЕН. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII,  $x$  равен 1, и  $CL_1$  связан с N-концевой аминогруппой ХТЕН, а  $CL_2$  связан с группой серы цистеина или  $\epsilon$ -аминогруппой лизина ХТЕН. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII,  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII,  $CL_2$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле VIII, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул ХТЕН данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле IX



где независимо в случае каждого появления  $P_1$  является нагрузочным веществом, выбранным из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21;  $P_2$  является нагрузочным веществом, выбранным из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, и отличным от  $P_1$ ;  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1;  $CL_2$  является кросс-линкером, отличным от  $CL_1$ ;  $y$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что  $x + y$  является  $\geq 2$ ; а ХТЕН представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере

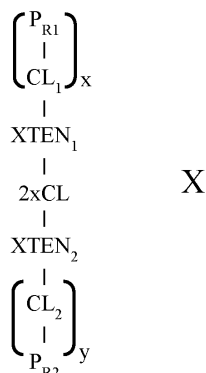
мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, одноатомный остаток нагрузочного вещества принадлежит нагрузочному веществу, выбранному из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, каждый из  $CL_1$  и  $CL_2$  выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в табл. 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, каждый  $CL_1$  связан с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина ХТЕН, а каждый  $CL_2$  связан с группой серы цистеина ХТЕН. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX,  $x$  равен 1, и  $CL_1$  связан с N-концевой аминогруппой ХТЕН, а  $CL_2$  связан с группой серы цистеина или  $\epsilon$ -аминогруппой лизина ХТЕН. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX,  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX,  $CL_2$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В одном варианте реализации конъюгат, соответствующий формуле IX, выбран из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в табл. 21. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле IX, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул ХТЕН данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

3. Димерные, тримерные, тетрамерные и мультимерные конфигурации конъюгатов ХТЕН-кросс-линкер и ХТЕН-нагрузочное вещество.

В одном аспекте реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых различные количества ХТЕН или участников конъюгации ХТЕН-нагрузочное вещество соединены посредством линкеров в определенной количественной конфигурации; например димерной, тримерной, тетрамерной или мультимерной. Предполагается, что употребляемый в данном тексте термин "предшественник" включает в себя компоненты, применяемые в качестве реактантов в реакции конъюгации, которая приводит к образованию промежуточной или конечной композиции, и включает, но не ограничивается этим, фрагменты ХТЕН различной длины (включая ХТЕН из табл. 2 и 3 либо те, которые показаны выше в виде различных формул), ХТЕН-кросс-линкеры, сегменты ХТЕН-нагрузочное вещество-кросс-линкер, нагрузочные вещества с реакционно-способными группами, линкеры и другие описанные в данном тексте подобные компоненты. В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых два ХТЕН или сегменты предшественника ХТЕН-нагрузочное вещество соединены посредством двухвалентного линкера, что приводит к образованию двухвалентной конфигурации, такой, как та, что показана на фиг. 19С и 27В. В одном варианте реализации двухвалентного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество каждый элемент ХТЕН-нагрузочное вещество может являться мономерным гибридным белком, содержащим биологически активный пептид или полипептид, при этом каждый сегмент предшественника гибридного белка соединен с двухвалентным линкером при помощи  $\alpha$ -аминогруппы N-конца, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В другом варианте реализации двухвалентного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество каждый сегмент предшественника ХТЕН-нагрузочное вещество представляет собой мономерный гибридный белок, содержащий биологически активный пептид или полипептид, при этом каждый гибридный белок соединен с двухвалентным линкером в С-конце, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В другом варианте реализации двухвалентного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество каждый ХТЕН содержит одно или более нагрузочных веществ (которые могут являться пептидами, полипептидами либо лекарственными веществами), соединенных с ХТЕН, при этом каждый предшественник ХТЕН связан с другим предшественником ХТЕН, содержащим одну или более молекул второго отличного нагрузочного вещества, посредством двухвалентного линкера в N-конце, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В другом варианте реализации двухвалентного конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество каждый ХТЕН содержит одно или более нагрузочных веществ (которые могут являться пептидами, полипептидами либо лекарственными веществами), соединенных с ХТЕН, при этом каждый предшественник ХТЕН связан с другим предшественником ХТЕН, содержащим одну или более молекул второго отличного нагрузочного вещества, посредством двухвалентного линкера через карбоксильную группу или модифицированную группу в С-конце (включая, но не ограничиваясь ХТЕН, модифицированный при помощи вставки цистеина в С-конце), что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В приведенных выше в данном параграфе вариантах реализации, как будет очевидно для специалиста в данной области, в контексте настоящего изобретения существуют различных подходы для создания предшественников, предназначенных для связывания, например, это конъюгация линкера с первым предшественником ХТЕН-нагрузочное вещество и дальнейшее стимулирование второй реакции для того, чтобы присоединить предшественника к реакционноспособной группе, находящейся на конце второго предшественника ХТЕН-нагрузочное вещество. В альтернатив-

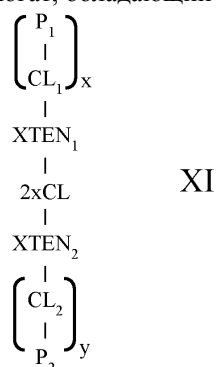
ном варианте оба конца XTEN могут быть модифицированы как предшественники, которые затем можно соединить при помощи клик-химии или при помощи других описанных и проиллюстрированных в данном тексте способов, оставив несколько или не оставив остаточных атомов для соединения с участком сопряжения XTEN. В другом варианте реализации изобретения две последовательности предшественника XTEN-нагрузочное вещество соединены дисульфидным мостиком посредством цистеинов или тиоловых групп, в или вблизи конца реактантов-предшественников XTEN-нагрузочное вещество, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество. Примеры конфигураций таких двухвалентных конъюгатов приведены далее.

В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле X



где независимо в случае каждого появления  $P_{R1}$  является одноатомным остатком первого нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $P_{R2}$  является одноатомным остатком второго нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы;  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1;  $CL_2$  является кросс-линкером, отличным от  $CL_1$ ;  $y$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что  $x + y$  является  $\geq 2$ ;  $2xCL$  представляется собой либо двухвалентный кросс-линкер либо продукт реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15;  $XTEN_1$  представляет собой полипептид, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3;  $XTEN_2$  представляет собой полипептид, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый из  $CL_1$  и  $CL_2$  выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в табл. 13. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X,  $x$  равен 1, а  $CL_1$  связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X,  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X,  $CL_2$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый  $CL_1$  связан с группой серы цистеина XTEN<sub>1</sub>, а каждый  $CL_2$  связан с группой серы цистеина XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый  $CL_1$  связан с ε-аминогруппой лизина XTEN<sub>1</sub>, а каждый  $CL_2$  связан с ε-аминогруппой лизина XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются одинаковыми. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются разными. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле X, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей. В другом варианте

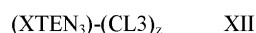
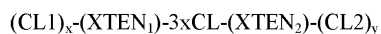
реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле XI



где независимо в случае каждого появления  $P_1$  является нагрузочным веществом, выбранным из группы нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21;  $P_2$  является нагрузочным веществом, выбранным из группы нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, и отличным от  $P_1$ ;  $CL_1$  является кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1;  $CL_2$  является кросс-линкером, отличным от  $CL_1$ ;  $y$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что  $x + y$  является  $\geq 2$ ;  $2xCL$  представляется собой либо двухвалентный кросс-линкер либо продукт реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15;  $XTEN_1$  представляет собой первый в основном гомогенный XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3; а  $XTEN_2$  представляет собой второй в основном гомогенный XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый из  $CL_1$  и  $CL_2$  выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в табл. 13. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI,  $x$  равен 1, а  $CL_1$  связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI,  $CL_1$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI,  $CL_2$  является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из табл. 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый  $CL_1$  связан с группой серы цистеина XTEN<sub>1</sub>, а каждый  $CL_2$  связан с группой серы цистеина XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый  $CL_1$  связан с ε-аминогруппой лизина XTEN<sub>1</sub>, а каждый  $CL_2$  связан с ε-аминогруппой лизина XTEN<sub>2</sub>. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются одинаковыми. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> являются разными. В другом варианте реализации изобретения конъюгат, соответствующий формуле XI, выбран из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в табл. 21. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле XI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% соответствующих молекул XTEN<sub>1</sub> и XTEN<sub>2</sub> данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

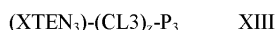
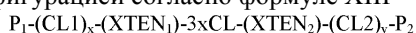
В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-линкер и XTEN-линкер нагрузочное вещество с тримерной конфигурацией, такой, как показано на фиг. 21-23.

В изобретении предложены тримерные конъюгаты, в которых три конъюгата XTEN-кросс-линкер связаны трехвалентным линкером, что приводит к образованию тримерной конфигурации XTEN-кросс-линкер. В одном варианте реализации в изобретении предложен тримерный XTEN-кросс-линкер, обладающий конфигурацией согласно формуле XII



где независимо в случае каждого появления  $3xCL$  является трехвалентным кросс-линкером,  $CL1$  является первым кросс-линкером, соединенным с  $XTEN_1$ ,  $CL2$  является вторым кросс-линкером, соединенным с  $XTEN_2$ ,  $CL3$  является третьим кросс-линкером, соединенным с  $XTEN_3$ ,  $x$  является целым числом от 1 до около 10,  $y$  является целым числом от 1 до около 10,  $z$  является целым числом от 1 до около 10, при условии, что  $x+y+z$  является  $>3$ ,  $XTEN_1$  представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3;  $XTEN_2$  представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, а  $XTEN_3$  представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом  $XTEN_1$ ,  $XTEN_2$  и  $XTEN_3$  являются одинаковыми либо разными. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XII, каждый из  $CL1$ ,  $CL2$  и  $CL3$  выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в табл. 13, при этом они являются одинаковыми либо разными. В одном варианте реализации конъюгат, соответствующий формуле XII, дополнительно содержит одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, соединенный с каждым кросс-линкером первого в основном гомогенного XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы, одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, соединенный с каждым кросс-линкером второго в основном гомогенного XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы, и одноатомный остаток третьего нагрузочного вещества, соединенный с каждым кросс-линкером третьего в основном гомогенного XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы.

В другом варианте реализации в изобретении предложены тримерные конъюгаты, в которых три предшественника конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество связаны трехвалентным линкером, что приводит к образованию тримерной конфигурации XTEN-нагрузочное вещество, такой, как показана на фиг. 21 и 97-106. В одном варианте реализации в изобретении предложены тримерные конъюгаты XTEN-кросс-линкер, обладающие конфигурацией согласно формуле XIII

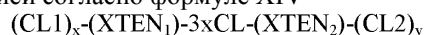


где независимо в случае каждого появления  $3xCL$  является трехвалентным кросс-линкером, выбранным из группы трехвалентных кросс-линкеров, приведенных в табл. 13 и 14;  $P_1$  соединен с каждым кросс-линкером первого XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21;  $P_2$  является вторым нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером второго XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого нагрузочного вещества, а  $P_3$  является третьим нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером третьего XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого или второго нагрузочного вещества;  $CL_1$  является первым кросс-линкером;  $x$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1;  $CL_2$  является вторым кросс-линкером;  $y$  является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что  $x+y$  является  $\geq 3$ ;  $XTEN_1$  представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3;  $XTEN_2$  представляет собой второй



XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, а XTEN<sub>3</sub> представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом XTEN<sub>1</sub>, XTEN<sub>2</sub> и XTEN<sub>3</sub> являются одинаковыми либо разными последовательностями. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгат, соответствующий формуле XIII, дополнительно содержит первое нагрузочное вещество, при этом нагрузочное вещество представляет собой нацеленный компонент, обладающий специфической аффинностью связывания с мишенью, нацеленный компонент выбран из группы, состоящей из нацеленных компонентов, приведенных в табл. 17-19 и 21, а по меньшей мере одно из нагрузочных веществ представляет собой лекарственное вещество, причем лекарственное вещество выбрано из группы, состоящей из лекарственных веществ, приведенных в табл. 11, 19 и 21. В одном варианте реализации вышесказанного нацеленный компонент является LHRH или фолатом, а лекарственное вещество выбрано из доксорубина, паклитаксела, ауристатины, монOMETИЛ ауристатины E (ММАЕ), монOMETИЛ ауристатины F, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина.

В другом варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, данная композиция обладает конфигурацией согласно формуле XIV



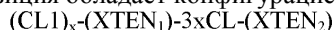
|

(XTEN<sub>3</sub>)

XIV

где независимо в случае каждого появления 3xCL является трехвалентным кросс-линкером; CL1 является первым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>1</sub>; CL2 является вторым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>2</sub>; x является целым числом от 1 до около 10; y является целым числом от 1 до около 10 при условии, что x+y является  $\geq 2$ , XTEN<sub>1</sub> представляет собой первый XTEN; XTEN<sub>2</sub> представляет собой второй XTEN, и XTEN<sub>3</sub> представляет собой третий XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 2. В одном варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XIV, данная композиция дополнительно содержит одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, соединенный с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; и одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, соединенный с каждым вторым кросс-линкером XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XIV, данная композиция дополнительно содержит первое нагрузочное вещество, соединенное с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 6, 7, 18 и 21; и второе нагрузочное вещество, соединенное с каждым вторым кросс-линкером второго XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 6, 7, 18 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным или отличным от первого нагрузочного вещества. В одном варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество представляет собой нацеленный компонент, обладающий специфической аффинностью связывания с мишенью, нацеленный компонент выбран из группы, состоящей из нацеленных компонентов, приведенных в табл. 17-19 и 21, а второе нагрузочное вещество представляет собой лекарственное вещество, выбранное из группы, состоящей из лекарственных веществ, приведенных в табл. 6, 18 и 21. В одном варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество представляет собой нацеленный компонент, выбранный из группы, состоящей из LHRH и фолата, а второе нагрузочное вещество представляет собой лекарственное вещество, выбранное из группы, состоящей из доксорубина, паклитаксела, ауристатины, монOMETИЛ ауристатины E (ММАЕ), монOMETИЛ ауристатины F, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В одном варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество представляет собой лекарственное вещество, выбранное из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11 и белков из табл. 12, а второе нагрузочное вещество отличается от первого нагрузочного вещества и выбрано из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11 и белков из табл. 12. В другом варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество одинаковы и выбраны из группы, состоящей из лекарственных веществ из табл. 11 и белков из табл. 12. В другом варианте реализации тримерной конъюгационной ком-

позиции XTEN, данная композиция обладает конфигурацией согласно формуле XV



|

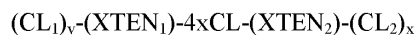
(XTEN<sub>3</sub>)

XV

где независимо в случае каждого появления 3xCL является трехвалентным кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>1</sub>; CL<sub>1</sub> является первым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>1</sub>; x является целым числом от 1 до около 10; XTEN<sub>1</sub> представляет собой первый XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 3; XTEN<sub>2</sub> представляет собой второй XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 2; и XTEN<sub>3</sub> представляет собой третий XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 2. В одном варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XV, данная композиция дополнительно содержит одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, соединенный с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XV, данная композиция дополнительно содержит первое нагрузочное вещество, соединенное с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 6, 7, 18 и 21.

В другом варианте реализации тримерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться мономерным гибридным белком, содержащим биологически активный пептид или полипептид, при этом гибридный белок соединен с трехвалентным линкером на участке аминогруппы или тиоловой группы XTEN. В другом варианте реализации тримерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться конъюгатом нагрузочного вещества, соединенного с XTEN, который может быть биологически активным пептидом или полипептидом либо фармакологически активным низкомолекулярным веществом или токсином, соединенным с XTEN, который, в свою очередь, соединен с трехвалентным линкером в N-конце XTEN. В вышеприведенных вариантах реализации XTEN-линкер-нагрузочное вещество, которые описаны в этом параграфе, три нагрузочных вещества могут быть одинаковыми либо они могут быть разными. В одном варианте реализации тримерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество данный конъюгат содержит по меньшей мере один биологически активный белок и по меньшей мере одно лекарственное вещество, соединенные с другим XTEN, который, в свою очередь, соединен с трехвалентным линкером в N-конце XTEN. В конкретном варианте реализации вышеприведенной конфигурации по меньшей мере один биологически активный белок представляет собой нацеленный компонент, а по меньшей мере одно лекарственное вещество представляет собой токсин, включая, но не ограничиваясь этим, доксорубин, паклитаксел, ауристин, монометил ауристин E (ММАЕ), монометил ауристин F, майтанзин, доластатин, калихеамицин, алкалоид барвинка, камптотecin, митомицин C, эпотилон, hTNF, IL-12, бортезомиб, ранпирназу, экзотоксин синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицин. В зависимости от позиции тиоловой или ε-аминогруппы в XTEN можно контролировать то, находится ли нагрузочное вещество внутри (как показано на фиг. 23B) или в конце перекрестно-сшитого XTEN (как показано на фиг. 23A). В вышеприведенных вариантах реализации неограничивающие примеры нацеленных компонентов включают LHRH, фолат, октреотид, пасиротид, бомбезин, моноклональные антитела, оцВФ, центрин и фрагменты антител, каркасы и миметики из табл. 17. Примеры конфигураций таких двухвалентных конъюгатов приведены далее. В изобретении дополнительно предложены конъюгаты XTEN-линкер и XTEN-нагрузочный линкер с тетрамерной конфигурацией. В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых четыре последовательности XTEN соединены посредством четырехвалентного линкера, что приводит к образованию тетрамерной конфигурации XTEN-кросс-линкер, такой, как показано на фиг. 22D. Неограничивающие примеры четырехвалентных линкеров включают четырехвалентный тиоловый, четырехвалентный N-малеинимидный линкер, такой как описан в патенте США № 7524821, либо антитело или фрагмент антитела с четырьмя реакционноспособными группами.

В данном изобретении предложены конъюгаты, в которых четыре последовательности предшественников XTEN-кросс-линкер соединены четырехвалентным линкером, что приводит к образованию четырехвалентной конфигурации XTEN-кросс-линкер. В одном варианте реализации в изобретении предложен тетрамерный XTEN-кросс-линкер, обладающий конфигурацией, соответствующей формуле XVI



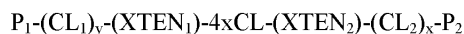
/ \

(CL<sub>3</sub>)<sub>y</sub>-(XTEN<sub>3</sub>)(XTEN<sub>4</sub>)-(CL<sub>4</sub>)<sub>z</sub>

XVI

где независимо в случае каждого появления 4xCL является четырехвалентным кросс-линкером; CL<sub>1</sub> является первым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>1</sub>; CL<sub>2</sub> является вторым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>2</sub>; CL<sub>3</sub> является третьим кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>3</sub>; CL<sub>4</sub> является четвертым

кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>4</sub>; x является целым числом от 1 до около 10; y является целым числом от 1 до около 10; z является целым числом от 1 до около 10 при условии, что x+y+z является ≥4; XTEN<sub>1</sub> представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3; XTEN<sub>2</sub> представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3; XTEN<sub>3</sub> представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом XTEN<sub>1</sub>, XTEN<sub>2</sub> и XTEN<sub>3</sub> являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN; XTEN<sub>4</sub> представляет собой четвертый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом XTEN<sub>1</sub>, XTEN<sub>2</sub>, XTEN<sub>3</sub> и XTEN<sub>4</sub> являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN. В изобретении предложены конъюгаты, в которых четыре последовательности предшественников XTEN-нагрузочное вещество соединены четырехвалентным линкером, что приводит к образованию четырехвалентной конфигурации XTEN-нагрузочное вещество, как показано на фиг. 22С и 105. В одном варианте реализации в изобретении предложен тетрамерный XTEN-нагрузочное вещество, обладающий конфигурацией, соответствующей формуле XVII



/ \



где независимо в случае каждого появления 4xCL является четырехвалентным кросс-линкером; P<sub>1</sub> соединен с каждым кросс-линкером первого XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, P<sub>2</sub> является вторым нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером второго XTEN, и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого нагрузочного вещества, P<sub>3</sub> является третьим нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером третьего XTEN, и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого или второго нагрузочного вещества; P<sub>4</sub> является четвертым нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером четвертого XTEN, и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого, второго или третьего нагрузочного вещества; CL<sub>1</sub> является первым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>1</sub>; CL<sub>2</sub> является вторым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>2</sub>; CL<sub>3</sub> является третьим кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>3</sub>; CL<sub>4</sub> является четвертым кросс-линкером, соединенным с XTEN<sub>4</sub>; v является целым числом от 1 до около 10; x является целым числом от 1 до около 10; y является целым числом от 1 до около 10; z является целым числом от 1 до около 10 при условии, что x+y+z является ≥4; XTEN<sub>1</sub> представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3; XTEN<sub>2</sub> представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3; XTEN<sub>3</sub> пред-

ставляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом XTEN<sub>1</sub>, XTEN<sub>2</sub> и XTEN<sub>3</sub> являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN; XTEN<sub>4</sub> представляет собой четвертый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом XTEN<sub>1</sub>, XTEN<sub>2</sub>, XTEN<sub>3</sub> и XTEN<sub>4</sub> являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN.

В другом варианте реализации четырехвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться мономерным гибридным белком, содержащим биологически активный пептид или полипептид, при этом гибридный белок соединен с четырехвалентным линкером на участке аминокислотной или тиоловой группы XTEN. В другом варианте реализации четырехвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться конъюгатом нагрузочного вещества, соединенного с XTEN, который может быть биологически активным пептидом или полипептидом либо фармакологически активным низкомолекулярным веществом или токсином, соединенным с XTEN, который, в свою очередь, соединен с четырехвалентным линкером в N-конце XTEN. В вышеприведенных вариантах реализации XTEN-линкер-нагрузочное вещество, которые описаны в этом параграфе, четыре нагрузочных вещества могут быть одинаковыми либо они могут быть разными. В конкретном варианте реализации вышеприведенной конфигурации по меньшей мере один биологически активный белок представляет собой нацеленный компонент, а по меньшей мере одно лекарственное вещество представляет собой токсин, включая, но не ограничиваясь этим, доксорубин, паклитаксел, ауристин, монометил ауристин E (ММАЕ), монометил ауристин F, майтанзин, доластин, калихеамицин, алкалоид барвинка, камптотецин, митомицин C, эпотилон, hTNF, IL-12, бортезомиб, ранпирназу, экзотоксин синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицин. В зависимости от позиции тиоловой или ε-аминогруппы в XTEN можно контролировать то, находится ли нагрузочное вещество внутри или в конце перекрестносшитого XTEN.

#### 4. Мультивалентные конфигурации с четырьмя или более элементами XTEN-нагрузочные вещества.

Применяя XTEN из табл. 3 можно создать композиции, содержащие четыре или более молекул XTEN-нагрузочное вещество, связанных с цистеин- или лизин-сконструированным остовом, что приводит к образованию "гребенчатой" мультивалентной конфигурации, или к связыванию множественных разветвленных предшественников для образования "дендримерной" конфигурации, как проиллюстрировано на фиг. 7. В одном варианте реализации изобретения мультивалентный конфигурационный конъюгат создают путем проведения реакции между цистеин- или лизин-сконструированным XTEN и XTEN-нагрузочным веществом, содержащим линкер, подходящий для реакции с цистеин- или лизин-сконструированным XTEN (как проиллюстрировано на фиг. 24), что приводит к образованию конечного продукта. В другом варианте реализации изобретения мультивалентный конфигурационный конъюгат создают путем проведения реакции между цистеин- или лизин-сконструированным XTEN и XTEN-нагрузочным веществом, содержащим цистеин либо первичную или ε-аминогруппу, подходящую для реакции с линкером, соединенным с цистеин- или лизин-сконструированным XTEN, что приводит к образованию конечного продукта. В данных вариантах реализации валентность конечного продукта регулируют посредством количества реакционноспособных групп, включенных в XTEN, в случае, как реакционноспособной аминокислоты, так и линкера. Вдобавок предполагается, что конечный продукт можно сконструировать так, чтобы расположить нагрузочное вещество либо вблизи концов XTEN, что улучшает взаимодействия с лигандом, либо вблизи точек разветвления для того, чтобы экранировать нагрузочное вещество и уменьшить степень взаимодействий с лигандом.

#### 5. Конфигурации биспецифического нагрузочного вещества на мономерном остове XTEN.

В другом аспекте реализации в изобретении предложены конъюгаты, содержащие две различные молекулы нагрузочных веществ, соединенные с одним цистеин- или лизин-сконструированным остовом XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 27A, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В одном варианте реализации изобретения конъюгаты с двухвалентной конфигурацией создают путем проведения реакции между сконструированным XTEN, таким как те, которые приведены конкретно в табл. 3, и первым элементом XTEN-нагрузочное вещество, содержащим линкер, подходящий для реакции с цистеин-сконструированным XTEN, и следующей за ней второй реакцией между вторым сконструированным XTEN и вторым элементом XTEN-нагрузочное вещество, содержащим линкер, подходящий для реакции с лизин-сконструированным XTEN, что приводит к образованию конечного продукта. Количество и месторасположение нагрузочных веществ регулируют посредством проектирования конструируе-

мых XTEN, в котором решающим фактором есть расположение реакционноспособной тиоловой или аминокислотной группы. В одном варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат содержит одну молекулу первого нагрузочного вещества и одну молекулу второго нагрузочного вещества, связанные с цистеин-лизин-сконструированным XTEN посредством линкеров. В другом варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат содержит одну, или две, или три, или четыре, или пять молекул первого нагрузочного вещества и одну молекулу второго нагрузочного вещества, связанных с цистеин-лизин-сконструированным XTEN посредством линкеров. В другом варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат содержит одну, или две, или три, или четыре, или пять молекул первого нагрузочного вещества и одну, или две, или три, или четыре, или пять молекул второго нагрузочного вещества, связанных с цистеин-лизин-сконструированным XTEN посредством линкеров.

В другом варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат создают путем проведения реакции между цистеин- или лизин-сконструированным XTEN, таким как те, которые приведены в табл. 3, с первым линкером, подходящим для реакции с цистеин-сконструированным XTEN, и следующей за ней второй реакцией с линкером, подходящим для реакции с лизин-сконструированным XTEN, затем проводят реакцию остова XTEN-кросс-линкер и первого нагрузочного вещества с тиоловой реакционноспособной группой, способной вступать в реакцию с первым линкером, и следующую за ней реакцию второго нагрузочного вещества с аминокислотной группой, способной вступать в реакцию со вторым кросс-линкером, что приводит к образованию конечного продукта.

6. Конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество со спейсерами и высвобождаемыми группами.

В другом аспекте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество с конфигурацией, предусматривающей наличие одного или более спейсеров, инкорпорированных в или сопряженных с XTEN, которые сконструированы для того, чтобы привнести или усилить функциональность или какое-либо свойство композиции, либо в качестве вспомогательных элементов при составлении или производстве композиций. Такие свойства включают, но не ограничиваются этим, включение последовательности, которая может протеолитически расщепляться, или лабильной функциональной группы для того, чтобы сделать возможным высвобождение нагрузочного вещества, либо спейсер можно вносить между последовательностью XTEN и компонентом нагрузочного вещества, чтобы уменьшить стерическое несоответствие так, что компонент нагрузочного вещества сможет необходимым образом взаимодействовать со своим целевым лигандом.

В одном варианте реализации в линкеры конъюгатов, являющихся объектами изобретения, инкорпорирован один или более спейсеров. Информацию по спейсерам и способам выявления необходимых спейсеров см., например, в George, et al. (2003) *Protein Engineering* 15:871-879, отдельно включенную в данный текст посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения спейсер содержит одну или более пептидных последовательностей, длина которых составляет между 1-50 аминокислотными остатками, или около 1-25 аминокислотных остатков, или около 1-10 аминокислотных остатков. Спейсерные последовательности, за исключением сайтов расщепления, могут содержать любые из 20 природных L-аминокислот, и предпочтительно будут обладать XTEN-подобными свойствами, поскольку большинство остатков будут гидрофильными аминокислотами, которые являются стерически незатрудненными. Спейсер может представлять собой полиглицин или полиаланин или являться комбинацией преимущественно из остатков глицина, серина и аланина. В одном варианте реализации изобретения спейсерная последовательность является последовательностью из табл. 15. В другом варианте реализации изобретения спейсерная последовательность является GPEGPS. Вдобавок спейсерные последовательности сконструированы так, чтобы избежать внесения эпитопов Т-клеток, что может быть частично достигнуто путем недопущения наличия или ограничения количества гидрофобных аминокислот в составе спейсера; определение эпитопов описано выше и в примерах.

В одном варианте реализации изобретения спейсер содержит отделяемую группу, которая делает возможным высвобождение нагрузочного вещества из конъюгата. В другом варианте реализации изобретения кросс-линкер содержит отделяемую группу, которая делает возможным высвобождение нагрузочного вещества из конъюгата. Отделяемая группа может быть любой лабильной группой, обеспечивающей наличие подобного отделяемого дополнения. В одном варианте реализации изобретения отделяемая группа является химически расщепляемым соединением или лабильным химическим соединением. Обычно подобные соединения можно расщепить при помощи способов, которые хорошо известны специалистам в данной области, например, обработки кислотой, основанием, окислением, восстановлением, перемещением или удалением. В конкретном варианте реализации изобретения химически расщепляемое соединение содержит модифицированное основание, модифицированный сахар, дисульфидную связь, химически расщепляемую группу, внесенную в кросс-линкер или спейсер. Некоторые примеры таких соединений описаны в заявке согласно РСТ WO 96/37630 и патенте США № 7132519, включенным в данный текст посредством ссылки. Отделяемые группы, которые входят в объем изобретения, включают группы или соединения, расщепляемые ферментами. Ферментативно-расщепляемые отделяемые группы включают фосфодиэфирные или амидные соединения, а также участки распознавания рестрикционной эндонуклеазы. В одном варианте реализации в изобретении предложены композиции, содержа-

щие одно или более нагрузочных веществ, в которых отщепляемый валин-цитруллинный линкер размещен между нагрузочным веществом и ХТЕН, делая возможным отщепление катепсином, когда композиция интернализирована внутриклеточно; например внутри опухолевой клетки. В другом варианте реализации изобретения отделяемые группы расщепляются нуклеазами. Эти нуклеазы, как правило, являются экзонуклеазами или рестрикционными эндонуклеазами. Типичные экзонуклеазы включают экзонуклеазы, специфические как к двухцепочечным, так и одноцепочечным полинуклеиновым кислотам. Вдобавок, рестрикционные эндонуклеазы, применяемые в отдельных вариантах реализации, включают рестрикционные эндонуклеазы типа IIS и типа II. В других вариантах реализации изобретения отделяемая группа может представлять собой последовательность, которая расщепляется протеазой, при этом последовательность выбрана из последовательностей, приведенных в табл. 9. Типичные протеазы, воздействующие на последовательности, подходящие для включения в композиции данного изобретения, включают эндопротеиназы, включая протеиназы из табл. 9.

#### 7. Библиотеки конфигураций ХТЕН-нагрузочное вещество.

В другом аспекте реализации в изобретении предложены библиотеки предшественников ХТЕН-нагрузочное вещество, способы создания таких библиотек и способы комбинирования предшественников из библиотек в комбинаторных подходах, как проиллюстрировано на фиг. 34-35, для получения оптимальных комбинаций, а также оптимального соотношения нагрузочных веществ. В одном варианте реализации в изобретении предложена библиотека оригинальных ХТЕН, каждый из которых связан с 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или более молекулами заданного нагрузочного вещества, включая те, что описаны в данном тексте, для создания библиотеки предшественников ХТЕН-нагрузочное вещество. В данном способе группы предшественников ХТЕН-нагрузочное вещество, которые необходимо соединить, дополнительно присоединены к линкеру, а затем последовательно смешаны и подвергнуты реакции с другими предшественниками ХТЕН-нагрузочное вещество, способными вступать в реакцию с линкером в условиях, которые стимулируют конъюгацию, что приводит к созданию библиотеки различных пермутаций и соотношений нагрузочных веществ, присоединенных к ХТЕН. Далее в ходе *in vitro* или *in vivo* анализа проводится скрининг таких библиотек для оценки параметров при данных клинических показаниях (например, рак, нарушение обмена веществ, диабет) для того, чтобы определить те композиции, которые обеспечивают оптимальный ответ. В одном примере варианта реализации одна из категорий предшественников нагрузочных веществ включает различные нацеленные модули, такие как пептиды (например, нацеленные компоненты из табл. 17) с аффинностью связывания с опухоль-ассоциированным антигеном из табл. 20, а вторая категория предшественников представляет собой одно или более лекарственных веществ, таких как цитотоксические лекарственные вещества или лекарственные вещества, выбранные из табл. 19. Каждая категория предшественников, предназначенных для соединения, дополнительно присоединена к линкеру и, как проиллюстрировано на фиг. 36, последовательно смешана и подвергнута реакции с другими предшественниками ХТЕН-нагрузочное вещество, способными вступать в реакцию с линкером в условиях, которые стимулируют конъюгацию, что приводит к созданию библиотеки различных нацеленных компонентов и пермутаций лекарственных веществ в различных соотношениях друг с другом. Конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество сконструированы так, чтобы делать возможными фиксированные соотношения между одним нагрузочным веществом и другим; например 1:1, или 1:1.5, или 1:2, или 1:3, или 2:3, или 1:4, или 1:5 или 1:9 в случае двух различных нагрузочных веществ. Аналогичные диапазоны соотношений можно применять для библиотеки конъюгатов, содержащих 3, 4, 5 или более нагрузочных веществ.

В других вариантах реализации изобретения библиотеки составляют, используя три или более нагрузочных веществ, которые, как известно, оказывают положительный эффект в лечении общего заболевания. В одном варианте реализации изобретения библиотека содержит нагрузочные вещества, присоединенные к ХТЕН, при этом каждое нагрузочное вещество является лекарственным веществом или биологически эффективно для облегчения симптомов общего заболевания. В другом варианте реализации изобретения библиотека содержит нагрузочные вещества, присоединенные к ХТЕН, при этом каждое лекарственное вещество или биологическое вещество является эффективным для лечения различных симптомов общего заболевания. В другом варианте реализации изобретения библиотека содержит нагрузочные вещества, присоединенные к ХТЕН, при этом каждое лекарственное вещество или биологическое вещество опосредует их терапевтический эффект через общие биологические реакции. В вышеприведенных вариантах реализации библиотек общее заболевание выбрано из рака, заместительной терапии рака, кардиоваскулярных заболеваний, заболеваний центральной нервной системы, эндокринных заболеваний, заболеваний желудочно-кишечного тракта, урогенитальных заболеваний, гематологических заболеваний, ВИЧ-инфекции, заболеваний гормональной системы, воспалений, аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний, нарушений обмена веществ, скелетно-мышечных нарушений, нефрологических нарушений, офтальмологических заболеваний, боли и респираторных заболеваний. С большей долей определенности, заболевания, для которого были созданы библиотеки с нагрузочными веществами, которые, как известно, обладают положительным эффектом, выбрано из табл. 16. Нагрузочные вещества, подходящие для применения в лечении или предотвращении таких заболеваний, включают те, которые описаны в данном тексте (например, нагрузочные вещества из табл. 11, 12, 18 и 21), либо их можно найти в

общедоступных базах данных, либо в других источниках, известных специалистам в данной области.

Таблица 16

Заболевания, для которых определены нагрузочные вещества

Заболевание		
Ахондроплазия	Диабетическая нефропатия	Мукозит
Акромегалия	Диабетическая невропатия	Множественный склероз
СПИД	Диагностика	Мышечная дистрофия
Болезнь Альцгеймера	Нарушение питания	Скелетно-мышечное
Анемия	Эритропоэтическая протопорфирия	Инфаркт/ишемия миокарда
Артрит	Желудочно-кишечное расстройство	Нейтропения
Астма	Подагра	Ожирение
Атеросклероз	Дефицит гормона роста	Остеоартрит
Аутизм	Гемофилия	Остеопороз
Аутоиммунное заболевание	Гепатит В	Боль
Болезнь Баттена	Гепатит С	Болезнь Паркинсона
Восстановление костной и хрящевой ткани	Наследственная эмфизема	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия
Кахексия	ВИЧ	Фенилкетонурия
Рак (все типы)	Гиперлипидемия/дислипидемия	Псориаз
Кардиоваскулярные заболевания	Гиперпаратиреоз	Легочная артериальная гипертензия
Заболевания, вызванные химиотерапией	Гипертония	Легочная гипертензия
Осложнения, вызванные хроническими заболеваниями почек	Гипогликемия	Заболевания, вызванные лучевой терапией
Нарушение свертывания крови	Гипопаратиреоз	Сепсис
Колит	Гипотиреоз	Сексуальная дисфункция
Врожденный гиперинсулинизм	Инфекционные заболевания	Синдром короткого кишечника
Врожденный порок сердца	Бесплодие	Апоплексический удар
ХОБЛ	Воспалительное заболевание	Тромбоцитопения
Болезнь Крона	Липодистрофия	Заболевание щитовидной железы
Кистозный фиброз	Лимфопения	Трансплантация
Диабет	Макулярная дегенерация	Вирусная инфекция
Осложнения, вызванные диабетом	Нарушения обмена веществ	

В одном варианте реализации изобретения, как проиллюстрировано на фиг. 37, биспецифический конъюгат содержит модуль лекарственного вещества, соединенный с XTEN посредством отщепляемого или лабильного линкера, при этом линкер может отщепляться либо диссоциировать после введения пациенту, включая случай внутриклеточной интернализации в клетке-мишени для нацеленных модулей. В другом варианте реализации изобретения лекарственное вещество соединено с XTEN посредством неотщепляемого линкера, но при этом конъюгат остается восприимчивым к разложению. При интернализации XTEN расщепляется протеазами, а лекарственное вещество, связанное с его линкером, высвобождается, что приводит к цитотоксичности.

В одном примере реализации нацеленный модуль является лютеинизирующим релизинг-гормоном (также называемым LHRH, GnRH и гонадотропин-релизинг гормоном), лекарственное вещество является доксорубицином, при этом соотношение между LHRH и доксорубицином составляет 1:1, или 1:1.5, или 1:2, или 1:3, или 1:9, или 2:3, или 3:1, или 3:2, или 2:1 или 1.5:1. Конъюгат можно создать, начиная с предшественников XTEN. Один предшественник XTEN может нести 1, 2 или более молекул лекарственного вещества и реакционноспособный кросс-линкер, или реактант клик-химии, или реакционноспособную аминокислоту. Второй предшественник XTEN несет 1, 2 или более доменов LHRH для нацеливания и реакционноспособный кросс-линкер, или реактант клик-химии, или реакционноспособную аминокислоту. Оба сегмента-предшественника затем соединяют посредством реакции между реакционноспособными группами соответствующего XTEN. В одном примере реализации реакционно-способная группа является азидом, который соединен посредством кросс-линкера с N-концом первого сегмента XTEN; а реакционноспособная группа второго XTEN является алкином, который соединен посредством кросс-линкера с N-концом второго сегмента XTEN. В другом варианте реализации конъюгата LHRH-XTEN-

лекарственное вещество лекарственное вещество является майтанзином. В другом варианте реализации конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество лекарственное вещество является ауристатином.

#### 8. Конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, присоединенные к нацеленным компонентам.

В другом аспекте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции, содержащие одну или более композиций ХТЕН-нагрузочное вещество, присоединенных к нацеленным компонентам. Данные нацеленные композиции находят применение в лечении различных болезненных состояний, для которых необходима избирательная доставка терапевтического средства или токсического нагрузочного вещества в клетку, ткань или орган. В изобретении предусматривается вариабельность нацеленных компонентов для применения в данных композициях, включая антитела, фрагменты антител и миметики антител, включая, но не ограничиваясь этим, те, которые приведены в табл. 17, а также пептиды и низкомолекулярные вещества, способные связывать лиганды или рецепторы, связанные с заболеванием или метаболическими либо физиологическими нарушениями. В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий по меньшей мере один нацеленный компонент из табл. 17, 18 или 21, соединенный по меньшей мере с одним ХТЕН. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий по меньшей мере один нацеленный компонент из табл. 17, 18 или 21, соединенный с каждым из по меньшей мере двух, или трех, или четырех ХТЕН. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий по меньшей мере один нацеленный компонент из табл. 17, 18 или 21, соединенный с по меньшей мере одним ХТЕН, и по меньшей мере одно лекарственное вещество или биологическое нагрузочное вещество, выбранные из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18 или 21, соединенное по меньшей мере с одним ХТЕН. В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции нацеленный компонент-ХТЕН-лекарственное вещество, в которых осуществляется избирательная доставка к лиганду или рецептору клетки-мишени композиции, которая затем может быть интернализированной клеткой, как проиллюстрировано на фиг. 37, что приводит к фармакологическому эффекту, известному в данной области для лекарственных компонентов. Как проиллюстрировано на фиг. 21-24 и 28-32, такие конъюгационные композиции могут иметь разные валентности и содержать одну, две, три или четыре или более молекул ХТЕН-нагрузочное вещество, соединенных с одним или более нацеленным антителом или нацеленным компонентом. В случае, когда нацеленными компонентами являются антитела, в одном варианте реализации изобретения конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество соединен посредством кросс-линкера с цистеином в шарнирном участке антитела. В другом варианте реализации изобретения конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество соединен дисульфидным мостиком с цистеином в шарнирном участке антитела. Соответственно, конъюгат антитело-ХТЕН-нагрузочное вещество может содержать 1, 2, 3 или 4 либо более сегментов ХТЕН-нагрузочное вещество, присоединенных к антителу, фрагменту антитела или миметику. В другом варианте реализации изобретения ХТЕН присоединен снаружи шарнирного участка, что включает внесение цистеина в антитело для контроля за участками конъюгации, или посредством конъюгации с имеющимися боковыми цепями лизина. Присоединение ХТЕН-нагрузочное вещество для того, чтобы создавать конъюгаты с антителами, имеет много преимуществ: а) ХТЕН-нагрузочное вещество служит в качестве отщепляемого линкера, б) он обеспечивает растворимость, с) он дает возможность установить соотношение нагрузочного лекарственного вещества с IgG, и d) он может быть предварительно конъюгирован с лекарственным веществом, чтобы упростить производство.

Таблица 17

Нацеленные компоненты: фрагменты антител, каркасы и миметики

Нацеленные компоненты
ABDURINS
Аднектин/Домен фибронектина типа III domain
Аднексин/Фибронектин
Аффите.ла/Протеин Z
Аффиллин
AFFINILUTE
AFFINIMIP
AFIM
Антикалины/Липокалины
Аптатело
Аптамеры
Повторяющиеся белки армадилла
Авимеры
Азиметрик



Биспецифические диатела
BiTEs
Двухвалентные диатела
Центрины
DARpins/белки с анкириновым повтором
Диатела
Доменные антитела/dAbs/человеческая Vh
Сконструированные аффинные белки
Эвитела
Fabs
Fv
Финомеры
Глутело
Im7/ColE7 иммунный белок
iMabs
Ноттин/Цистеин-узловые минибелки
Домены Кунитца
Макситела
Микротела
Минитела
Молекулярно импринтированные полимеры (МИП)
Монотела
Моноклональные рецепторы Т-клетки (mMPT)
МоноЛекс
Нанотела
Нанопитины
Филомеры
Акулий Vhh
SMIPs
СОМАмеры
Устойчивый scFV
Шпигельмеры
Синтела
TandAbs®
Телотела
Тетратела
Тетранектины
Четырехвалентные биспецифические антитела
Транс-тело
Триатела

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты, содержащие нацеленный компонент в качестве одного из нагрузочных веществ и токсины в качестве второго нагрузочного вещества с одной или более копиями каждого типа нагрузочного вещества, соединенными с XTEN, принадлежащим композиции. В одной из вариаций вышесказанного конъюгата в некоторых случаях может содержать токсин, соединенный с XTEN посредством лабильного или отщепляемого линкера так, что после доставки или интернализации внутри мишени токсин высвобождается. В другой вариации вышесказанного нацеленный компонент является антителом или фрагментом антитела с одной, двумя, тремя или четырьмя композициями XTEN-нагрузочное вещество, соединенными посредством линкеров с антителом (например, соединенными с цистеином в шарнирном участке, как проиллюстрировано на фиг. 28-29), что обеспечивает создание конъюгатов для применения в нацеленной терапии клинических показаний, таких как, без ограничений, различные виды лечения опухолей и других раков, в которых антитело обеспечивает наличие нацеленного компонента, а XTEN-нагрузочное вещество обеспечивает необходимую активность (например, цитотоксичность в опухолевой клетке). Следовательно, конъюгаты, являющиеся объектами данного изобретения, представляют собой иммуноконъюгаты. Нацеленные конъюгаты можно сконструировать так, чтобы они содержали нацеленные компоненты, полученные из антител или миметиков антител, либо являлись пептидами или низкомолекулярными веществами, которые связывают лиганды, связанные с заболеваниями клеток или органов. Неограничивающие примеры категорий фрагментов антител, каркасов и миметиков приведены в табл. 17. Неограничивающие примеры специфических нацеленных компонентов, мишеней, на которые они нацелены, и токсинов, которые можно использовать в качестве нагрузочных веществ в конъюгатах согласно изобретению, приведены в табл. 18. Отдельно предусматривается, что нацеленные конъюгационные композиции настоящего изобретения включают композиции любого заданного нацеленного компонента, который можно использовать в комбинации с одним или более из токсинов из табл. 18 или нагрузочными веществами, приведенными в табл. 11 или 12. Дополнительно предусматривается, что конъюгат XTEN-нагрузочное вещество может содержать два или более нацеленных компонентов, которые могут быть одинаковыми либо разными. Предусматривается, что подобные конъюгаты можно применять в лечении болезненных состояний, таких как, без ограничений, те, которые приведены в табл. 15.

Примеры нацеленных компонентов, нагрузочных токсинов и мишеней, на которые могут быть нацелены конъюгационные композиции

Класс	Мишень	Нацеленный компонент	Токсин
Пептид	LHRHR	LHRH и аналоги (например, D-Lys-(6)-LHRH)	доксорубин паклитаксел
	CD13, Аминопептидаза	Класс NGR (например, CNGRC, CNGRCG, GNGRG, KNGRE, (GNGRG)2KGK, CVLNGRMEC, NGRAHA, CNGRCVSGCAGRC)	ауристин (например, монометил ауристин E; монометил ауристин F)
	Фолатный рецептор	Фолат и аналоги (например, $\gamma$ -фолат, $\alpha$ -фолат; птероат- <i>gly</i> )	майтансин (например, мйтанзиноид DM1; мйтанзиноид DM4)
	Интегрин	Циленгитид, RGD-4C; iRGD	доластин калехамин
	ЛПНП-подобный рецептор	Ангиопеп-2	алкалоид барвинка (например, дезацетилвинбластин)
	Рецептор соматостатина	Соматостатин и аналоги (например, октреотид; пасиротид; ланреотид; вапреотид, JF-07-69)	моногидразид камптотецина
	Нуклеолин	F3 пептид	митомин C
	PDGFR-бета	RGR	эпитилон
	Рецептор LyP-1	LyP-1; CGNKRTRGC	hTNF
	Хондроитин сульфат протеогликан NG2	TAASGVRSMH; LTLRWVGLMS	IL-12
VPAC1 и VPAC2	Вазоактивный		
		интестинальный пептид	бортезомиб
	CCK1 и CCK2	Холецистокинин	ранприназа
	Рецептор гастрин, CCK1 и CCK2	Гастрин	экзотоксин синегнойной палочки SN-38
	Подтип рецептора GRP	Гастрин-отделяемый пептид	рахелмицин
	Рецептор нейротензина	Нейротензин	ингибитор m-TOR
	Рецептор альфа-MSH	Альфа-меланоцит стимулирующий гормон	рапамицин
	Рецептор окситоцина	Окситоцин	тубулизин
	Лимфатические сосуды	LyP-2; CNRRTKAGC	(тубулизин B; тубулизин M)
	Лимфатические сосуды	LSD; CLSDGKRKC	дуокармицин
	Лимфатические сосуды	REA; CREAGRKAC	
	Лимфатические сосуды	AGR, CAGRRSAYC	
	Перициты и клетки эндотелия	RSR; CRSRKG	
	Перициты и клетки эндотелия	КАА; СКААКНК	
	Кровеносные сосуды	CSRPRRSEC	
	Ангиогенные кровеносные сосуды и опухолевые клетки	KRK; CGKRK	
Ангиогенные кровеносные сосуды	CDTRL		
Ангиогенные кровеносные сосуды и опухолевые клетки	CGTKRKC		
Белок	DR4, DR5	TRAIL	
Антитело-подобный каркас	Разные	DARPINS	
	Разные	Центрины	
Антитело	Leu-подобный антиген	B $\nu$ 96; антитело к Leu-подобному антигену	
	HER2	Трастузумаб; Пертузумаб; антитело к HER2	
	EGFR	Цетуксимаб; антитело к EGFR	
	Нектин-4	антитело к нектину-4	
	CanAg (гликопротеин мушкетера)	huC242, антитело к CanAg	
	CD138	антитело к CD138	
	CD19	MDX-1342; MOR-208; HuB4; антитело к CD19	
	CD22	Эпратузумаб; Бектумаб; Инотузумаб; Моксетумаб; RFB4; антитело к CD22	
	CD23	Лумиликсимаб, антитело к CD23	
	CD25 (рецептор IL-2)	Даклизумаб, антитело к CD25	
	CD30	Xmab2513; cAC10; MDX-060; антитело к CD30	
	CD33	Гемтузумаб; HuM195; huMy9-6; антитело к CD33	
	CD38	Даратумаб, антитело к CD38	
	CD40	SGN-40; HCD122; антитело к CD40	
	CD56	huN901; антитело к CD56	

CD70	MDX-1411; антитело к CD70
CD74	Милатузумаб; антитело к CD74
CD79b	антитело к CD79b
CD80	Галксимаб; антитело к CD80
Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	Лапетузумаб, hCOL-1 антитело к CEA
Крипто	антитело к Крипто
cMET	CE-355621, DN30, MetMab; антитело к антагонисту cMET
EpCAM	Адекватумумаб; Эдреколомаб; Катумаксомаб; антитело к EpCAM
EphA2	IC1, антитело к EphA2
GPNMB (человеческий гликопротеин NMB (остеоактивин))	глембатумумаб, антитело к GPNMB
Интегрины	антитело к интегрину
MUC-1 (эпитоп CA6)	антитело к MUC-1
PSMA	MDX-070, MLN591, антитело к PSMA
TGFa	антитело к TGFa
TIM1	антитело к TIM1
Фолатный рецептор 1	M9346A, фарлетузумаб, антитело к фолатному рецептору
Рецептор IL-13	антитело к рецептору IL-13

В конкретном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие один или более нацеленных LHRH-компонентов, выбранных из табл. 19, и один или более лекарственных компонентов, выбранных из табл. 11. В вышеприведенных вариантах реализации LHRH может быть соединен с сегментом XTEN, который, в свою очередь, соединен с одним или более сегментами XTEN, к которым присоединены лекарственные компоненты. В альтернативном варианте LHRH и лекарственный компонент могут быть присоединены к мономерному XTEN. В некоторых случаях лекарственные компоненты могут быть дополнительно присоединены к XTEN посредством лабильных или отщепляемых линкеров, которые обеспечивают возможность высвобождения лекарственного вещества из конъюгата после введения пациенту.

Таблица 19

## Примеры LHRH

Композиция
pGlu-HWSYGLRPG-NH2
pGlu-HWSY[D-Lys]LRPG-NH2
pGlu-HWSY[D-Trp]LRPG-NH2
pGlu-HWSY[D-Leu]LRP-NHEt
pGlu-HWSY[D-Ser(tBu)]LRP-NHEt
pGlu-HWSY[D-2-Nal]LRPG-NH2
pGlu-HWSY[D-His(Bzl)]LRP-NHEt
pGlu-HWSY[D-Ser(tBu)]LRP-Azagly-NH2
pGlu-HWSY[D-Trp]LRP-NHEt
pGlu-HWSHDWLPNG-NH2

Дополнительные предусмотренные мишени, на которые могут быть нацелены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, включают опухолеассоциированные антигены, перечисленные в табл. 20. В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие один или более нацеленных компонентов, способных связываться с одной или более мишенями из табл. 20.

## Мишени - опухолеассоциированные антигены

ОАА мишени (синонимы)	Номер доступа и ссылки
Her2 (ErbB2)	Номер доступа GenBank M11730; Пат. США № 5,869,445; WO2004048938; WO2004027049; WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904; WO2003016475; US2003118592; WO2003008537; WO2003055439; WO2003025228; WO200222636; WO200212341; WO200213847; WO200214503; WO200153463; WO200141787; WO200044899; WO200020579; WO9630514; EP1439393; WO2004043361; WO2004022709; WO200100244
ВМРР1В (рецептор костного морфогенетического белка типа 1В)	Номер доступа GenBank NM_001203; WO2004063362; WO2003042661; US 2003134790; WO2002102235; WO2003055443; WO200299122; WO2003029421; WO2003024392; WO200298358; WO200254940; WO200259377; WO200230268
E16 (LAT1, SLC7A5)	Номер доступа GenBank NM_003486; WO2004048938; WO2004032842; WO2003042661; WO2003016475; WO200278524; WO200299074; WO200286443; WO2003003906; WO200264798; WO200014228; US2003224454; WO2003025138
STEAP1 (шесть трансмембранных эпителиальных антигена простаты)	Номер доступа GenBank NM_012449; WO2004065577; WO2004027049; EP1394274; WO2004016225; WO2003042661; US2003157089; US2003185830; US2003064397; WO200289747618; WO2003022995
STEAP2 (шесть трансмембранных эпителиальных антигена простаты 2)	Номер доступа GenBank AF455138; WO2003087306; US2003064397; WO200272596; WO200172962; WO2003104270; WO2003104270; US2004005598; WO2003042661; US2003060612; WO200226822; WO200216429
CA125/0772P (MUC16)	Номер доступа GenBank AF361486; WO2004045553; WO200292836; WO200283866; US2003124140
Фактор стимуляции мегакариоцитов (MPF, мезотелин)	Номер доступа GenBank NM_005823; WO2003101283; WO2002102235; WO2002101075; WO200271928; WO9410312
Котранспортер Na/Pi типа IIb (NaPi3b)	Номер доступа GenBank NM_006424; WO2004022778; EP1394274; WO2002102235; EP875569; WO200157188; WO2004032842; WO200175177
Семафорин 5b (SEMA5B, SEMAG)	Номер доступа GenBank AB040878; WO2004000997; WO2003003984; WO200206339; WO200188133; WO2003054152; WO2003101400
Антиген стволовых клеток рака простаты (PSCA hlg)	Номер доступа GenBank AY358628; US2003129192; US2004044180; US2004044179; US2003096961; US2003232056; WO2003105758; US2003206918; EP1347046; WO2003025148
ETBR (рецептор эндотелина типа В)	Номер доступа GenBank AY275463; WO2004045516; WO2004048938; WO2004040000; WO2003087768; WO2003016475; WO2003016475; WO200261087; WO2003016494; WO2003025138; WO200198351; EP522868; WO200177172; US2003109676; Пат. США № 6,518,404; Пат.

	США № 5,773,223; WO2004001004
TRPV4 (катионный канал транзитного рецепторного потенциала, подсемейство V)	Пат. заявка США № 20090208514
CDC45L	Номер доступа GenBank AJ223728; Пат. заявка США № 20090208514
CRIPTO (CR, CR1, CRGF)	Номер доступа GenBank NP _ 003203 or NM _ 003212; US2003224411; WO2003083041; WO2003034984; WO200288170; WO2003024392; WO200216413; WO200222808; U.S. 5,854,399; Пат. США № 5,792,616
CD21 (CR2 (Комплементарный рецептор 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барр))	Номер доступа GenBank M26004; WO2004045520; US2004005538; WO2003062401; WO2004045520; WO9102536; WO2004020595
CD79b (CD79B, CD79β, Igb (иммуноглобулин-ассоциированный бета), B29)	Номер доступа GenBank NM _ 000626 or 11038674; WO2004016225; WO2003087768; US2004101874; WO2003062401; WO200278524; US2002150573; Пат. США № 5,644,033; WO2003048202; WO 99/558658, Пат. США № 6,534,482; WO200055351
FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 якорный белок фосфатазы 1a), SPAP1B, SPAP1C)	Номер доступа GenBank NM _ 030764, AY358130; WO2004016225; WO2003077836; WO200138490; WO2003097803; WO2003089624
NCA (CEACAM6)	Номер доступа GenBank M18728; WO2004063709; EP1439393; WO2004044178; WO2004031238; WO2003042661; WO200278524; WO200286443; WO200260317
MDP (DPEP1)	Номер доступа GenBank BC017023; WO2003016475; WO200264798
IL20Rα (IL20Ra, ZCYTOR7)	Номер доступа GenBank AF184971; EP1394274; US2004005320; WO2003029262; WO2003002717; WO200222153; US2002042366; WO200146261; WO200146232; WO9837193
BECAN (ядерный белок бревикан)	Номер доступа GenBank AF229053; US2003186372; US2003186373; US2003119131; US2003119122; US2003119126; US2003119121; US2003119129; US2003119130; US2003119128; US2003119125; WO2003016475; WO200202634
EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)	Номер доступа GenBank NM _ 004442; WO2003042661; WO200053216; WO2004065576 (п. 1); WO2004020583; WO2003004529; WO200053216
B7h (ASLG659)	Номер доступа GenBank AX092328; US20040101899; WO2003104399; WO2004000221; US2003165504; US2003124140; US2003065143; WO2002102235; US2003091580; WO200210187; WO200194641; WO200202624; US2002034749; WO200206317; WO200271928; WO200202587; WO200140269; WO200036107; WO2004053079; WO2003004989; WO200271928
PSCA (предшественник антигена стволовых клеток простаты)	Номер доступа GenBank AJ297436; WO2004022709; EP1394274; US2004018553; WO2003008537 (п. 1); WO200281646; WO2003003906; WO200140309; US2001055751; WO200032752; WO9851805; WO9851824; WO9840403
BAFF-R (рецептор фактора, активирующего В-клетки, BLyS рецептор 3, BR3)	Номер доступа GenBank AF116456; WO2004058309; WO2004011611; WO2003045422; WO2003014294; WO2003035846; WO200294852; WO200238766; WO200224909
CD22 (рецептор В-клеток CD22-β-форма, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)	Номер доступа GenBank AK026467; WO2003072036
CD79a (иммуноглобулин-ассоциированный альфа)	Номер доступа GenBank NP _ 001774.10; WO2003088808, US20030228319; WO2003062401; US2002150573; WO9958658; WO9207574; Пат. США № 5,644,033
CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта)	Номер доступа GenBank NP _ 001707.1; WO2004040000; WO2004015426; US2003105292; Пат. США № 6,555,339; WO200261087; WO200157188; WO200172830; WO200022129; WO9928468; Пат. США № 5,440,021; WO9428931; WO9217497

HLA-DOB	Номер доступа GenBank NP _ 002111.1; WO9958658; Пат. США № 6,153,408; Пат. США № 5,976,551; Пат. США № 6,011,146
P2X5	Номер доступа GenBank NP _ 002552.2; WO2004047749; WO2003072035; WO200222660; WO2003093444; WO2003087768; WO2003029277
CD72 (антиген дифференцирования В-клеток CD72, Lyb-2)	Номер доступа GenBank NP _ 001773.1; WO2004042346; WO2003026493; WO200075655
CD180 (LY64)	Номер доступа GenBank NP _ 005573.1; US2002193567; WO9707198; WO2003083047; WO9744452
FcRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1)	Номер доступа GenBank NP _ 443170.1) WO2003077836; WO200138490; WO2003089624; EP1347046; WO2003089624
IRTA2 (Рецептор суперсемейства иммуноглобулинов транслокационно-ассоциированный 2)	Номер доступа GenBank Human: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453; WO2003024392; WO2003077836; WO200138490
TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1)	Номер доступа GenBank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO2004074320; WO2003042661; WO2003009814; EP1295944; WO200230268; WO200190304; US2004249130; US2004022727; WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563; US2003124579
CS1 (CRACC, 19A, APEX-1, FOAP12)	Номер доступа GenBank NM 021181; US 20100168397
DLL4	Номер доступа GenBank NM 019074; US 20100303812
Ley	ADB235860; US 7879983
CD40 (Bp50, CDW40, MGC9013, TNFRSF5, p50)	AL035662.65; US 6946129
OBA1 (5T4)	Номер доступа GenBank NP_001159864.1; US 20100021483
p97	Woodbury et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2183-2186; Brown et al., 1981, J. Immunol. 127: 539-546
Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	Номер доступа GenBank NP_004354.2; US 6,676,924
TAG-72	US 7256004
ДНК	
Нейропептин-1 (NRP1)	Номер доступа GenBank NP_001019799.1; US 20080213268
A33	Номер доступа GenBank NP_005805.1; US 7579187
Муцин-1 (MUC1)	Номер доступа GenBank NP_001018016.1; NP_001018017.1; US 7183388
ED-B фибронектин	US 7785591
Антиген Томсона-Фриденрайха (TF)	US 7374755; US 20100297159
Рецептор бомбезина	US5750370
CanAg	
Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	US4818709
CD13	
CD138	
CD30	
CD47	
CD56	
CD70	
Хондроитин сульфат протеогликан NG2	
EphA2	
Фолатный рецептор 1	US5547668
Рецептор гастрин	
GNMVB (человеческий гликопротеин)	
NMB (остеоактивин)	
Рецепторный подтип GRP	
Интегрин avb3	US20110166072
LHRHP	US20110104074
Рецептор LRP	
Рецептор Lyp-1	
Нектин-4	
Рецептор нейротензина	US8058230
Нуклеолин	
Рецептор соматостатина	
TIM1	
VPAC1	
VPAC2	
Рецептор альфа-MSH	
CD25	
Рецептор интерлейкина-1	

В конкретных вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, содержащие один, два или более нацеленных компонентов и один, два или более лекарственных компонентов, соединенных с ХТЕН. Неограничивающие варианты реализации отдельных конъюгационных композиций приведены в табл. 21, в которой композиция из колонки 2 содержит определенные компоненты из i) последовательностей ХТЕН из табл. 3, приведенных в таблице в колонке ХТЕН; ii) нацеленных нагрузочных компонентов, приведенных в таблице в колонке Нацеленный компонент, которые обеспечивают композиции способность нацеливания (при этом указано количество компонентов; например 1х или 3х); и iii) лекарственного фармакофора, приведенного в таблице в колонке Лекарственный компонент (при этом указано количество молекул лекарственного вещества, соединенных с ХТЕН; например 3х или 9х). Специалисту в данной области понятно, что изобретение предусматривает существование других комбинаций описанных компонентов, а также различных количеств и соотношений соответствующих определенных компонентов, а также различных последовательностей ХТЕН, к которым присоединены нагрузочные вещества. Например, в изобретении предусматривается, что количество ле-

карственных компонентов, присоединенных к заданному XTEN, может составлять 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10 или более, и что XTEN может содержать, например, соответствующее количество остатков цистеина или лизина, к которым могут быть присоединены лекарственные компоненты. Вдобавок, в изобретении предусматривается, что количество нацеленных компонентов, присоединенных к конъюгату, может составлять 1, или 2, или 3 или более, и они будут аналогично соединены с XTEN с N-концевой аминогруппой или соответствующим количеством остатков цистеина или лизина.

Таблица 21

## Примеры конъюгатов

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
1	1xLHRH-XTEN-3xDокс	Seg 174		1xLHRH	3xDоксубицин
2	1xLHRH-XTEN-9xDокс	Seg 175		1xLHRH	9xDоксубицин
3	3xLHRH-XTEN-3xDокс	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xDоксубицин
4	3xLHRH-XTEN-9xDокс	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xDоксубицин
5	XTEN-3xDокс	Seg 174			3xDоксубицин
6	XTEN-9xDокс	Seg 175			9xDоксубицин
7	1xLHRH-XTEN-3xMMAE	Seg 174		1xLHRH	3xMMAE**
8	1xLHRH-XTEN-9xMMAE	Seg 175		1xLHRH	9xMMAE
9	3xLHRH-XTEN-3xMMAE	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xMMAE
10	3xLHRH-XTEN-9xMMAE	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xMMAE
11	XTEN-3xMMAE	Seg 174			3xMMAE
12	XTEN-9xMMAE	Seg 175			9xMMAE
13	1xLHRH-XTEN-3xMMAF	Seg 174		1xLHRH	3xMMAF***
14	1xLHRH-XTEN-9xMMAF	Seg 175		1xLHRH	9xMMAF
15	3xLHRH-XTEN-3xMMAF	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xMMAF
16	3xLHRH-XTEN-9xMMAF	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xMMAF
17	XTEN-3xMMAF	Seg 174			3xMMAF
18	XTEN-9xMMAF	Seg 175			9xMMAF
19	1xLHRH-XTEN-3xМертанзин	Seg 174		1xLHRH	3xМертанзин
20	1xLHRH-XTEN-9xМертанзин	Seg 175		1xLHRH	9xМертанзин
21	3xLHRH-XTEN-3xМертанзин	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xМертанзин
22	3xLHRH-XTEN-9xМертанзин	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xМертанзин
23	XTEN-3xМертанзин	Seg 174			3xМертанзин
24	XTEN-9xМертанзин	Seg 175			9xМертанзин
25	1xLHRH-XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174		1xLHRH	3xМайтанзиноид DM4
26	1xLHRH-XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175		1xLHRH	9xМайтанзиноид DM4
27	3xLHRH-XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xМайтанзиноид DM4
28	3xLHRH-XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xМайтанзиноид DM4
29	XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174			3xМайтанзиноид DM4
30	XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175			9xМайтанзиноид DM4
31	1xLHRH-XTEN-3xПаклитаксел	Seg 174		1xLHRH	3xПаклитаксел

32	1xLHRH-XTEN-9xПаклитаксел	Seg 175		1xLHRH	9xПаклитаксел
33	3xLHRH-XTEN-3xПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xПаклитаксел
34	3xLHRH-XTEN-9xПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xПаклитаксел
35	XTEN-3xПаклитаксел	Seg 174			3xПаклитаксел
36	XTEN-9xПаклитаксел	Seg 175			9xПаклитаксел
37	1xLHRH-XTEN-3xSN-38	Seg 174		1xLHRH	3xSN-38
38	1xLHRH-XTEN-9xSN-38	Seg 175		1xLHRH	9xSN-38
39	3xLHRH-XTEN-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xSN-38
40	3xLHRH-XTEN-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xSN-38
41	XTEN-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
42	XTEN-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
43	1xLHRH-XTEN-3xГемцитабин	Seg 174		1xLHRH	3xГемцитабин
44	1xLHRH-XTEN-9xГемцитабин	Seg 175		1xLHRH	9xГемцитабин
45	3xLHRH-XTEN-3xГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xГемцитабин
46	3xLHRH-XTEN-9xГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xГемцитабин
47	XTEN-3xГемцитабин	Seg 174			3xГемцитабин
48	XTEN-9xГемцитабин	Seg 175			9xГемцитабин
49	1xLHRH-XTEN-3xКарбоплатин	Seg 174		1xLHRH	3xКарбоплатин
50	1xLHRH-XTEN-9xКарбоплатин	Seg 175		1xLHRH	9xКарбоплатин
51	3xLHRH-XTEN-3xКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xКарбоплатин
52	3xLHRH-XTEN-9xКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xКарбоплатин
53	XTEN-3xКарбоплатин	Seg 174			3xКарбоплатин
54	XTEN-9xКарбоплатин	Seg 175			9xКарбоплатин
55	1xLHRH-XTEN-Человеческая РНКза			1xLHRH	Человеческая РНКза
56	3xLHRH-XTEN-Человеческая РНКза			3xLHRH	Человеческая РНКза
57	1xLHRH-XTEN-Бычья РНКза			1xLHRH	Бычья РНКза
58	3xLHRH-XTEN-Бычья РНКза			3xLHRH	Бычья РНКза
59	1xLHRH-XTEN-Ранпирназа			1xLHRH	Ранпирназа



60	3xLHRH-XTEN-Ранпирназа			3xLHRH	Ранпирназа
61	1xLHRH-XTEN-Антивирусный белок лаконоса			1xLHRH	Антивирусный белок лаконоса
62	3xLHRH-XTEN-Антивирусный белок лаконоса			3xLHRH	Антивирусный белок лаконоса
63	1xфолат-XTEN-3xДокс	Seg 174		1xфолат	3xДоксорибицин
64	1xфолат-XTEN-9xДокс	Seg 175		1xфолат	9xДоксорибицин
65	3xфолат-XTEN-3xДокс	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xДоксорибицин
66	3xфолат-XTEN-9xДокс	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xДоксорибицин
67	XTEN-3xДокс	Seg 174			3xДоксорибицин
68	XTEN-9xДокс	Seg 175			9xДоксорибицин
69	1xфолат-XTEN-3xММАЕ	Seg 174		1xфолат	3xММАЕ
70	1xфолат-XTEN-9xММАЕ	Seg 175		1xфолат	9xММАЕ
71	3xфолат-XTEN-3xММАЕ	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xММАЕ
72	3xфолат-XTEN-9xММАЕ	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xММАЕ
73	XTEN-3xММАЕ	Seg 174			3xММАЕ
74	XTEN-9xММАЕ	Seg 175			9xММАЕ
75	1xфолат-XTEN-3xММАФ	Seg 174		1xфолат	3xММАФ
76	1xфолат-XTEN-9xММАФ	Seg 175		1xфолат	9xММАФ
77	3xфолат-XTEN-3xММАФ	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xММАФ
78	3xфолат-XTEN-9xММАФ	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xММАФ
79	XTEN-3xММАФ	Seg 174			3xММАФ
80	XTEN-9xММАФ	Seg 175			9xММАФ
81	1xфолат-XTEN-3xМертанзин	Seg 174		1xфолат	3xМертанзин
82	1xфолат-XTEN-9xМертанзин	Seg 175		1xфолат	9xМертанзин
83	3xфолат-XTEN-3xМертанзин	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xМертанзин
84	3xфолат-XTEN-9xМертанзин	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xМертанзин
85	XTEN-3xМертанзин	Seg 174			3xМертанзин
86	XTEN-9xМертанзин	Seg 175			9xМертанзин
87	1xфолат-XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174		1xфолат	3xМайтанзиноид DM4
88	1xфолат-XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175		1xфолат	9xМайтанзиноид DM4
89	3xфолат-XTEN-	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xМайтанзин

	3xМайтанзиноид DM4				иноид DM4
90	3xфолат-ХТЕН-9xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xМайтанзиноид DM4
91	ХТЕН-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174			3xМайтанзиноид DM4
92	ХТЕН-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175			9xМайтанзиноид DM4
93	1xфолат-ХТЕН-3xПаклитаксел	Seg 174		1xфолат	3xПаклитаксел
94	1xфолат-ХТЕН-9xПаклитаксел	Seg 175		1xфолат	9xПаклитаксел
95	3xфолат-ХТЕН-3xПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xПаклитаксел
96	3xфолат-ХТЕН-9xПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xПаклитаксел
97	ХТЕН-3xПаклитаксел	Seg 174			3xПаклитаксел
98	ХТЕН-9xПаклитаксел	Seg 175			9xПаклитаксел
99	1xфолат-ХТЕН-3xSN-38	Seg 174		1xфолат	3xSN-38
100	1xфолат-ХТЕН-9xSN-38	Seg 175		1xфолат	9xSN-38
101	3xфолат-ХТЕН-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xSN-38
102	3xфолат-ХТЕН-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xSN-38
103	ХТЕН-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
104	ХТЕН-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
105	1xфолат-ХТЕН-3xГемцитабин	Seg 174		1xфолат	3xГемцитабин
106	1xфолат-ХТЕН-9xГемцитабин	Seg 175		1xфолат	9xГемцитабин
107	3xфолат-ХТЕН-3xГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xГемцитабин
108	3xфолат-ХТЕН-9xГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xГемцитабин
109	ХТЕН-3xГемцитабин	Seg 174			3xГемцитабин
110	ХТЕН-9xГемцитабин	Seg 175			9xГемцитабин
111	1xфолат-ХТЕН-3xКарбоплатин	Seg 174		1xфолат	3xКарбоплатин
112	1xфолат-ХТЕН-9xКарбоплатин	Seg 175		1xфолат	9xКарбоплатин
113	3xфолат-ХТЕН-3xКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xКарбоплатин
114	3xфолат-ХТЕН-9xКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xКарбоплатин
115	ХТЕН-3xКарбоплатин	Seg 174			3xКарбоплатин
116	ХТЕН-9xКарбоплатин	Seg 175			9xКарбоплатин

				атин
117	1хокреотид-ХТЕН-3хДокс	Seg 174		1хокреотид 3хДоксору бицин
118	1хокреотид-ХТЕН-9хДокс	Seg 175		1хокреотид 9хДоксору бицин
119	3хокреотид-ХТЕН-3хДокс	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хДоксору бицин
120	3хокреотид-ХТЕН-9хДокс	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хДоксору бицин
121	ХТЕН-3хДокс	Seg 174		3хДоксору бицин
122	ХТЕН-9хДокс	Seg 175		9хДоксору бицин
123	1хокреотид-ХТЕН-3хММАЕ	Seg 174		1хокреотид 3хММАЕ
124	1хокреотид-ХТЕН-9хММАЕ	Seg 175		1хокреотид 9хММАЕ
125	3хокреотид-ХТЕН-3хММАЕ	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хММАЕ
126	3хокреотид-ХТЕН-9хММАЕ	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хММАЕ
127	ХТЕН-3хММАЕ	Seg 174		3хММАЕ
128	ХТЕН-9хММАЕ	Seg 175		9хММАЕ
129	1хокреотид-ХТЕН-3хММАФ	Seg 174		1хокреотид 3хММАФ
130	1хокреотид-ХТЕН-9хММАФ	Seg 175		1хокреотид 9хММАФ
131	3хокреотид-ХТЕН-3хММАФ	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хММАФ
132	3хокреотид-ХТЕН-9хММАФ	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хММАФ
133	ХТЕН-3хММАФ	Seg 174		3хММАФ
134	ХТЕН-9хММАФ	Seg 175		9хММАФ
135	1хокреотид-ХТЕН-3хМертанзин	Seg 174		1хокреотид 3хМертанзин
136	1хокреотид-ХТЕН-9хМертанзин	Seg 175		1хокреотид 9хМертанзин
137	3хокреотид-ХТЕН-3хМертанзин	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хМертанзин
138	3хокреотид-ХТЕН-9хМертанзин	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хМертанзин
139	ХТЕН-3хМертанзин	Seg 174		3хМертанзин
140	ХТЕН-9хМертанзин	Seg 175		9хМертанзин
141	1хокреотид-ХТЕН-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		1хокреотид 3хМайтанзиноид DM4
142	1хокреотид-ХТЕН-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175		1хокреотид 9хМайтанзиноид DM4
143	3хокреотид-ХТЕН-3хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хМайтанзиноид DM4
144	3хокреотид-ХТЕН-9хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хМайтанзиноид DM4
145	ХТЕН-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		3хМайтанзиноид

				DM4
146	ХТЕН-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175		9хМайтанзиноид DM4
147	1хокреотид-ХТЕН-3хПаклитаксел	Seg 174		1хокреотид 3хПаклитаксел
148	1хокреотид-ХТЕН-9хПаклитаксел	Seg 175		1хокреотид 9хПаклитаксел
149	3хокреотид-ХТЕН-3хПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хПаклитаксел
150	3хокреотид-ХТЕН-9хПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хПаклитаксел
151	ХТЕН-3хПаклитаксел	Seg 174		3хПаклитаксел
152	ХТЕН-9хПаклитаксел	Seg 175		9хПаклитаксел
153	1хокреотид-ХТЕН-3хSN-38	Seg 174		1хокреотид 3хSN-38
154	1хокреотид-ХТЕН-9хSN-38	Seg 175		1хокреотид 9хSN-38
155	3хокреотид-ХТЕН-3хSN-38	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хSN-38
156	3хокреотид-ХТЕН-9хSN-38	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хSN-38
157	ХТЕН-3хSN-38	Seg 174		3хSN-38
158	ХТЕН-9хSN-38	Seg 175		9хSN-38
159	1хокреотид-ХТЕН-3хГемцитабин	Seg 174		1хокреотид 3хГемцитабин
160	1хокреотид-ХТЕН-9хГемцитабин	Seg 175		1хокреотид 9хГемцитабин
161	3хокреотид-ХТЕН-3хГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хГемцитабин
162	3хокреотид-ХТЕН-9хГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хГемцитабин
163	ХТЕН-3хГемцитабин	Seg 174		3хГемцитабин
164	ХТЕН-9хГемцитабин	Seg 175		9хГемцитабин
165	1хокреотид-ХТЕН-3хКарбоплатин	Seg 174		1хокреотид 3хКарбоплатин
166	1хокреотид-ХТЕН-9хКарбоплатин	Seg 175		1хокреотид 9хКарбоплатин
167	3хокреотид-ХТЕН-3хКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хКарбоплатин
168	3хокреотид-ХТЕН-9хКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3хокреотид 9хКарбоплатин
169	ХТЕН-3хКарбоплатин	Seg 174		3хКарбоплатин
170	ХТЕН-9хКарбоплатин	Seg 175		9хКарбоплатин
171	1хокреотид-ХТЕН-3хЭверолимус	Seg 174		1хокреотид 3хЭверолимус
172	1хокреотид-ХТЕН-9хЭверолимус	Seg 175		1хокреотид 9хЭверолимус
173	3хокреотид-ХТЕН-3хЭверолимус	Seg 176	Seg 176	3хокреотид 3хЭверолимус

174	3хкреотид-ХТЕН-9хЭверолимус	Seg 176	Seg 177	3хкреотид	9хЭверолимус
175	ХТЕН-3хЭверолимус	Seg 174			3хЭверолимус
176	ХТЕН-9хЭверолимус	Seg 175			9хЭверолимус
177	1хпасиреотид-ХТЕН-3хДокс	Seg 174		1хпасиреотид	3хДоксорибицин
178	1хпасиреотид-ХТЕН-9хДокс	Seg 175		1хпасиреотид	9хДоксорибицин
179	3хпасиреотид-ХТЕН-3хДокс	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хДоксорибицин
180	3хпасиреотид-ХТЕН-9хДокс	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хДоксорибицин
181	ХТЕН-3хДокс	Seg 174			3хДоксорибицин
182	ХТЕН-9хДокс	Seg 175			9хДоксорибицин
183	1хпасиреотид-ХТЕН-3хММАЕ	Seg 174		1хпасиреотид	3хММАЕ
184	1хпасиреотид-ХТЕН-9хММАЕ	Seg 175		1хпасиреотид	9хММАЕ
185	3хпасиреотид-ХТЕН-3хММАЕ	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хММАЕ
186	3хпасиреотид-ХТЕН-9хММАЕ	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хММАЕ
187	ХТЕН-3хММАЕ	Seg 174			3хММАЕ
188	ХТЕН-9хММАЕ	Seg 175			9хММАЕ
189	1хпасиреотид-ХТЕН-3хММАФ	Seg 174		1хпасиреотид	3хММАФ
190	1хпасиреотид-ХТЕН-9хММАФ	Seg 175		1хпасиреотид	9хММАФ
191	3хпасиреотид-ХТЕН-3хММАФ	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хММАФ
192	3хпасиреотид-ХТЕН-9хММАФ	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хММАФ
193	ХТЕН-3хММАФ	Seg 174			3хММАФ
194	ХТЕН-9хММАФ	Seg 175			9хММАФ
195	1хпасиреотид-ХТЕН-3хМертанзин	Seg 174		1хпасиреотид	3хМертанзин
196	1хпасиреотид-ХТЕН-9хМертанзин	Seg 175		1хпасиреотид	9хМертанзин
197	3хпасиреотид-ХТЕН-3хМертанзин	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хМертанзин
198	3хпасиреотид-ХТЕН-9хМертанзин	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хМертанзин
199	ХТЕН-3хМертанзин	Seg 174			3хМертанзин
200	ХТЕН-9хМертанзин	Seg 175			9хМертанзин
201	1хпасиреотид-ХТЕН-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		1хпасиреотид	3хМайтанзиноид DM4
202	1хпасиреотид-ХТЕН-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175		1хпасиреотид	9хМайтанзиноид DM4
203	3хпасиреотид-ХТЕН-3хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хМайтанзиноид DM4

204	3хпасиреотид-ХТЕН-9хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хМайтанзиноид DM4
205	-ХТЕН-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174			3хМайтанзиноид DM4
206	-ХТЕН-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175			9хМайтанзиноид DM4
207	1хпасиреотид-ХТЕН-3хПаклитаксел	Seg 174		1хпасиреотид	3хПаклитаксел
208	1хпасиреотид-ХТЕН-9хПаклитаксел	Seg 175		1хпасиреотид	9хПаклитаксел
209	3хпасиреотид-ХТЕН-3хПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хПаклитаксел
210	3хпасиреотид-ХТЕН-9хПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хПаклитаксел
211	ХТЕН-3хПаклитаксел	Seg 174			3хПаклитаксел
212	ХТЕН-9хПаклитаксел	Seg 175			9хПаклитаксел
213	1хпасиреотид-ХТЕН-3хSN-38	Seg 174		1хпасиреотид	3хSN-38
214	1хпасиреотид-ХТЕН-9хSN-38	Seg 175		1хпасиреотид	9хSN-38
215	3хпасиреотид-ХТЕН-3хSN-38	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хSN-38
216	3хпасиреотид-ХТЕН-9хSN-38	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хSN-38
217	ХТЕН-3хSN-38	Seg 174			3хSN-38
218	ХТЕН-9хSN-38	Seg 175			9хSN-38
219	1хпасиреотид-ХТЕН-3хГемцитабин	Seg 174		1хпасиреотид	3хГемцитабин
220	1хпасиреотид-ХТЕН-9хГемцитабин	Seg 175		1хпасиреотид	9хГемцитабин
221	3хпасиреотид-ХТЕН-3хГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хГемцитабин
222	3хпасиреотид-ХТЕН-9хГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хГемцитабин
223	-ХТЕН-3хГемцитабин	Seg 174			3хГемцитабин
224	-ХТЕН-9хГемцитабин	Seg 175			9хГемцитабин
225	1хпасиреотид-ХТЕН-3хКарбоплатин	Seg 174		1хпасиреотид	3хКарбоплатин
226	1хпасиреотид-ХТЕН-9хКарбоплатин	Seg 175		1хпасиреотид	9хКарбоплатин
227	3хпасиреотид-ХТЕН-3хКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хКарбоплатин
228	3хпасиреотид-ХТЕН-9хКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хКарбоплатин
229	-ХТЕН-3хКарбоплатин	Seg 174			3хКарбоплатин
230	-ХТЕН-9хКарбоплатин	Seg 175			9хКарбоплатин
231	1хпасиреотид-ХТЕН-	Seg 174		1хпасиреотид	3хЭвероли

	3хЭверолимус				мус
232	1хпасиреотид-ХТЕН-9хЭверолимус	Seg 175		1хпасиреотид	9хЭверолимус
233	3хпасиреотид-ХТЕН-3хЭверолимус	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хЭверолимус
234	3хпасиреотид-ХТЕН-9хЭверолимус	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хЭверолимус
235	ХТЕН-3хЭверолимус	Seg 174			3хЭверолимус
236	ХТЕН-9хЭверолимус	Seg 175			9хЭверолимус
237	1хбомбезин-ХТЕН-3хДокс	Seg 174		1хбомбезин	3хДоксорибицин
238	1хбомбезин-ХТЕН-9хДокс	Seg 175		1хбомбезин	9хДоксорибицин
239	3хбомбезин-ХТЕН-3хДокс	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хДоксорибицин
240	3хбомбезин-ХТЕН-9хДокс	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хДоксорибицин
241	ХТЕН-3хДокс	Seg 174			3хДоксорибицин
242	ХТЕН-9хДокс	Seg 175			9хДоксорибицин
243	1хбомбезин-ХТЕН-3хММАЕ	Seg 174		1хбомбезин	3хММАЕ
244	1хбомбезин-ХТЕН-9хММАЕ	Seg 175		1хбомбезин	9хММАЕ
245	3хбомбезин-ХТЕН-3хММАЕ	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хММАЕ
246	3хбомбезин-ХТЕН-9хММАЕ	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хММАЕ
247	ХТЕН-3хММАЕ	Seg 174			3хММАЕ
248	ХТЕН-9хММАЕ	Seg 175			9хММАЕ
249	1хбомбезин-ХТЕН-3хММАФ	Seg 174		1хбомбезин	3хММАФ
250	1хбомбезин-ХТЕН-9хММАФ	Seg 175		1хбомбезин	9хММАФ
251	3хбомбезин-ХТЕН-3хММАФ	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хММАФ
252	3хбомбезин-ХТЕН-9хММАФ	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хММАФ
253	ХТЕН-3хММАФ	Seg 174			3хММАФ
254	ХТЕН-9хММАФ	Seg 175			9хММАФ
255	1хбомбезин-ХТЕН-3хМерганзин	Seg 174		1хбомбезин	3хМерганзин
256	1хбомбезин-ХТЕН-9хМерганзин	Seg 175		1хбомбезин	9хМерганзин
257	3хбомбезин-ХТЕН-3хМерганзин	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хМерганзин
258	3хбомбезин-ХТЕН-9хМерганзин	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хМерганзин
259	ХТЕН-3хМерганзин	Seg 174			3хМерганзин
260	ХТЕН-9хМерганзин	Seg 175			9хМерганзин
261	1хбомбезин-ХТЕН-3хМайганзиноид DM4	Seg 174		1хбомбезин	3хМайганзиноид DM4
262	1хбомбезин-ХТЕН-	Seg 175		1хбомбезин	9хМайганз

	9xМайтанзиноид DM4				иноид DM4
263	3xбомбезин-ХТЕН-3xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3xбомбезин	3xМайтанзиноид DM4
264	3xбомбезин-ХТЕН-9xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3xбомбезин	9xМайтанзиноид DM4
265	ХТЕН-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174			3xМайтанзиноид DM4
266	ХТЕН-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175			9xМайтанзиноид DM4
267	1xбомбезин-ХТЕН-3xПаклитаксел	Seg 174		1xбомбезин	3xПаклитаксел
268	1xбомбезин-ХТЕН-9xПаклитаксел	Seg 175		1xбомбезин	9xПаклитаксел
269	3xбомбезин-ХТЕН-3xПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3xбомбезин	3xПаклитаксел
270	3xбомбезин-ХТЕН-9xПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3xбомбезин	9xПаклитаксел
271	ХТЕН-3xПаклитаксел	Seg 174			3xПаклитаксел
272	ХТЕН-9xПаклитаксел	Seg 175			9xПаклитаксел
273	1xбомбезин-ХТЕН-3xSN-38	Seg 174		1xбомбезин	3xSN-38
274	1xбомбезин-ХТЕН-9xSN-38	Seg 175		1xбомбезин	9xSN-38
275	3xбомбезин-ХТЕН-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3xбомбезин	3xSN-38
276	3xбомбезин-ХТЕН-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3xбомбезин	9xSN-38
277	ХТЕН-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
278	ХТЕН-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
279	1xбомбезин-ХТЕН-3xГемцитабин	Seg 174		1xбомбезин	3xГемцитабин
280	1xбомбезин-ХТЕН-9xГемцитабин	Seg 175		1xбомбезин	9xГемцитабин
281	3xбомбезин-ХТЕН-3xГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3xбомбезин	3xГемцитабин
282	3xбомбезин-ХТЕН-9xГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3xбомбезин	9xГемцитабин
283	ХТЕН-3xГемцитабин	Seg 174			3xГемцитабин
284	ХТЕН-9xГемцитабин	Seg 175			9xГемцитабин
285	1xбомбезин-ХТЕН-3xКарбоплатин	Seg 174		1xбомбезин	3xКарбоплатин
286	1xбомбезин-ХТЕН-9xКарбоплатин	Seg 175		1xбомбезин	9xКарбоплатин
287	3xбомбезин-ХТЕН-3xКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3xбомбезин	3xКарбоплатин
288	3xбомбезин-ХТЕН-9xКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3xбомбезин	9xКарбоплатин
289	ХТЕН-3xКарбоплатин	Seg 174			3xКарбоплатин
290	ХТЕН-9xКарбоплатин	Seg 175			9xКарбоплатин

\* 1x, 3x, 9x обозначает количество указанных компонентов, соединенных с ХТЕН,

\*\* обозначает последовательность ХТЕН из табл. 3; например Seg 174,

\*\*\* монометил ауристатин E,

\*\*\*\* монометил ауристатин F.

#### V). Фармацевтические композиции.

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, являющиеся предметом изобретения. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит конъюгат, выбранный из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в табл. 21, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит конъюгат, содержащий, по меньшей мере, первую последовательность ХТЕН, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 2 и 3, при этом последовательности ХТЕН данной композиции являются в основном гомогенными по длине, ХТЕН соединен, по меньшей мере, с первым



нагрузочным веществом, выбранным из группы нагрузочных веществ, приведенных в табл. 11, 12, 18, 19 и 21, а композиция дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество из любого описанного в данном тексте варианта реализации и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий этап соединения конъюгационной композиции, соответствующей вариантам реализации изобретения, по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтически приемлемый состав. Конъюгаты ХТЕН-нагрузочное вещество, являющиеся объектами настоящего изобретения, можно получить согласно известным способам получения фармацевтически используемых композиций, при этом конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество смешан с фармацевтически приемлемым носителем, таким как водные растворы или буферы, фармацевтически приемлемые суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей включают пропилэтиленгликоль, полиэтиленгликоль и растительные масла. Фармацевтические составы готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего необходимую степень очистки, с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами и стабилизаторами, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтические композиции можно вводить любыми подходящими средствами или способами, в том числе подкожно, подкожно при помощи инфузионного насоса, внутримышечно и внутривенно. Очевидно, что предпочтительный способ будет зависеть от заболевания и возраста пациента, а также от сложности состояния, лечение которого проводится. Осмотические насосы можно использовать в качестве средств медленного высвобождения в форме таблеток, пилюль, капсул или имплантируемых устройств. Также в качестве средств медленного высвобождения можно использовать шприцевые насосы. Подобные устройства описаны в патентах США №№ 4976696; 4933185; 5017378; 6309370; 6254573; 4435173; 4398908; 6572585; 5298022; 5176502; 5492534; 5318540 и 4988337, содержание которых включено в данный текст посредством ссылки. Специалист в данной области, приняв во внимание содержание данного изобретения и содержание указанных патентов, может изготовить шприцевой насос для пролонгированного высвобождения композиций, являющихся объектами настоящего изобретения. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат ХТЕН-нагрузочное вещество из любого описанного в данном тексте варианта реализации для применения в получении медикаментов, пригодных для лечения болезненных состояний, включая, но не ограничиваясь этим, заболевания, приведенные в табл. 16.

#### VI). Способы лечения.

В изобретении предложен способ лечения заболевания у пациента, включающий введение эффективного количества конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество из любого из вышеприведенных вариантов реализации нуждающемуся в этом пациенту. В одном варианте реализации изобретения ХТЕН-нагрузочное вещество содержит один тип нагрузочного вещества, выбранного из табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В другом варианте реализации изобретения ХТЕН-нагрузочное вещество содержит два типа нагрузочных веществ, выбранных из табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В другом варианте реализации изобретения ХТЕН-нагрузочное вещество содержит два типа нагрузочных веществ, при этом одно нагрузочное вещество выбрано из табл. 11, 12 и 18, а второе нагрузочное вещество является нацеленным компонентом с аффинностью связывания к мишени из табл. 20 или является нацеленным компонентом из любой из табл. 18, 19 или 21. В другом варианте реализации изобретения ХТЕН-нагрузочное вещество содержит более чем три типа нагрузочных веществ, выбранных из табл. 11, 12, 18, 19 и 21. В данном способе для нагрузочного вещества конъюгата известно, что оно оказывает положительный эффект или обладает аффинностью к мишени, связанной с заболеванием, при введении пациенту с определенным заболеванием или болезненным состоянием. В одном варианте реализации изобретения нагрузочное вещество(а) композиции опосредует ее терапевтический эффект через общие биологические реакции. В вышеприведенных вариантах реализации, которые описаны в этом параграфе, данный способ применим для облегчения или предотвращения заболевания, выбранного из рака, заместительной терапии рака, кардиоваскулярных заболеваний, заболеваний центральной нервной системы, эндокринных заболеваний, заболеваний желудочно-кишечного тракта, урогенитальных заболеваний, гематологических заболеваний, ВИЧ-инфекции, заболеваний гормональной системы, воспалений, аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний, нарушений обмена веществ, скелетно-мышечных нарушений, нефрологических нарушений, офтальмологических заболеваний, боли и респираторных заболеваний. С большей долей определенности заболевание выбрано из табл. 16.

В некоторых вариантах реализации способа лечения конъюгационную композицию можно вводить подкожно, внутримышечно или внутривенно. В одном варианте реализации изобретения композицию вводят в терапевтически эффективном количестве. В одном варианте реализации изобретения введение двух или более последовательных доз терапевтически эффективного количества препарата приводит к выигрышу во времени, проведенном в пределах терапевтического окна для данной композиции, по сравнению с нагрузочным веществом, не соединенным с ХТЕН и вводимым пациенту в сравнимых дозах. Выигрыш во времени, проведенном в пределах терапевтического окна, может, по меньшей мере, трех-

кратно превышать время для немодифицированного нагрузочного вещества, или, в альтернативном варианте, быть по меньшей мере в четыре раза, или в пять раз, или в шесть раз, или в семь раз, или в восемь раз, или в девять раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в около 30 раз, или по меньшей мере около 50 раз, или по меньшей мере около 100 раз большим, чем для нагрузочного вещества, не соединенного с XTEN.

В одном варианте реализации способа лечения нуждающемуся в этом пациенту вводят меньшее количество (в моль/кг) конъюгата или фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, которое является приблизительно в два раза меньшим, или в три раза меньшим, или приблизительно в четыре раза меньшим, или приблизительно в пять раз меньшим, или приблизительно в шесть раз меньшим, или приблизительно в восемь раз меньшим, или приблизительно в 10 раз меньшим или еще более меньшим по сравнению с соответствующим нагрузочным веществом(ами), не соединенным с XTEN, в режиме дозирования, необходимом для поддержания терапевтического эффекта, и конъюгат при этом характеризуется площадью под кривой, сравнимой с соответствующим количеством (в моль/кг) нагрузочного вещества(в), не соединенного с XTEN, необходимого для поддержания терапевтического эффекта. В другом варианте реализации изобретения для конъюгата или фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, требуется менее частое введение в ходе стандартного лечения пациента, при этом дозу конъюгата или фармацевтической композиции вводят пациенту приблизительно каждые четыре дня, приблизительно каждые семь дней, приблизительно каждые 10 дней, приблизительно каждые 14 дней, приблизительно каждые 21 день или приблизительно раз в месяц, а конъюгат при этом характеризуется площадью под кривой, сравнимой с соответствующим нагрузочным веществом(ами), не соединенным с XTEN и вводимым пациенту. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят количество конъюгата, в совокупности составляющее приблизительно на 5%, или приблизительно на 10%, или приблизительно на 20%, или приблизительно на 40%, или приблизительно на 50%, или приблизительно на 60%, или приблизительно на 70%, или приблизительно на 80%, или приблизительно на 90% меньше (в моль/кг) по сравнению с соответствующим количеством нагрузочного вещества(в), не соединенного с XTEN, в режиме дозирования, необходимом для поддержания эффективной концентрации в крови, при этом конъюгат характеризуется площадью под кривой, по меньшей мере, сравнимой с соответствующим нагрузочным веществом(ами), не соединенным с XTEN. В совокупности меньшее количество является мерой, происходящей на период, составляющий по меньшей мере около одной недели, или около 14 дней, или около 21 дня, или около месяца. В некоторых вариантах реализации способа терапевтический эффект является определяемым параметром, клиническим симптомом или конечным результатом, который, как известно в данной области, связан с первопричиной заболевания пациента, которому следует провести лечение или профилактику.

В одном варианте реализации в изобретении предложен способ лечения раковой клетки *in vitro*, включающий введение в культуру раковых клеток композиции, содержащей эффективное количество композиции XTEN-нагрузочное вещество, в которой первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, а второе нагрузочное вещество является токсином из табл. 21. В другом варианте реализации в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество композиции XTEN-нагрузочное вещество, в которой первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, а второе нагрузочное вещество является токсином из табл. 21. В одном варианте реализации данного способа фармацевтическая композиция содержит композицию, имеющую структуру, приведенную на фиг. 117. В другом варианте реализации данного способа рак выбран из группы, состоящей из мелкоклеточного рака легких или мезотелиомы, рака яичников, устойчивого к лечению препаратами платины, рака эндометрия, аденокарциномы легких и трудно поддающихся лечению опухолей на поздних стадиях. В другом варианте реализации данного способа введение препарата приводит по меньшей мере к 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 90% улучшению по меньшей мере одного, двух или трех параметров, связанных с раком, по сравнению с пациентом, для которого не проводили лечение, при этом параметры выбраны из группы, состоящей из уровня ответа, определяемого по критериям оценки ответа при солидных опухолях (RECIST), времени до прогрессирования рака (рецидива), обнаружения местного рецидива, обнаружения регионарного метастаза, обнаружения отдаленного метастаза, появления симптомов, госпитализации, увеличения необходимости в обезболивающих средствах, необходимости в резервной химиотерапии, необходимости в хирургическом вмешательстве по жизненным показаниям, необходимости в резервной радиотерапии, времени до констатации отсутствия эффекта терапии и увеличения времени жизни.

В другом аспекте реализации в изобретении предложена схема лечения пациента с заболеванием, при этом указанная схема включает применение композиции, содержащей конъюгат из любого из описанных в данном тексте вариантов реализации. В одном варианте реализации данная схема дополнительно включает этап определения количества фармацевтической композиции, содержащей CFXTEN, которое необходимо для достижения терапевтического эффекта у пациента.

В изобретении предложены конъюгаты, включенные в схему лечения пациентов с заболеванием, включающую введение фармацевтической композиции, содержащей конъюгат из любого из описанных в

данном тексте вариантов реализации, в количестве двух или более последовательных доз, вводимых в эффективном количестве, при этом введение приводит к улучшению по меньшей мере одного параметра, связанного с заболеванием.

VII). Наборы для конъюгации.

В другом аспекте реализации в изобретении предложен набор, который облегчает применение конъюгационных композиций ХТЕН-кросс-линкер. В одном варианте реализации изобретения данный набор содержит ХТЕН-кросс-линкер в составе препарата, контейнер и этикетку на контейнере или имеющую отношение к контейнеру. В вышеприведенном варианте реализации ХТЕН-кросс-линкер может принадлежать любому из описанных в данном тексте вариантов реализации. ХТЕН-кросс-линкер находится в контейнере в определенной концентрации в буфере, подходящем для применения в реакции конъюгации для соединения с нагрузочным веществом.

VIII). Фармацевтические наборы.

В другом аспекте реализации в изобретении предложен набор, который облегчает применение конъюгационных композиций. Данный набор содержит предлагаемую в данном изобретении фармацевтическую композицию, контейнер и этикетку или вкладыш на контейнере или имеющие отношение к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д., изготовленные из разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит фармацевтическую композицию в виде препарата, который является эффективным для лечения пациента, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет или флакон для внутривенного раствора, содержащий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). На вкладыше могут быть перечислены утвержденные показания для лекарственного вещества, инструкции по растворению и/или введению лекарственного вещества для применения в рамках утвержденных показаний, соответствующие дозировки и информация по безопасности, а также информация, указывающая номер партии и срок годности лекарственного вещества. В другом варианте реализации вышесказанного набор может содержать второй контейнер, в котором находится подходящий растворитель для фармацевтической композиции, применение которого обеспечит соответствующую концентрацию препарата для введения пациенту. В другом варианте реализации набор содержит, по меньшей мере, в первом контейнере лекарственное вещество конъюгационной композиции в количестве, достаточном для введения при лечении пациента с заболеванием; некоторое количество фармацевтически приемлемого носителя; второй контейнер, в котором может находиться подходящий растворитель для указанной композиции, который обеспечит соответствующую концентрацию фармацевтической композиции для введения пациенту; вместе с этикеткой, на которой указаны название лекарственного вещества, а также условия хранения и обращения с ним, и/или листок с утвержденными показаниями для лекарственного вещества и инструкциями по растворению и/или введению лекарственного вещества для применения в рамках утвержденных показаний, соответствующими дозировками и информацией по безопасности, а также информацией, указывающей номер партии и срок годности лекарственного вещества.

IX). Нуклеотидные последовательности, являющиеся объектами данного изобретения.

В настоящем изобретении предложены выделенные полинуклеиновые кислоты, кодирующие полипептидные компоненты конъюгатов, и последовательности, комплементарные к молекулам полинуклеиновых кислот, кодирующие полипептидные компоненты конъюгатов. В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены полинуклеиновые кислоты, кодирующие ХТЕН из любого описанного в данном тексте варианта реализации конъюгатов, либо комплементы полинуклеиновых кислот. В одном варианте реализации изобретения полинуклеиновые кислоты кодируют ХТЕН, выбранный из группы, состоящей из ХТЕН, приведенных в табл. 2 и 3, либо комплементы полинуклеиновых кислот. В других вариантах реализации в изобретении предложены полинуклеиновые кислоты, кодирующие ХТЕН, соединенные с последовательностями расщепления, аффинными маркерами и белками вспомогательных последовательностей из любых описанных в данном тексте вариантов реализации, либо комплементы полинуклеиновых кислот. В одном варианте реализации изобретения полинуклеиновые кислоты кодируют нагрузочный белок, выбранный из группы, состоящей из нагрузочных белков, приведенных в табл. 7, 18, 19 и 21, либо комплементы полинуклеиновых кислот.

В одном варианте реализации изобретение включает в себя способы получения полинуклеиновых кислот, кодирующих ХТЕН и ХТЕН, соединенные с расщепляемыми последовательностями, аффинными маркерами и белками вспомогательных последовательностей, или последовательности, комплементарные полинуклеиновым кислотам, включая их гомологичные варианты. В общем случае и как проиллюстрировано на фиг. 38 и 39, способы получения полинуклеиновых кислот, кодирующих ХТЕН и экспрессирующих конечный генный продукт, включают сборку нуклеотидов, кодирующих ХТЕН, лигирование компонентов в рамку, инкорпорацию кодирующего гена в экспрессионный вектор, подходящий для клетки-хозяина, трансформацию клетки-хозяина при помощи экспрессионного вектора и культивирование клетки-хозяина в условиях, которые стимулируют или способствуют экспрессии ХТЕН в трансформированной клетке-хозяине, что дает возможность получить полипептид ХТЕН, который выделяют описанными в данном тексте методами или стандартными методами очистки белка, известными в данной области. Для получения полинуклеотидов и экспрессионных векторов, являющихся объектами настоя-

шего изобретения, применяют стандартные рекомбинантные технологии молекулярной биологии.

В соответствии с изобретением нуклеотидные последовательности, которые кодируют ХТЕН и ХТЕН, соединенные с последовательностями расщепления, аффинными маркерами и белками вспомогательных последовательностей (либо их комплементы), применяют для создания рекомбинантных молекул ДНК, которые управляют экспрессией в подходящих клетках-хозяевах. Для осуществления настоящего изобретения подходят несколько технологий клонирования, многие из которых применяются для создания конструкции, которая содержит ген, кодирующий композицию ХТЕН или нагрузочных веществ, являющихся объектами настоящего изобретения, либо их комплемент. В одном варианте реализации такая технология клонирования используется для того, чтобы создать ген, который кодирует ХТЕН, который содержит нуклеотиды, кодирующие ХТЕН, который используется для трансформации клетки-хозяина для экспрессии композиции ХТЕН. В приведенных выше в данном параграфе вариантах реализации указанные гены могут дополнительно содержать нуклеотиды, кодирующие расщепляемые последовательности, аффинные маркеры и вспомогательные последовательности. В другом варианте реализации такая технология клонирования используется для того, чтобы создать ген, который кодирует нагрузочный белок, который содержит нуклеотиды, кодирующие нагрузочное вещество, которое используется для трансформации клетки-хозяина для экспрессии композиции нагрузочного вещества.

При конструировании необходимых последовательностей ХТЕН было обнаружено, что несмотря на использование подхода молекулярного конструирования "блочного типа" в создании кодирующих ХТЕН последовательностей, можно получить неповторяющиеся структуры композиций ХТЕН, являющихся объектами данного изобретения. Это было достигнуто при помощи библиотеки полинуклеотидов, кодирующих мотивы из пептидных последовательностей, которые описаны выше и которые затем лигируются и/или мультимеризуются для создания генов, кодирующих последовательности ХТЕН (см. фиг. 38 и 39 и примеры). Таким образом, из-за того, что ХТЕН экспрессируемого полипептида может содержать множественные единицы только четырех различных мотивов последовательности, так как мотивы сами по себе состоят из неповторяющихся аминокислотных последовательностей, полная последовательность ХТЕН получается неповторяющейся. Соответственно, в одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды, кодирующие ХТЕН, содержат множественные полинуклеотиды, которые кодируют неповторяющиеся последовательности, или мотивы, функционально связанные в рамке, и для которых результирующие экспрессируемые аминокислотные последовательности ХТЕН являются неповторяющимися.

В одном из подходов сначала готовят конструкцию, содержащую последовательность ДНК, соответствующую ХТЕН. Примеры способов получения таких конструкций описаны в примерах. Затем конструкцию используют для создания экспрессионного вектора, подходящего для трансформации клетки-хозяина, такой как прокариотическая клетка-хозяин (например, *E. coli*), для экспрессии и выделения ХТЕН. Примеры способов создания экспрессионных векторов, трансформации клеток-хозяев и экспрессии и выделения ХТЕН описаны в примерах. Ген, кодирующий ХТЕН, можно получить в один или несколько этапов, как полностью искусственно, так и при помощи синтеза в комбинации с ферментативными процессами, например клонирования, опосредованного рестрикционными ферментами и ПЦР с перекрывающимися праймерами, включая способы, более полно описанные в примерах. Способы, раскрытые в данном тексте, можно применять, например, для того, чтобы лигировать короткие последовательности полинуклеотидов, кодирующих ХТЕН, в более длинные гены ХТЕН, обладающие необходимой длиной и последовательностью. В одном варианте реализации изобретения данным способом лигируют две, три, четыре или более кодон-оптимизированных олигонуклеотидов, кодирующих мотив ХТЕН или сегмент последовательности длиной от около 9 до 14 аминокислот, или от около 12 до 20 аминокислот, или от около 18 до 36 аминокислот, или от около 48 до около 144 аминокислот, или от около 144 до около 288 или более аминокислот, либо любые комбинации вышеприведенных диапазонов длин мотивов или сегментов. В альтернативном варианте раскрываемый способ применяют для мультимеризации последовательностей, кодирующих ХТЕН, в более длинные последовательности необходимой длины; например ген, кодирующий 36 аминокислот ХТЕН, можно димеризировать в ген, кодирующий 72 аминокислоты, затем 144, затем 288 и т.д. Даже в случае мультимеризации полипептиды ХТЕН можно сконструировать так, чтобы кодирующий ХТЕН ген обладал низкой или фактически отсутствующей повторяемостью в конструкции кодонов, выбранных в качестве мотивов для наиболее коротких используемых единиц, что может снизить рекомбинацию и повысить стабильность кодирующего гена в трансформированном хозяйском организме. Гены, кодирующие ХТЕН с неповторяющимися последовательностями, собирают из олигонуклеотидов при помощи стандартных технологий или генного синтеза. Конструкцию гена можно подобрать при помощи алгоритмов, которые оптимизируют использование кодонов и аминокислотный состав. В одном из способов данного изобретения создают, а затем собирают библиотеку относительно коротких кодирующих ХТЕН полинуклеотидных конструкций, как описано выше. Полученные в результате гены затем совмещают с генами, кодирующими нагрузочный пептид или полипептид, а результирующие гены применяют для трансформации клетки-хозяина и получения и выделения конъюгата ХТЕН-нагрузочное вещество для того, чтобы оценить его свойства, как описано в данном тексте.

Полученные в результате полинуклеотиды, кодирующие ХТЕН и пептидные последовательности, к

которым он присоединен, затем могут быть отдельно клонированы в экспрессионные векторы. Нуклеотидную последовательность можно вносить в вектор при помощи большого количества разных способов. В общем случае ДНК вносят в подходящий участок(ки) расщепления рестрикционными эндонуклеазами при помощи известных в данной области методов. Векторные компоненты в общем случае включают, но не ограничиваются этим, одну или более сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. В конструировании подходящих векторов, содержащих один или более из этих компонентов, используются стандартные методы лигирования, которые известны специалисту в данной области. Такие методы хорошо известны в данной области и детально описаны в научной литературе и патентах. Большое количество векторов являются общедоступными. Векторы могут, например, быть в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага, которые удобно подвергать процедурам рекомбинантных ДНК-технологий, а выбор вектора часто зависит от клетки-хозяина, в которую его необходимо внести. Таким образом, вектор может являться автономно реплицирующимся вектором, т.е., вектором, который существует в виде экстрахромосомного компонента, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например, плазмидой. В альтернативном варианте вектор может являться таким, который при внесении в клетку-хозяина интегрируется в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он интегрировался. Типичные плазмиды проиллюстрированы на фиг. 17 вместе с изображениями кодирующих областей для разных конфигураций компонентов Ф VIII и ХТЕН. В изобретении предложено применение плазмидных экспрессионных векторов, содержащих репликационные и контрольные последовательности, которые совместимы и распознаются клеткой-хозяином, и являются функционально связанными с геном, кодирующим полипептид для контролируемой экспрессии полипептида. Как правило, вектор содержит участок репликации, а также последовательности, которые кодируют белки, способные обеспечить фенотипическую селекцию в трансформированной клетке. Существование таких векторных последовательностей хорошо известно для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Подходящие для применения экспрессионные векторы включают, например, сегменты хромосомных, внехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Термин "экспрессионный вектор" относится к конструкции ДНК, содержащей последовательность ДНК, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию ДНК, кодирующей полипептид, в подходящей клетке-хозяине. Требования к векторам заключаются в их способности реплицироваться и жизнеспособности в выбранной клетке-хозяине. При необходимости можно использовать небольшое либо большое число векторных копий. Подходящие векторы включают, но не ограничиваются этим, производные SV40 и пкДНК и известные бактериальные плазмиды, такие как col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, как описано у Smith, et al., *Gene* 57:31-40 (1988), pMB9 и его производные, плазмиды, такие как RP4, фаговые ДНК, такие как многочисленные производные фага I, такие как NM989, а также другие фаговые ДНК, такие как M13 и филаментные одноцепочечные фаговые ДНК; дрожжевые плазмиды, такие как 2-микронные плазмиды или производные 2-мкм плазмид, а также центромерные и интегративные дрожжевые шаттл-векторы; векторы, подходящие для эукариотических клеток, такие как векторы, применяемые в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, такие как плазмиды, которые были модифицированы так, чтобы содержать фаговую ДНК или экспрессионные контрольные последовательности; и тому подобное. Дрожжевые экспрессионные системы, которые также можно применять в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, негибридный вектор pYES2 (Invitrogen), гибридные pYESHisA, B, C (Invitrogen), векторы pRS и тому подобные. Контрольные последовательности вектора содержат промотор для инициации транскрипции, произвольную операторную последовательность для управления такой транскрипцией, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосомы мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Промотор может представлять собой любую последовательность ДНК, которая проявляет транскрипционную активность в клетке-хозяине, и может быть получена из генов, кодирующих белки, гомологичные или гетерологичные клетке-хозяину. Промоторы, подходящие для применения в экспрессионных векторах для прокариотических клеток, включают промоторные системы  $\beta$ -лактамазы и лактозы [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], щелочную фосфатазу, промоторную систему триптофана (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776] гибридные промоторы, такие как промотор tac [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)], все функционально связанные с ДНК, кодирующей полипептиды CFXTEN. Промоторы для применения в бактериальных системах могут также содержать последовательность Шайна-Дальгарно (Ш.Д.), функционально связанную с ДНК, кодирующей полипептиды CFXTEN.

#### Примеры

Пример 1. Конструирование сегментов мотива ХТЕН\_AD36.

Следующий пример описывает конструирование набора кодон-оптимизированных генов, кодирующих последовательности мотива из 36 аминокислот. На первом этапе на основе вектора pET конструировали спейсерный вектор pCW0359, который содержит промотор T7.

pCW0359 кодирует целлюлозосвязывающий домен (CBD - от англ. "cellulose binding domain") и

сайт распознавания TEV-протеазы, за которым располагается спейсерная последовательность, фланкируемая сайтами BsaI, BbsI и KpnI. Сайты BsaI и BbsI вставляли таким образом, чтобы после расщепления они могли образовывать совместимые "липкие" концы. За спейсерной последовательностью следует процессированная версия гена GFP и His-маркер. Спейсерная последовательность содержит стоп-кодона и, таким образом, клетки E. Coli, несущие спейсерную плазмиду pCW0359, образуют нефлуоресцентные колонии. Спейсерный вектор pCW0359 расщепляли при помощи BsaI и KpnI для того, чтобы удалить спейсерный сегмент, а полученный в результате векторный фрагмент выделяли при помощи очистки в агарозном геле. Последовательности обозначали как XTEN\_AD36, что отражает их принадлежность к семейству мотивов AD. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность [X]<sub>3</sub>, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GESPGGSSGSES, GSEGSSGPGESS, GSSES-GSSEGGP или GSGGEPSESGSS. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AD1for: AGGTGAATCTCCDGGTGGYTCYAGCGGTTTCYGARTC

AD1rev: ACCTGAYTCRGAACCGCTRGARCCACCHGGAGATTC

AD2for: AGGTAGCGAAGGTTCTTCYGGTCCDGGYGARTCYTC

AD2rev: ACCTGARGAYTCRCHGGACCRGAAGAACCCTTCGCT

AD3for: AGGTTCYTCYGAAAGCGGTTCTTCYGARGGYGGTCC

AD3rev: ACCTGGACCRCCYTCRGAAGAACCGCTTTCRGARGA

AD4for: AGGTTCYGGTGGYGAACCDTCYGARTCTGGTAGCTC

Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr\_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0401, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN\_AD36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN\_AD36 имеют хорошие уровни экспрессии.

Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0401 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 39 клонов, которые содержали надлежащие сегменты XTEN\_AD36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в табл. 22.

## ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0401_001_GFP-N_A01.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGTGGCTCTAGCGGTTCC GAGTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTCCAGCGGT TCCGAGTCA
LCW0401_002_GFP-N_B01.ab1	GSEGSSPGESSGESPPGG SSGSESGSSESGSSEGGP	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGCGAGTCT TCAGGTGAATCTCCTGGTGGTCCAGCGGTTCT GAATCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAG GGCGGTCCA
LCW0401_003_GFP-N_C01.ab1	GSSESGSSEGGPGSSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGT CCAGGTTCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGT GGTCCAGGTGAATCTCCGGTGGCTCCAGCGGT TCCGAGTCA
LCW0401_004_GFP-N_D01.ab1	GSGGEPSESGSSGSSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCGGTGGCGAACCGTCTGAATCTGGTAGC TCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGT GGTCCAGGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_007_GFP-N_F01.ab1	GSSESGSSEGGPGSESS GPGESSGSESGSGPGESE	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGT CCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAG TCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGT GAATCTTCA
LCW0401_008_GFP-N_G01.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGSESGSESGSGPGESE	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGT CCAGGTGAATCTCCAGGTGGTCCAGCGGTTCT GAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGT GAATCTTCA
LCW0401_012_GFP-N_H01.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSESGSGPGESE	GGTTCGGTGGTGAACCGTCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGT AGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGT GAGTCTTCA
LCW0401_015_GFP-N_A02.ab1	GSSESGSSEGGPGSESS GPGESSGESPPGGSSGSES	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGT CCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAA TCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGT TCTGAGTCA
LCW0401_016_GFP-N_B02.ab1	GSSESGSSEGGPGSSSESG SSEGGPGSSSESGSSEGGP	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGT CCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGC GGTCCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAG GGCGGTCCA
LCW0401_020_GFP-N_E02.ab1	GSGGEPSESGSSGSESS GPGESSGSSESGSSEGGP	GGTTCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAA TCTTCAGGTTCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAG GGCGGTCCA
LCW0401_022_GFP-N_F02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGT GGTCCAGGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_024_GFP-N_G02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGT GGTCCAGGTGAATCTCCAGGTGGTCTAGCGGT TCTGAATCA
LCW0401_026_GFP-N_H02.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPGG SSGSESGSESGSGPGESE	GGTTCGGTGGCGAACCGTCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCT GAATCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGT GAATCTTCA
LCW0401_027_GFP-N_A03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPPGG SSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGTGGTCTAGCGGTTCT GAGTCAGGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_028_GFP-N_B03.ab1	GSSESGSSEGGPGSSSESG SSEGGPGSSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGT CCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGC GGTCCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAA

		GGCGGTCCA
LCW0401_030_ GFP-N_C03.ab1	GESPGGSSGSESGSEGSS GPGESSGSESGSGPGESE	GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAG TCAGGTAGCGAAGGTTCTCCGGTCCGGGTGAG TCCTCAGGTAGCGAAGGTTCTCCGGTCTGGT GAGTCTTCA
LCW0401_031_ GFP-N_D03.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSESGSSEGGP	GGTTCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGT AGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTCCGAG GGCGGTCCA
LCW0401_033_ GFP-N_E03.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSGGEPSESGSS	GGTTCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGT AGCTCAGGTTCCGGTGGTGAACCATCCGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_037_ GFP-N_F03.ab1	GSGGEPSESGSSGSESG SSEGGPGSESGSGPGESE	GGTTCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGC TCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGC GGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGC GAGTCTTCA
LCW0401_038_ GFP-N_G03.ab1	GSGGEPSESGSSGSESG GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTTCGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGTGAG TCTTCAGGTTCTGGTGGCGAACCTCCGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_039_ GFP-N_H03.ab1	GSGGEPSESGSSGSPGG SSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCTGGTGGTCCAGCGGTTCC GAGTCAGGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_040_ GFP-N_A04.ab1	GSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSESGSSEGGP	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTCCGAGGGCGGT CCAGGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAATCTGGT AGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAA GGTGGTCCA
LCW0401_042_ GFP-N_C04.ab1	GSESGSPGESSGSPGG SSGSESGSESGSGPGESE	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCTGGTGGTCT TCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTTAGCGGTTCC GAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGC GAGTCTTCA
LCW0401_046_ GFP-N_D04.ab1	GSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTTCTGAAAGCGGTTCTCCGAAAGCGGT CCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGC GGTCCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAG GGTGGTCCA
LCW0401_047_ GFP-N_E04.ab1	GSGGEPSESGSSGSPGG SSGSESGSPGGSSGSES	GGTTCGGTGGCGAACCTTCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGTGGTCTTAGCGGTTCC GAGTCAGGTGAATCTCCGGTGGTCCAGCGGT TCTGAGTCA
LCW0401_051_ GFP-N_F04.ab1	GSGGEPSESGSSGSESG GPGESSGESPGSSGSES	GGTTCGGTGGCGAACCATCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTCCGGTCCAGGCGAG TCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTCCAGCGGT TCTGAGTCA
LCW0401_053_ GFP-N_H04.ab1	GESPGSSGSESGSPGG SSGSESGSPGGSSGSES	GGTGAATCTCCTGGTGGTCCAGCGGTTCCGAG TCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTTAGCGGTTCC GAGTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTCTAGCGGT TCTGAATCA
LCW0401_054_ GFP-N_A05.ab1	GSESGSPGESSGSESG GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAATCT TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGTGAA TCTTCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCTGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_059_ GFP-N_D05.ab1	GSGGEPSESGSSGSESG GPGESSGESPGSSGSES	GGTTCGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGCGAA TCTTCAGGTGAATCTCCAGGTGGTCTAGCGGT TCCGAATCA
LCW0401_060_	GSGGEPSESGSSGSESG	GGTTCGGTGGTGAACCTCCGAATCTGGTAGC



GFP-N_E05.ab1	SSEGGPGSGGEPSESGSS	TCAGGTTCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGT GGTCCAGGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_061_ GFP-N_F05.ab1	GSSEGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGSSESGPGESE	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGT CCAGGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGT AGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGT GAATCTTCA
LCW0401_063_ GFP-N_H05.ab1	GSGGEPSESGSSGSESS GPGESSGSEGSSESGPGESE	GGTTCCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGCGAG TCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCTGGT GAATCTTCA
LCW0401_066_ GFP-N_B06.ab1	GSGGEPSESGSSGSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCTGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGC GGTCCAGGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_067_ GFP-N_C06.ab1	GSGGEPSESGSSGSESPGG SSGSESGESPGGSSGSESE	GGTTCGGTGGCGAACCTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGTGGTCTAGCGGTTCC GAATCAGGTGAATCTCCAGGTGGTCTAGCGGT TCCGAATCA
LCW0401_069_ GFP-N_D06.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSESPGGSSGSESE	GGTTCGGTGGTGAACCATCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGT AGCTCAGGTGAATCTCCGGTGGTCCAGCGGT TCCGAATCA
LCW0401_070_ GFP-N_E06.ab1	GSESSSPGESSGSESG SSEGGPGSEGSSESGPGESE	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGCGCAATCC TCAGGTTCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGT GGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCTGGT GAATCTTCA
LCW0401_078_ GFP-N_F06.ab1	GSSEGSSEGGPGSESPGG SSGSESGESPGGSSGSESE	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGT CCAGGTGAATCTCCGGTGGTCCAGCGGTTCT GAATCAGGTGAATCTTCTGGTGGTCCAGCGGT TCCGAGTCA
LCW0401_079_ GFP-N_G06.ab1	GSESSSPGESSGSESG GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAGTCT TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCTGGCGAG TCTTCAGGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCT GGTAGCTCA

#### Пример 2. Конструирование сегментов XTEN\_AE36.

Конструировали библиотеку кодонов, кодирующих последовательности XTEN длиной в 36 аминокислот. Последовательность XTEN обозначали как XTEN\_AE36. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность  $[X]_3$ , где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GSPAGSPTSTEE, GSEPATSGSE TP, GTSESA TPESGP или GTSTEPSEGSAP. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AE1for: AGGTAGCCCDGCWGGYTCTCCDACYTCYACYGARGA  
 AE1rev: ACCTTCYTCRGTARGTRGARGTHGGAGARCCWCHGGGCT  
 AE2for: AGGTAGCGAACCKGCWACYTCYGGYTCTGARACYCC  
 AE2rev: ACCTGGRGTYTCAGARCCRGARGTWGCMGGTTCGCT  
 AE3for: AGGTACYTCTGAAAGCGCWACYCCKGARTCYGGYCC  
 AE3rev: ACCTGGRCCRGAYTCMGGRTWGCCTTTTCAGARGT  
 AE4for: AGGTACYTCTACYGAACCKTCYGARGGYAGCGCWCC  
 AE4rev: ACCTGGWGCCTRCCYTCRGAMGGTTCRGTAGARGT

Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr\_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что привело к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0402, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN\_AE36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN\_AE36 демонстрируют хорошую экспрессию.

Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0402 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 37 клонов, которые содержали надлежащие сегменты XTEN\_AE36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в табл. 23.

## ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0402_002_ GFP-N_A07.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGG AAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGG CCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGC GCACCA
LCW0402_003_ GFP-N_B07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTC CAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGC TCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_004_ GFP-N_C07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGCAC CAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCCGG TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCT GGCCCA
LCW0402_005_ GFP-N_D07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGG CCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCA
LCW0402_006_ GFP-N_E07.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCC CAGGTACTTCTGAAAGCGTACTCCTGAATCCGG CCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACT GAGGAA
LCW0402_008_ GFP-N_F07.ab1	GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGAC TCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_009_ GFP-N_G07.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGG AAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGA AGAAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGCTCTGAA ACTCCA
LCW0402_011_	GSPAGSPTSTEEGTSESA	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGG

GFP-N_A08.ab1	TPESGPGTSTEPSEGSAP	AAGGTA CT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGG TCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC GCTCCA
LCW0402_012_ GFP-N_B08.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAG GAAGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCG CTCCA
LCW0402_013_ GFP-N_C08.ab1	GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGTC CAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGC TCCAGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCG CTCCA
LCW0402_014_ GFP-N_D08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTC CAGGTAGCCCGCAGGTTCTCTACTTCCACTGA GGAAGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGC GCACCA
LCW0402_015_ GFP-N_E08.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTC CAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCCCGA AGAAGTACCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCT GGCCCA
LCW0402_016_ GFP-N_F08.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGG CCCAGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCC GGTCCA
LCW0402_020_ GFP-N_G08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCAC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAAC CCCAGGTAGCCAGCAGGTTCTCCAACTTCTACTG AAGAA
LCW0402_023_ GFP-N_A09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAG AAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG CCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAA ACCCCA
LCW0402_024_ GFP-N_B09.ab1	GTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCC CAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGA GGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCAAACCTTCTACT GAAGAA
LCW0402_025_ GFP-N_C09.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGG TCCAGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_026_ GFP-N_D09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACCGAGG AAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGC TCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAA ACCCCA
LCW0402_027_ GFP-N_E09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGG AAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC ACCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCA
LCW0402_032_ GFP-N_H09.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCGGAGTCTGG TCCAGGTAGCCCTGCAGGTTCTCCTACCTCCACTG AGGAA
LCW0402_034_ GFP-N_A10.ab1	GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCC CAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGC TCCAGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_036_ GFP-N_C10.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGG AAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGC TCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCTCCA

LCW0402_039_ GFP-N_E10.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTC CAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_040_ GFP-N_F10.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTACCTCCACCGA CCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA
LCW0402_041_ GFP-N_G10.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCAC CAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCTACCTCCACCGA GGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGC GCACCA
LCW0402_050_ GFP-N_A11.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGG CCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAA ACCCCA
LCW0402_051_ GFP-N_B11.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACTTCCGGCTCTGAAACCC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGG CCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAA ACCCCA
LCW0402_059_ GFP-N_E11.ab1	GSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTC CAGGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAAC CCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCACCA
LCW0402_060_ GFP-N_F11.ab1	GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTCTGAAAC CCCAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAA ACTCCA
LCW0402_061_ GFP-N_G11.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGP	GGTACCTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTC CAGGTACCTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGC ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCC GGTCCA
LCW0402_065_ GFP-N_A12.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGG TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCC GGTCCA
LCW0402_066_ GFP-N_B12.ab1	GSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCTACTCCTCCGGCTCTGAAACTC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAAC TCCAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGC GCACCA
LCW0402_067_ GFP-N_C12.ab1	GSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTCTGAAACTCC AGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCT CCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAA CTCCA
LCW0402_069_ GFP-N_D12.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	GGTACCTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCAC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGC TCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAA ACTCCA
LCW0402_073_ GFP-N_F12.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCC AGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTCTGAAACC CCAGGTAGCCCAGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCG AGGAA
LCW0402_074_ GFP-N_G12.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTC CAGGTAGCCCAGCTGGTTCTCCAACCTTACTGA GGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAATCT GGTCCA
LCW0402_075_ GFP-N_H12.ab1	GTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGP	GGTACTTCTGAAAGCGCAACTCTGAGTCTGGCC CAGGTAGCGAACCTGCTACTCCTCCGGCTCTGAGAC TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCT GGTCCA

### Пример 3. Конструирование сегментов XTEN\_AF36.

Конструировали библиотеку кодонов, кодирующих последовательности длиной в 36 аминокислот. Последовательности обозначали как XTEN\_AF36. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность [X]<sub>3</sub>, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GSTSESPSGTAP, GTSTPESGSASP, GTSPSGESSTAP или GSTSSTAESPGP. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AF1for: AGGTTCTACYAGCGAATCYCCKTCTGGYACYGCWCC  
 AF1rev: ACCTGGWGCRGTRCCAGAMGGRGATTCGCTRGTAGA  
 AF2for: AGGTACYTCTACYCCKGAAAGCGGYTCYGCWTCTCC  
 AF2rev: ACCTGGAGAWGCRGARCCGCTTTCMGGRGTAGARGT  
 AF3for: AGGTACYTCYCKAGCGGYGAATCTTCTACYGCWCC  
 AF3rev: ACCTGGWGCRGTAGAAGATTCRCCGCTMGGRGARGT  
 AF4for: AGGTTCTACYAGCTCTACYGCWGAATCTCCKGGYCC  
 AF4rev: ACCTGGRCCMGGAGATTCWGCRTAGAGCTRGTRGA

Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr\_3KpnIstopperRev:

ССТCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0403, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN\_AF36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN\_AF36 демонстрируют хорошую экспрессию.

Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0403 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 44 клон, которые содержали надлежащие сегменты XTEN\_AF36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в табл. 24.

Таблица 24

## ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0403_004_GFP-N_A01.ab1	GTSTPESGSASPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC CAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCT CCA

LCW0403_005_ GFP-N_B01.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSST AESP GPGTSPSGESSTAP	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACC AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCC CAGGTTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCT CCA
LCW0403_006_ GFP-N_C01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCC AGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC CAGGTTACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGCTTCT CCA
LCW0403_007_ GFP-N_D01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG AESP GPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGT CCAGGTTACTCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGC ACCA
LCW0403_008_ GFP-N_E01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTC CAGGTACCTTACTCCGAAAGCGGTCTGCATCT CCA
LCW0403_010_ GFP-N_F01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGSTSESPGTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCC AGGTACCTTACTCCGAAAGCGGCTCTGCATCT CCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGC ACCA
LCW0403_011_ GFP-N_G01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTACTTCTACTCCGAAAGCGGCTCTGCATCT CCAGGTTACTTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATC TCCA
LCW0403_012_ GFP-N_H01.ab1	GSTSESPGTAPGTSPSG ESSTAPGTSESPGTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCCTCC AGGTACTTCTCCTAGCGCGAATCTTCTACCGCTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCA CCA
LCW0403_013_ GFP-N_A02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG AESP GPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCC CAGGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGT CCAGGTTACTTCTCCTAGCGCGAATCTTCTACCGC TCCA
LCW0403_014_ GFP-N_B02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGSTSESPGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCTGCATCTC CAGGTTCTACCAGCGAATCCCGTCTGGCACCGC ACCA
LCW0403_015_ GFP-N_C02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG AESP GPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCC AGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTC CAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCT ACCA
LCW0403_017_ GFP-N_D02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCGTCTGGCACCGCA CCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGG TCCA
LCW0403_018_ GFP-N_E02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG AESP GPGTSPSGAESP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTC CAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGT CCA
LCW0403_019_ GFP-N_F02.ab1	GSTSESPGTAPGSTSST AESP GPGTSPSGAESP	GGTTCTACTAGCGAATCCCTTCTGGTACTGCTCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCC CAGGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGT CCA
LCW0403_023_ GFP-N_H02.ab1	GSTSESPGTAPGSTSESP SGTAPGSTSESPGTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCGTCTGGTACTGCTC CAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGTACTGCA CCA
LCW0403_024_ GFP-N_A03.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG AESP GPGTSPSGAESP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCC CAGGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGT

		CCA
LCW0403_025_ GFP-N_B03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCC AGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTC CAGGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCT CCA
LCW0403_028_ GFP-N_D03.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCGGCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGCTCTC CAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCC CCA
LCW0403_029_ GFP-N_E03.ab1	GTSPSGESSTAPGTSTPE SGSASPGSTSSTAESPGP	GGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCC AGGTACCTCTACTCCGAAAGCGGCTCCGCATCT CCAGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGG TCCA
LCW0403_030_ GFP-N_F03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCC AGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCC CAGGTACTTCTACTCCGAAAGCGGTTCCGCTTCT CCA
LCW0403_031_ GFP-N_G03.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSST AESPGPGTSTPESGSASP	GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCC AGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCC CAGGTACTTCTACCCCGAAAGCGGCTCCGCTTCT CCA
LCW0403_033_ GFP-N_H03.ab1	GSTSEPSGTAPGSTSST AESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCACC AGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCC CAGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGT CCA
LCW0403_035_ GFP-N_A04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCAC CAGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGG CCCA
LCW0403_036_ GFP-N_B04.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCC AGGTACTTCCCAGCGGTGAATCTTCTACTGCAC CAGGTACTTCTACTCCGAAAGCGGTTCCGCTTCT CCA
LCW0403_039_ GFP-N_C04.ab1	GSTSEPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCCTCC AGGTTCTACTAGCGAATCCCCTCTGGTACCGCA CCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC ACCA
LCW0403_041_ GFP-N_D04.ab1	GSTSEPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCACA CCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTC TCCA
LCW0403_044_ GFP-N_E04.ab1	GTSTPESGSASPGSTSST AESPGPGSTSSTAESPGP	GGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGC CCAGGTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGG CCCA
LCW0403_046_ GFP-N_F04.ab1	GSTSEPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACC AGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCAC CAGGTACTTCTCCGAGCGGCGAATCTTCTACTGCT CCA
LCW0403_047_ GFP-N_G04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGC CCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGC TCCA
LCW0403_049_ GFP-N_H04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTC CAGGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCATCT CCA
LCW0403_051_ GFP-N_I04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCC

GFP-N_A05.ab1	AESPGPGSTSESPSGTAP	AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCT CCA
LCW0403_053_ GFP-N_B05.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACC AGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTC CAGGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGG TCCA
LCW0403_054_ GFP-N_C05.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTGCTGGTACTGCTCC AGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC CAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGG TCCA
LCW0403_057_ GFP-N_D05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACC CCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGC ACCA
LCW0403_058_ GFP-N_E05.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACC AGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACC CCAGGTACTTACCGCTGAAAGCGGTTCCGCTTC TCCA
LCW0403_060_ GFP-N_F05.ab1	GTSTPESGSASPSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCGAAAGCGGTTCCGCATCTCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCCTGTCGGCACC CCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGG CCCCA
LCW0403_063_ GFP-N_G05.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCC AGGTACTTCTCTAGCGGTGAATCTTCTACCCTC CAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCCT CCA
LCW0403_064_ GFP-N_H05.ab1	GTSPSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCC AGGTACTTCTCTAGCGGCGAATCTTCTACCCTC CAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCCT CCA
LCW0403_065_ GFP-N_A06.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTACTTCTACTCCGAAAGCGGTTCCGCTTCTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACC ACCA
LCW0403_066_ GFP-N_B06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCTCC AGGTACTTCTCTAGCGGTGAATCTTCTACCCTC CAGGTACTTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCCT CCA
LCW0403_067_ GFP-N_C06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPSTSESPSGP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCC AGGTACTTCTACCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTC CAGGTTCCACTAGCTCTACCCTGAAATCTCCGGG CCA
LCW0403_068_ GFP-N_D06.ab1	GSTSSTAESPGPGSTST AESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACCAGCTCTACCCTGAAATCTCCGCTCC CAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACC ACCA
LCW0403_069_ GFP-N_E06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTGCTGGTACCGCACC AGGTACTTCTACCCTGAAAGCGGCTCTGCTTCTC CAGGTACTTCTACCCTGAAAGCGGCTCCGCATC TCCA
LCW0403_070_ GFP-N_F06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTGCTGGTACTGCTCC AGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTC CAGGTACTTCTACCCTGAAAGCGGTTCTGCATCT CCA

#### Пример 4. Конструирование сегментов XTEN\_AG36.

Конструировали библиотеку кодонов, кодирующих последовательности длиной в 36 аминокислот. Последовательности обозначали как XTEN\_AG36. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность [X]<sub>3</sub>, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями GTPGSGTASSSP, GSSTPSGATGSP, GSSPSASTGTGP или GASPSTSTGSP. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AG1for: AGGTACYCCKGGYAGCGGTACYGCWTCTCTCTCC  
AG1rev: ACCTGGAGARGAAGAWGCRGTACCGCTRCCMGRGT  
AG2for: AGGTAGCTCTACYCCKTCTGGTGCWACYGGYTCYCC  
AG2rev: ACCTGGRGARCCRGTWGCACCAGAMGGRGTAGAGCT  
AG3for: AGGTTCTAGCCCKTCTGCWTCYACYGGTACYGGYCC  
AG3rev: ACCTGGRCCRGTAACCRGTRGAWGCAGAMGGGCTAGA  
AG4for: AGGTGCWTCYCKGGYACYAGCTCTACYGGTCTCC  
AG4rev: ACCTGGAGAACCRGTAGAGCTRRCMMGGRGAWGC

Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCTGTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr\_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библио-



теки, обозначенных как LCW0404, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN\_AG36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN\_AG36 демонстрируют хорошую экспрессию.

Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0404 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 44 клона, которые содержали надлежащие сегменты XTEN\_AG36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в табл. 25.

Таблица 25

ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0404_001_GFP-N_A07.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTA CTCTGGTAGCGGTA CTGCTTCTTCTCTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_003_GFP-N_B07.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCC AGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTC CAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_006_GFP-N_C07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCGGGTA CTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCC

		CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCC CCA
LCW0404_007_ GFP-N_D07.ab1	GTPGSGTASSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCGGGCAGCGGACTGCTTCTTCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGTTCCC CAGGTGCATCCCCTGGTACTAGCTCTACCCGGTTCT CCA
LCW0404_009_ GFP-N_E07.ab1	GTPGSGTASSPGASPGT SSTGSPGSRPSASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGACTGCTTCTTCTCTCC AGGTGCTTCCCTGGTACCAGCTCTACCCGGTTCTC CAGGTCTTAGACCTTCTGCATCCACCCGGTACTGGT CCA
LCW0404_011_ GFP-N_F07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCCGGTTCTCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTC CAGGTGCTTCCCCGGTACCAGCTCTACCCGGTTCT CCA
LCW0404_012_ GFP-N_G07.ab1	GTPGSGTASSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTACCCCGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCCGGTTCCC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCCGGTCTC CCCA
LCW0404_014_ GFP-N_H07.ab1	GASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTGCATCCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTTCTC CAGGTGCTTCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_015_ GFP-N_A08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCCGGTCCCC AGGTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCC CAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_016_ GFP-N_B08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCCGGTTCCCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCC CAGGTACTCCGGGCAGCGGACTGCTTCTTCTCTCT CCA
LCW0404_017_ GFP-N_C08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCCGGTCCCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTCCC CAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCCGGTTCT CCA
LCW0404_018_ GFP-N_D08.ab1	GTPGSGTASSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCTCTCTCC AGGTCTAGCCCTTCTGCATCTACCCGGTACCCGGTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_023_ GFP-N_F08.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCCGGTTCTCC AGGTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCC CAGGTACTCCGGGCAGCGGACTGCTTCTTCTCTCT CCA
LCW0404_025_ GFP-N_G08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCCGGTCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCCGGTCCC CAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_029_ GFP-N_A09.ab1	GTPGSGTASSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTC CAGGTCTTAGCCCGTCTGCATCTACCCGGTACCCGGC CCA
LCW0404_030_ GFP-N_B09.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACCCGGTCCCC AGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCT CCAGGTACTCCGGGTAGCGGACTGCTTCTTCTTCTC TCCA
LCW0404_031_ GFP-N_C09.ab1	GTPGSGTASSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACCCCGGTAGCGGACTGCTTCTTCTCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCCGGTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACCCGGTTCT CCA

LCW0404_034_ GFP-N_D09.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCC CCAGGTGCATCCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCT TCCA
LCW0404_035_ GFP-N_E09.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTTCTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCT CCA
LCW0404_036_ GFP-N_F09.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSP	GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACCGGTAAGTGGCCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCC CAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCT CCA
LCW0404_037_ GFP-N_G09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTC CAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCT CCA
LCW0404_040_ GFP-N_H09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_041_ GFP-N_A10.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSP	GGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGCTCTGGTGCTACCGGTTCTC CAGGTACCCCGGTAGCGGTACCGCATCTTCTTCT CCA
LCW0404_043_ GFP-N_C10.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTAAGTGGCCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCT CCA
LCW0404_045_ GFP-N_D10.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSA STGTGPGSSTPSASTGTGP	GGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTAAGTGGTC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGTACTGGT CCA
LCW0404_047_ GFP-N_F10.ab1	GTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCC AGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_048_ GFP-N_G10.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCC AGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_049_ GFP-N_H10.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCC AGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTCTCTC CAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_050_ GFP-N_A11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_051_ GFP-N_B11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGCTCT CCA
LCW0404_052_ GFP-N_C11.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTACTCCTGGCAGCGGTACTGCATCTTCTCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_053_ GFP-N_D11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSA STGTGPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCGTCTGCATCCACTGGTACCGGTC CAGGTGCTTCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCT

		CCA
LCW0404_057_ GFP-N_E11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGP	GGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTTACTGGT CCA
LCW0404_060_ GFP-N_F11.ab1	GTPGSGTASSPSGSSTPS GATGSPGASPGTSSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCC CAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_062_ GFP-N_G11.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSPSGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCC AGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTC CAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCC CCA
LCW0404_066_ GFP-N_H11.ab1	GSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCC AGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTTACTGGTC CAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_067_ GFP-N_A12.ab1	GTPGSGTASSPSGSSTPS GATGSPGNSPSASTGTGP	GGTACCCCGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTTCTAACCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGC CCA
LCW0404_068_ GFP-N_B12.ab1	GSSPSASTGTGPGSSSTPS GATGSPGASPGTSSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_069_ GFP-N_C12.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCC AGGTGCATCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTC CAGGTACTCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTCTCT CCA
LCW0404_070_ GFP-N_D12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCC CAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGCTCT CCA
LCW0404_073_ GFP-N_E12.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSG TASSPSGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCTGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCTCTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCC CCA
LCW0404_075_ GFP-N_F12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCCCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTC CAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCTACTGGTACTGGT CCA
LCW0404_080_ GFP-N_G12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGP	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACTGGTACTGGTC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACTGGT CCA
LCW0404_081_ GFP-N_H12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACTGGTACTGGTC CAGGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCTCTCT CCA

#### Пример 5. Конструирование XTEN\_AE864.

XTEN\_AE864 конструировали путем последовательной димеризации XTEN\_AE36 в AE72, 144, 288, 576 и 864. Набор сегментов XTEN\_AE72 конструировали из 37 разных сегментов XTEN\_AE36. Культуры *E. Coli*, содержащие все 37 разных 36-аминокислотных сегментов, смешивали и выделяли плазмиду. Пул плазмид расщепляли при помощи *BsaI/NcoI* для образования небольшого фрагмента для вставки. Тот же самый пул плазмид расщепляли при помощи *BbsI/NcoI* для получения крупного фрагмента для вектора. Вставочный и векторный фрагменты лигировали, что приводило к удвоению длины, а лигационную смесь трансформировали в клетки BL21Gold(DE3) для того, чтобы получить колонии XTEN\_AE72. Данную библиотеку сегментов XTEN\_AE72 обозначали как LCW0406. Все клоны из LCW0406 снова комбинировали и димеризовали при помощи того же процесса, который описан выше, чтобы получить библиотеку LCW0410 из XTEN\_AE144. Все клоны из LCW0410 снова комбинировали и димеризовали при помощи того же процесса, который описан выше, чтобы получить библиотеку LCW0414 из XTEN\_AE288. Из библиотеки случайным способом выбирали два изолята LCW0414.001 и LCW0414.002 и секвенировали их, чтобы подтвердить их идентичность. Все клоны из LCW0414 снова комбинировали и димеризовали при помощи того же процесса, который описан выше, чтобы получить библиотеку LCW0418 из XTEN\_AE576. Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0418 на предмет высокого уровня флуоресценции GFP. Секвенировали 8 изолятов со вставками надлежащих размеров согласно данным ПЦР и высокой флуоресценцией и отбирали на будущее 2 изолята (LCW0418.018 и LCW0418.052) на основе данных секвенирования и экспрессии.

Конструировали отдельный клон rCW0432 XTEN\_AE864 путем комбинирования LCW0418.018 XTEN\_AE576 и LCW0414.002 XTEN\_AE288 при помощи того же димеризационного процесса, который описан выше.

#### Пример 6. Конструирование XTEN\_AG864.

Используя несколько последовательных этапов димеризации создавали набор последовательностей

XTEN\_AG864, начиная с сегментов XTEN\_AD36, приведенных в примере 1. Эти последовательности создавали так, как описано в примере 3. Проводили оценку нескольких изолятов XTEN\_AG864, для которых было обнаружено, что они характеризуются хорошей экспрессией и превосходной растворимостью в физиологических условиях. Полноразмерный клон XTEN\_AG864 обладает превосходной растворимостью и демонстрирует период полувыведения, превышающий 60 ч для яванских макак.

Пример 7. Конструирование CBD-XTEN-Cys, цистеин-сконструированного XTEN.

Участок цистеина (CysIsland), кодирующий аминокислотную последовательность GGSPAGSCTSP, содержащую один цистеин, посредством отжига олиго вносили в вектор CBD-спейсер-GFP для получения CBD-CysIsland-GFP, где CysIsland фланкируется рестрикционными сайтами BsaI и BbsI. Вектор CBD-спейсер-GFP представляет собой производное pET30 от Novagen с сайтом узнавания TEV-протеазы между CBD и спейсером. Конструкции предварительно создавали путем замещения спейсера в векторе CBD-спейсер-GFP генами, кодирующими XTEN\_AE288 и XTEN\_AE576. Плазмиду CBD-XTEN\_AE288-GFP расщепляли при помощи BsaI/NcoI для образования небольшого фрагмента для вставки. Плазмиду CBD-CysIsland-GFP расщепляли при помощи BbsI/NcoI для получения крупного фрагмента для вектора. Вставочный и векторный фрагменты лигировали, а лигационную смесь электропорировали в клетки BL21-Gold (DE3) для того, чтобы получить трансформанты CBD-CysIsland-XTEN\_AE288-GFP. Аналогично, плазмиду CBD-CysIsland-XTEN\_AE288-GFP расщепляли при помощи BsaI/NcoI для образования небольшого фрагмента для вставки. Плазмиду CBD-XTEN\_AE576-GFP расщепляли при помощи BbsI/NcoI для получения крупного фрагмента для вектора. Вставочный и векторный фрагменты лигировали, а лигационную смесь электропорировали в клетки BL21-Gold (DE3) для того, чтобы получить трансформанты CBD-XTEN\_AE576-CysIsland-XTEN\_AE288-GFP. Наконец, плазмиду CBD-XTEN\_AE576-CysIsland-XTEN\_AE288-GFP расщепляли при помощи BbsI/HindIII для того, чтобы удалить GFP, и лигировали с отоженными олиго для стоп-кодона, а лигационную смесь электропорировали в клетки BL21-Gold (DE3) для того, чтобы получить трансформанты CBD-XTEN\_AE576-CysIsland-XTEN\_AE288, которые содержат ДНК и кодируемые аминокислотные последовательности, которые приведены в табл. 26. Можно создавать дополнительные конструкции с цистеинами, вставленными в различные участки последовательности XTEN, при помощи выбора подходящих для данных участков рестрикционных сайтов, включая множественные вставки. Данный способ также можно использовать для создания лизин-сконструированного XTEN при помощи замещения в олигонуклеотидах кодонов, которые кодируют цистеин, кодонами, кодирующими лизин.

Таблица 26

ДНК- и аминокислотные последовательности для Cys-сконструированного XTEN

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
<b>CBD-TEV-AE576-CysIsland-AE288</b>	ATGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGA ATTCTACAACAGCAATCCTTCAGATACTACTAACTCAAT CAATCCTCAGTTCAAGGTTACTAATACCGGAAGCAGTG CAATTGATTTGTCCAAACTCACATTGAGATATTATTATA CAGTAGACGGACAGAAAGATCAGACSTTCTGGGCTGAC CATGCTGCAATAATCGGCAGTAACGGCAGCTACAACGG AATTACTTCAAATGTAAGGAACATTTGTAATAATGA GTTCTTCAACAAATAACGCAGACACSTACTTGAATC AGCTTACAGGCGGAACCTTGAACCGGGTGCACATGT TCAGATACAAGGTAGATTTGCAAAGAATGACTGGAGTA ACTATACACAGTCAAATGACTACTCATTCAAGTCTGCTT CACAGTTTGTGAATGGGATCAGGTAACAGCATACTTG AACGGTGTCTTGTATGGGGTAAAGAACCCGGTGGCAG TGTAGTAGGTTCAAGTTCAAGGATCCGAAAATCTGTATTT TCAGGGTGGGTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTA CCTTACTGAGGAAGGTAATCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAGTCTGGTCCAGGTACTTACTGAACCGTCCGAAGG TAGCGCTCCAGGTAGCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCA CTGAGGAAGGTAATCTTACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCACCAGGTACTTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCGGAATCTGGCC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCGAACCGGCTACTCCTCGGTTCTGAAACTCAGG TAGCCCGGCGAGGCTCTCCGACTTACTGAGGAAGGTA CTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCAGGTACC TCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTC TACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCAG CAGGTTCTCTACTCCTCCAGGAGGTAAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACTTACTGA	MANTPVSGLNKFVEFY NSNPSDITTSINPQFK VTNTGSSAIDLKLTTL RYYTVDGQKQDTF WADHAAIIGNSNGSYN GITSNVKGTFFVKMSS STNNADTYLEISFTGG TLEPGAHVQIQGRFA KNDWSNYTQSNDSYS FKSASQFVEVDQVTA YLNGLVWVKPEGG SVVGSAGSENLYFQ GGSPGSPAGSPTSTEE GTSEATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSE

ACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTA CTACTTCTGAAAGCG CTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTA CTACTTCTGAAACCG TCCGAAGGTAGCGCACCAGGTA CTACTTCTGAAAGCGCAAC CCCTGAATCCGGTCCAGGTA GCGAACCCGGCTACTTCTG GCTCTGAGACTCCAGGTA CTACTTCTACCGAACCCGTCGAA GGTAGCGCACCAGGTA CTACTTCTGAAACCGTCTGAAAGG TAGCGCACCAGGTA CTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAAT CCGGCCAGGTA CTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCAGGTA CTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGACTCCACCGA AGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCC CAGGTA GCGAACCCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCAGG TACCTCTACTGAAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTA CTTCTACTGAAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTA CT TCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTA CTCT TACTGAACTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTA CTCTA CCGAACCTTCTGAAAGGTAGCGCACCAGGTA CTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTA GCGCCAGCAG GTTCTCTACTTCCACCGAGGAAGGTA CTCTACCGAA CCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTA CTCTGAAAGCGC AACTCTGAGTCTGGCCAGGTA GCGAACCTGTA CTCT CCGGTCTGAGACTCCAGGTA CTCTGAAAGCGCAAC CCGGAATCTGGTCCAGGTA GCGAACCTGCAACCTCTGG CTCTGAAACCCAGGTA CTCTGAAAGCGCTACTCTCTG AATCTGGCCAGGTA CTCTACTGAAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTA CTCTGAAAGCGCTACTCTGAGTC CGCCAGGTA GCGCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCG AGGAAGGTAGCGCACCAGGTA CTCTCAACTTCTACTGAA GAAGGTAGCGCCGAGGTA CTCTCCGACTTACTGAGGA AGGTA CTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCAG GTACTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTA GGTAGCGCCGGCTGGCTCTGTACTCTCCAGGTA CTCT GAAAGCGCAACTCTGAGTCTGGCCAGGTA GCGAACCC TGACTCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTA CTCTGAAA GCGCAACCCCGGAATCTGGTCCAGGTA GCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTA CTCTGAAAGCGC TACTCTGAACTGGCCAGGTA CTCTACTGAAACCGTC CGAGGGCAGCGCACCAGGTA GCGCCCTGCTGGCTCTCAA CCTCCACCGAAGAAGGTA CTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGCCAGGTA GCGAACCCGGCAACCTCCGGTTC TGAAACCCAGGTA CTCTGAAAGCGCTACTCTGAGT CCGGCCAGGTA GCGCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACC GAGGAAGGTAGCGCCGGCTGGCTCTCAACTTCTACTGA AGAAGGTA CTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCAC CAGGTA CTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCTGAATCCGGTCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCAGGTA GCGAACCCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCAGGTA G CAACCGCTACTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTA GCGCC AGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTA CTCTA CTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCAGGTA CTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTA GCGAACCTG AACCTCTGGCTCTGAAACCCAGGTA CTCTGAAAGCG CTACTCTGAATCTGGCCAGGTA CTCTACTGAAACCGT CCGAGGGCAGCGCACCAGGTTAA	SATPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEE GTSSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAPGGSPAGSCTSP GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAP G
--	---

#### Пример 8. Конструирование Cys3-XTEN.

Конструировали пару праймеров для внесения рестриционного сайта *Vam*HI и участка цистеина 1 из последовательности GRATAEAAAGCGTAЕАА в N-конец XTEN\_АЕ432-1 и части участка цистеина 2 из последовательности ТАЕААG и рестриционного сайта *Bbs*I в C-конец XTEN\_АЕ432-1. Вторую пару праймеров конструировали для внесения рестриционного сайта *Bsa*I и части участка цистеина 2 из последовательности GCGTAЕАА в N-конец XTEN\_АЕ432-2 и участка цистеина 4 из последовательности ТАЕААGCGTAЕААR с 8xHis- маркером (H8) и рестриционного сайта *Hind*III в C-конец XTEN\_АЕ432-2. XTEN\_АЕ432-1 содержит 1-432 аминокислотную последовательность, а XTEN\_АЕ432-2 содержит 433-864 аминокислотную последовательность, кодируемую геном XTEN\_АЕ864. Эти две пары праймеров применяли для амплификации, соответственно, генов XTEN\_АЕ432-1 и XTEN\_АЕ432-2 при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты ПЦР необходимых размеров очищали в геле и расщепляли рестриционными ферментами *Vam*HI/*Bbs*I и *Bsa*I/*Hind*III, соответственно, как вставки для лигирования. Целевой вектор - производное от pET30 (Novagen) - содержит CBD (целлюлозосвязывающий домен)-спейсер с фланкирующими рестриционными сайтами *Vam*HI и *Hind*III. Целевой вектор расщепляли рестриционными ферментами *Vam*HI/*Hind*III для того, чтобы удалить спейсер, и получали в виде вектора. Вектор лигировали с вышеупомянутыми расщепленным *Vam*HI/*Bbs*I продуктом ПЦР XTEN\_АЕ432-1 и расщепленным *Bsa*I/*Hind*III продуктом ПЦР XTEN\_АЕ432-2. Лигационную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. Coli* штамма TOP10. Проводили скрининг трансформантов, выделяя ДНК, а нужные конструкции подтверждали путем секвенирования ДНК. Таким образом, конечная плаزمида дает ген CBD-участок цистеина 1-XTEN\_АЕ432-участок цистеина 2-XTEN\_АЕ432-участок

цистеина 3-Н8, регулируемый промотором Т7. Последовательности ДНК и белковые последовательности приведены в табл. 27.

Таблица 27

## ДНК- и аминокислотные последовательности Cys3-ХТЕН

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
<b>СВD-Сys1- AE432- Сys2- AE432- Сys3-Н8 (AC673)</b>	ATGGCTAATACCCCAGTGAGCGGCAACCTGAAAAGTG GAATTCTACAATAGCAACCCGAGCGACACCACCAAC AGCATTAAATCCGCAGTTCAAAGTGACCAACACGGGT AGCTCCGCGATCGATCTGTCGAAGCTGACGCTGCGT ТАCTATTACACGGTTGACGGTCAGAAAGATCAGACG TTCTGGGCTGACCATGCGGCCATTATTGGCAGCAAC GGTTCCTACAACGGTATCACGAGCAATGTCAAAGGC ACTTTTGTTAAGATGAGCTCTTCGACCAACAATGCCG ATACCTATCTGGAGATTAGCTTCACCGGTGGTACTCT GGAGCCGGGTGCACACGTTCAAATCCAAGGTCGCTT CGCAAAGAATGACTGGAGCAACTATACCCAGTCCAA TGACTACAGCTTCAAAGCGCTAGCCAATTTGTTGA ATGGGATCAGGTCACCGCATACTGAACGGCGTGCT GGTCTGGGGCAAGGAACCGGGTGGTAGCGTTGTCCG TTCTGGCAGCGGATCCggtcgtGCGACGGCAGAAGCCG CTGGCtgcGGTACTGCTGAAGCGGCAGGTAGCCCAGC TGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGA ATCCGCTACTCCAGAATCCGGTCCTGGTACTAGCACT GAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGCA GGTAGCCCTACCTTACCGAAGAGGGCACTAGCACC	MANTPVSGNLKVEFY NSNPSDTTNSINPQF KVTNTGSSAIDLKSL TLRYYYTVDGQKDQT FWADHAAIIGSNQSY NGITSNVKGTfVKMS SSTNNADTYLEISFT GGTLEPGAHVQIQGR FAKNDWSNYTQSNQY SFKSASQFVEWDQVT AYLNGVLVWGKEPGG SVVGS GSGRATAE AAGCGTAEAAAGSPAG SPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGS

	GAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACT GAACCGTCCGAAGGCAGTGTCCGGTACTTCCGAA AGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCT GCTACTTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCA GCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTACCGGGCG GGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGA GTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCAC CGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGTACCAGCAC GGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTCTCCGGC GGCTCCCTACGTCTACGGAAGAGGTTACGTCCAC TGAACCTAGCGAGGGCAGCGGCCAGGCACCAGCA CTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCG AGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCA CGGAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTG AATCTGTACCCCCAGAATCTGGCCCCGGTTCCGAGC CAGTACTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTTCCAC TGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTAC TGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGA AAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGA AAGCGCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGC AGGTTCTCAACTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGA GTCTGTACTCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACCT GCTACCTCTGGTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAA TCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCCGGCACGAGCACG GAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACT GAGCCTTCTGAGGGTCTGCACCGGTACCTCCACG GAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGTACCTCCACT GAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCACG GAACCCGCGAGGGTCTGCACCAGGTACGAGCACG GAACCGTCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCG GGCTCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAGCACG GAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAACCGCTGAAGCC GCAGGTgtGGCACTGCGGAAGCTGCAGGTACAAGCG AGAGCGGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGC CTGCAACCGAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTCCG AATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTACAGAGC CGCGACGAGCGGTTCCGAAACGCCGGGTACGTCTG AATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGA CCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGTTACTAGCG AGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCG GCAGGTTCTCAACAGCACCGAAGAAGGTTCCCT GCTGGTAGCCCGACTCTACGGAGGAAGGTAGCCCT GCAGGTTCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCT GAGTCCGCTACCCCGAAGCGGTCTGGTACCTCC ACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACCTTCT GAGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAA CCAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTTCTG AGTCCGCAACCCCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAAC CAGTACTTCCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTG AGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACTTCCAC TGAGCCTAGCGAGGGTCCGACCCAGGTTCTCCGGC TGGTAGCCCGACAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGA ATCTGCAACGCCGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCC TGCAACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGTACTTCCGA ATCTGTACACCGAAAGCGGTCTGGCAGCCCTGC TGGTTCTCAACTCTACCGAGGAGGGTTACCGGC AGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCAC GGAGCCGAGCGAGGGTAGTGTCCGGGTACGAGCG AGAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAGC	PAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPTAEAAAGCG TAEAAGTSESATPES GPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEPSEGSA GSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATS TPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEPSEGSA GSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGS APTAEAAGCGTAEAA RHHHHHHHHH
	GAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCAGGTAATTCT GAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAG CCGGCAACTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTCCGAA CCAGCGACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCG GCAGGCAGCCAAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAG CACGGAACCGAGCGAGGGTCTGCCCGGGTACTTC CACCGAACCATCGGAGGGTCTGCACCTGGTAGCGA ACCTGCGACGTCTGGTCTGAAACGCCGGGTACCAG CGAAAGCGTACCCAGAATCCGGTCCGGGCACTAG CACCGAGCCATCGGAGGGTCCCGCACCAACTGCAGA AGCGGCTGGTgtGGCACCGCCGAAGCAGCTgtCATC ACCATACCACCATCATCA	

Пример 9. Конструирование Lys2-XTEN.

Конструировали пару праймеров для внесения рестрикционного сайта *Vam*HI и аминокислотной последовательности GRGSP в N-конец XTEN\_AE432-1 и аминокислотной последовательности TAEAAAG и рестрикционного сайта *Bsa*I в C-конец XTEN\_AE432-1. Вторую пару праймеров конструировали для внесения рестрикционного сайта *Bsa*I и аминокислотной последовательности с инкорпорированным лизином GKPGTAEAA в N-конец XTEN\_AE432-2 и аминокислотной последовательности с инкорпорированным лизином GKAT с 8xHis-маркером (H8) и рестрикционного сайта *Hind*III в C-конец



XTEN\_AE432-2. XTEN\_AE432-1 содержит 1-432 аминокислотную последовательность, а XTEN\_AE432-2 содержит 433-864 аминокислотную последовательность, кодируемую геном XTEN\_AE864. Эти две пары праймеров применяли для амплификации, соответственно, генов XTEN\_AE432-1 и XTEN\_AE432-2 при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты ПЦР необходимых размеров очищали в геле и расщепляли рестрикционными ферментами BamHI/BbsI и BsaI/HindIII, соответственно, как вставки для лигирования. Целевой вектор - производное от pET30 (Novagen), содержащий CBD (целлюлозосвязывающий домен)-спейсер с фланкирующими рестрикционными сайтами BamHI и HindIII, расщепляли рестрикционными ферментами BamHI/HindIII для того, чтобы удалить спейсер, и получали в виде вектора. Вектор лигировали с вышеупомянутыми расщепленным BamHI/BbsI продуктом ПЦР XTEN\_AE432-1 и расщепленным BsaI/HindIII продуктом ПЦР XTEN\_AE432-2. Лигационную смесь трансформировали в компетентные клетки E. Coli штамма TOP10. Проводили скрининг трансформантов, выделяя ДНК, а нужные конструкции подтверждали путем секвенирования ДНК. Таким образом, конечная плаزمида дает ген CBD-GRGSP-XTEN\_AE432-TAEAAAGKPGTAEAA-XTEN\_AE432-GKAT-H8, регулируемый промотором T7. Последовательности ДНК и белковые последовательности приведены в табл. 28.

Таблица 28

## ДНК- и аминокислотные последовательности Lys2-XTEN

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
<b>CBD-R-AE432-K-</b>	ATGGCTAATACCCAGTGAGCGGCAACCTGAAAGT GGAATTCTACAATAGCAACCCGAGCGACACCACC	MANTPVSGLKVEF Y

AE432-K-H8 (AC698)	AACAGCATTAATCCGCGAGTTCAAAGTGACCAACAC GGGTAGCTCCGCGATCGATCTGTCTGAAGCTGACGC TGGTFACTATTACACGGTTGACGGTCAGAAAAGAT CAGACGTTCTGGGCTGACCATGCGGCCATTATTGG CAGCAACGGTTCCTACAACGGTATCACGAGCAATG TCAAAGGCACTTTTGTAAAGATGAGCTCTTCGACC AACAAATGCCGATACCTATCTGGAGATTAGCTTCAC CGGTGGTACTCTGGAGCCGGGTGCACACGTTCAAA TCCAAGGTCGCTTCGCAAAGAATGACTGGAGCAAC TATACCCAGTCCAATGACTACAGTTCAAAAAGCGC TAGCCAATTTGTTGAATGGGATCAGGTCACCGCAT ACCTGAACGGCGTGTGGTCTGGGGCAAGGAACC GGGTGGTAGCGTTGTCTGGTCTGGCAGCGGATCCg gtcgtGGGTCTCCAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTC CAGAATCCGGTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGC GAAGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCC TACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCACCGAACCAT CTGAGGGTTCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCG TCCGAAGGCAGTGTCCGGGTACTIONCGAAAAGCGC AACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTA CTTCCGGCTCTGAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCG ACTTCTGGTCTGAAACTCCAGGTTACCCGGCGGG TAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAG TCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCAC CGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGGTACCAGC ACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCCGGTCTCC GGCGGGCTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGT CCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGGCCAGGCAC CAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGC ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGG GTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCC AGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAATCTGGCC CGGGTTCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACC CCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGC TCCTGGCACTTCTACTGAACCAAGCGAAGGTCCG CTCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGC GGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAG CGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCAAACCTCCA CTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAA TCTGGTCTGGTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCC GAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGACTCCGGA ATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAG GGTAGCGCACCAAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGA GGGCTCTGCACCCGGTACCTCCACGGAACCTTCGG AAGGTTCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCC GAGGGTTCAGCACCAAGGTACTAGCACGGAACCGT CCGAGGGCTCTGCACCAAGGTACGAGCACCGAACCC GTCGGAGGGTAGCGTCCAGGTAGCCCAGCGGGC TCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCGACCG AGCCGTCCGAAGGTTCCGACCAACCGCTGAAGCC GCAGGTaaaccgGGCACTGCGGAAGCTGCAGGTACA AGCGAGAGCGGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAG CGAGCCTGCAACCAAGCGGTTCTGAGACGCCGGGC ACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGG TTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCCGAAACGCCG GGTACGTCTGAATCAGCCACCGCGGAGTCTGGTCC GGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGCA CCGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCG	NSNPSDTTNSINPOF KVTNTGSSAIDLKSL TLRYYYTVDGQKD QT FWADHAAIIGSNGS Y NGITSNVKGTfVKM S SSTNNADTYLEISFT GGTLEPGAHVQIQG R FAKNDWSNYTQSN DY SFKSASQFVEWDQV T AYLNGVLVWGKEP GG SVVSGSGSGRGRSP G SPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSE SATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPTAEA AGKPGTAEAAGTSE S ATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSE
--------------------	---	---

<p>GTCCGGGCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACCAGCACC  GAAGAAGGTTCCCCTGCTGGTAGCCCGACCTCTAC  GGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCAACTCTA  CTGAGGAAGGTAATTCTGAGTCCGCTACCCAGAA  AGCGGTCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGG  CTCTGCACCAGGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAG  AAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTTCTGGC  TCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCC  TGAATCCGGTCTGGTCTGAACCAGCTACTTCCG  GCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACT  CCAGAGTCTGGTCTGGTACTTCCACTGAGCCTAG  CGAGGGTTCCGACACAGGTTCTCCGGCTGGTAGCC  CGACCAGCACGGAGGAGGGTACGCTGAATCTGC  AACGCCGGAATCGGGGCCAGGTTCCGGAGCCTGCA  ACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGTACCTCCGAATC  TGCTACACCGGAAAGCGGTCCTGGCAGCCCTGCTG  GTTCTCCAACCTTACCGAGGAGGGTTCACCGGCA  GGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTAAGCA  CGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGTCCGGGTACGAG  CGAGAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACC  AGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCAGGTA  CTTCTGAGAGCGCCACTCTGAATCCGGCCCTGGT  AGCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCTGG  TTCGGAACCAGCGACCAGCGGTTCTGAAACTCCGG  GTAGCCCGGCAGGCAGCCAACGAGCACCGAAGA  GGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTCTGCC  CCGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGC  ACCTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGTCTGAAA  CGCCGGGTACCAGCGAAAGCGCTACCCAGAATC  CGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGC  TCCGACCAggtAAAgcgaccCATCACCATACCACCA  TCATCACTAA</p>	<p>GSAPGTSESATPESG  PGSEPATSGSETPGT  SESATPESGPGSEPA  TSGSETPGTSESATP  ESGPGTSTEPSEGSA  PGSPAGSPTSTEEGT  SESATPESGPGSEPA  TSGSETPGTSESATP  ESGPGSPAGSPTSTE  EGSPAGSPTSTEEGT  STEPSEGSAPGTSES  ATPESGPGTSESATP  ESGPGTSESATPESG  PGSEPATSGSETPGS  EPATSGSETPGSPAG  SPTSTEEGTSTEPSE  GSAPGTSTEPSEGSA  PGSEPATSGSETPGT  SESATPESGPGTSTE  PSEGSAPGKATHHH  H  HHHH</p>
---	---

Пример 10. Хозяйский штамм и промотор для экспрессии XTEN для конъюгации.

Плазмиды pCW1054, экспрессирующие CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864, регулируемые промотором T7/lac, pLCW0968.003, экспрессирующие CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864-GFP, регулируемые промотором T7/lac, и pLCW0970.030, экспрессирующие CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864-GFP, регулируемые промотором PhoA, трансформировали в *E. coli* BL21 DE3 и *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* (Lopez, P.J., et al. (1999) *Mol. Microbiol.* 33, 188-199). Мутация *rne-131* препятствует 3'-эндорибонуклеолитической активности РНКазы E (Kido, M., et al. (1996) *Journal of Bacteriology*, 178: 3917-3925). Стартовые культуры всех шести трансформантов получали путем отбора одиночных колоний для инокуляции 2 мл ЛБ-бульона, содержащего подходящий селективный антибиотик. Стартовые культуры выращивали на протяжении ночи, а 0,5 мл использовали для инокуляции в четырёх параллельных опытах 25 мл бульона 2xYT для клеток, содержащих pCW1054 и pLCW0968.003, или 25 мл индукционного бульона PhoA (Amunix recipe 136-1) для клеток, содержащих pLCW0970.030. Культуры встряхивали на протяжении 3 ч при 37°C. Затем для всех культур температуру понижали до 26°C; а в клетках, содержащих pCW1054 и pLCW0968.003, индуцировали экспрессию белка при помощи ИПТГ при конечной концентрации 1,0 мМ. Индукция промотора PhoA в pLCW070.030 самоиндуцируется после удаления фосфата из культуральной среды. Затем культуры встряхивали на протяжении ночи при 26°C. Образцы каждой культуры лизировали и 20 мкл каждого лизата подвергали невосстанавливающему SDS-PAGE, используя NuPAGE 4-12% бис-Трис-гель от Invitrogen согласно инструкции производителя с окрашиванием Кумасси. Результаты (фиг. 43) показывают, что когда под управлением промотора T7/lac экспрессируется CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864-GFP или CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864, выход рекомбинантного белка значительно выше в клетках *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* по сравнению с клетками *E. coli* BL21 DE3. Также для клеток определяли флуоресценцию GFP, используя флуоресцентный планшет-ридер. Результаты (фиг. 44) показывают, что экспрессия CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864-GFP в клетках *E. coli* BL21 DE3 под управлением промотора почти в три раза больше, чем экспрессия CBD-сайт TEV-XTEN\_AE864-GFP под управлением промотора T7/lac. В *E. coli* BL21 DE3 *rne-131* оба промотора, T7/lac и PhoA, приводили к одинаковым уровням экспрессии. Следовательно, только при подавлении 3' эндорибонуклеолитической активности РНКазы E при индукции T7/lac получают те же титры, что и при применении индукции PhoA. Вероятно, более высокая скорость транскрипции T7 РНК полимеразы (Studier, W., et al. (1986) *Journal of Molecular Biology* 189: 113-130) по отношению к трансляции приводит к восприимчивости мРНК к эндонуклеолитическому воздействию, в то время как в случае индукции PhoA, при которой транскрипция опосредуется нативной *E. coli* РНК полимеразой II, скорость транскрипции привязана к скорости трансляции, что защищает мРНК от эндонуклеолитического воздействия.

Пример 11. Конструирование 1xAmino-XTEN288.

Пару праймеров AE278BsaIfor-AACG и AE278-RH8HindIIIrev использовали для ПЦР плазмиды, содержащей XTEN\_AE864\_003, для того, чтобы получить продукт ПЦР XTEN\_AE278. Для полосы необходимого размера проводили очистку гелем с последующим расщеплением BsaI/HindIII для получения

вставки XTEN\_AE278-R-H8. Расщепление плазмиды pCW1161, которая кодирует ген N-term-RP11-R-AE432\_3Cys-R-H8 (конструкция AC763), при помощи BsaI/HindIII проводили для того, чтобы удалить фрагмент AE432\_3Cys-R-H8 и очистить гелем большой фрагмент для получения вектора. Проводили лигирование вектора со вставкой и использовали его для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-AE288-R-H8. Длину XTEN между двумя сайтами расщепления трипсином (R, аргинин) рассчитывали как XTEN\_AE278 плюс некоторые фланкирующие аминокислоты, и она составляет ровно 288 аминокислот. Таким образом, создали проект конструкции для получения предшественника N-term-RP11-R-AE288-R-H8 (последовательность в табл. 29, ниже) и создания 1xAmino-XTEN288 (Seg 178 из табл. 3 с N-концевой аминогруппой для конъюгации) после удаления маркера N-term-RP11 и маркера C-term 8xHis при помощи расщепления трипсином.

Таблица 29

## ДНК- и аминокислотные последовательности для 1xAmino-XTEN288

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
<b>N-term-RP11-R-AE288-R-H8</b>	ATGAAAAACCCAGAGCAAGCAGAAGAACAAGCTGAAGAACA GCGCGAAGAACAACACGTCCGCGTCCCTCGCCACGTCCACGTCC GCGTCCACGCCCTCGTCCCTCGTCCGCGCCCTCGTCCGagcgcgtct cgttccgctGGGTCTCCAacgGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTT CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCTG AATCCGGTCTGGTCTGAACCAGCTACTTCCGGCAGCGAAA CCCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTG GTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGGCACCAGGTTCTC CGGCTGGTAGCCCGACCAGCACGGAGGAGGTTACGTTGAAT CTGCAACGCGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGT CTGGCAGCGAAAACCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGG AAAGCGGTCTGGCAGCCCTGCTGGTCTCCAACCTTACCG AGGAGGGTTCACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAA GGTACTAGCACGGACCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTAC GAGCGAGAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCGAGCG AATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCAGGTTCTGAGAGCG CCACTCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGCAACCTCCG GCTCAGAAAACCTCTGGTTCGGAACCGAGCCAGCGGTTCTG AAACTCCGGGTAGCCCGGAGCGAGCCCAACGAGCACCGAA GAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTCTGCCCGGG TACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGTAGCGA ACCTGCGACGTCTGGTCTGAAACCGCGGGTACCAGCGAAAG CGTACCCAGCAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCATC GGAGGGCTCCGCACCAGcgcctctcgtccgcaCATCACCATCACCA CATCATCACTAA	MKNPEQAEEQAEQQ REETRRPRPRPRPRP RPRPRPRPRPSASRSA GSPTGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEP SEGSPAGTSESATPES GPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGSTEP SEGSPAGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPSASRSA HHHHHHHHH

Пример 12. Оптимизация для экспрессии конструкции XTEN с аффинным маркером RP11.

1.1. Проектирование и конструирование конструкций, кодирующих N-term-RP11-AE864-GFP и MalEss-AE48-RP11-AE864.

Группу высокоэкспрессируемых нативных белков E. coli, описанную Ishihama Y. et al., BMC Genomics 2008, 9:102, использовали для создания перечня из 20 первых N-концевых аминокислот (колонка 3 табл. 30), гидрофобные аминокислоты F, I, W, L, V, M, C из которого были преобразованы в аланин или серин, либо были удалены с целью получения кандидатов для создания вспомогательных последовательностей, содержащих по меньшей мере 11 аминокислот (колонка 4 табл. 30). В целях сравнения первые 20 аминокислот известной последовательности CBD из хорошо экспрессируемой конструкции, созданной на Amunix (AC616), были включены в качестве контроля.

Таблица 30

## Перечень N-концевых хелперов, сконструированных в данном исследовании

Плазмида	Описание белка	1-е 20 ак	N-конц. хелперы
pSD0107	30S рибосомный белок S9	MAENQYYGTGRRKSSAARVF	MAENQYYGTGRRKSSAAR
pSD0108	50S рибосомный белок L32	MAVQNKPTRSKRGMRRSHD	MAAQNKPTRSKRGARRSHD
pSD0109	30S рибосомный белок S20	MANIKSAKKRAIQSEKARKH	MANAKSAKKRAAQSEKARKH
pSD0110	HSP-70 кофактор протенина GrpE	MSSKEQKTPEGQAPEEIMD	MSSKEQKTPEGQAPEE
pSD0111	30S рибосомный белок S14	MAQSMKAREVKRVALADKY	MAQSAKAREAKRAASADKY
pSD0112	30S рибосомный белок	MATVNQLVRKPRARKVAKSN	MATANQAARKPRARKAAKSN

	S12		
pSD0113	Фактор элонгации Tu (EF-Tu) (P-43)	MSKEKFERTKPHVNVGTIGH	MSKEKAERTKPHANAGT
pSD0114	30S рибосомный белок S15	MSLSTEATAKIVSEFGRDAN	MSASTEATAKAASEAGRAN
pSD0115	Супероксид дисмутаза [Mn] (EC 1.15.1.1) (MnSOD)	MSYTLPSLPYAYDALEPHFD	MSYTAPSAPYAYDAAEPH
pSD0116	ggaB ингибитор рибонуклеазы E протсин В	MANPEQLEEQREETRLIEE	MANPEQAEEQREETR
pSD0117	Целлюлозосвязывающий белок (CBD)	MANTPVSGNLKVEFYNSNPS	MANTPASGNAKAEAYNSNPS
pSD0118	CBD (из предыдущей конструкции AC616)	MANTPVSGNLKVEFYNSNPS	MANTPVSGNLKVEFYNSNPS

Олигонуклеотиды ДНК ряда от 107N-F&R до 119N-F&R и последовательности RP11F&R из табл. 31 синтезировали на Elim Biopharm (Хейворд, Калифорния). Растворы каждой пары ДНК (107N-F и 107N-R, 108N-F и 108N-R и т.д.) смешивали в молярном соотношении 1:1, денатурировали при 95°C на протяжении 3 мин, затем охлаждали до 25°C при 0,1°C/мин, чтобы обеспечить отжиг двухцепочечной ДНК. Базовый вектор LCW0970.030 (кодирующий CBD-AE864-GFP) расщепляли при помощи NdeI/BsaI и более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Вектор лигировали с отоженными олиго 107-118N-F&R и обработанными ПНК отоженными олиго RP11F&R, а лигационные продукты трансформировали в компетентные клетки E. coli BL21 (New England Biolabs) для получения колоний, обозначенных от pSD0107 до pSD118. Клоны pSD0107-109, pSD0111-112 и pSD0114-118 получали и подтверждали при помощи секвенирования ДНК; клон pSD0110.001 содержал одну мутацию сдвига рамки и его использовали в качестве спейсерного вектора.

Плазмидную конструкцию pCW1110 (кодирующую RP11-AE864) расщепляли при помощи BsaI/NotI, а меньшую полосу, соответствующую нуклеотидам, кодирующим AE864, очищали гелем как вставку. pCW1139 (кодирующую MalEss-AE48-payload-AE864) расщепляли при помощи XhoI/BstXI/NotI, а более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Отоженный продукт олиго из 119-AEN-F&R лигировали со вставкой и вектором, а затем трансформировали в E. coli BL21 для получения колоний с плазмидой, обозначенной как pSD0119. Клоны подтверждали на предмет последовательностей.

## 2. Конструирование библиотек N-концевых хелперов на основе pSD0116.

Пары олигонуклеотидов ДНК Stuffer-RP5for и Stuffer-RP5revP, RP6-SASRSAforP и RP6-SASRSArev, L2for и L2rev, L3for и L3rev, L4for и L4rev, L5for и L5rev, L6for и L6rev, L7for и L7rev, L8for и L8rev, L9for и L9rev, L10for и L10rev, L11for и L11rev, L12for и L12rev и L13for и L13rev (табл. 31) синтезировали на Elim Biopharm (Хейворд, Калифорния) и каждую пару отжигали, как описано выше (часть 1) для получения двухцепочечной ДНК.

Плазмиду pSD0110 расщепляли при помощи NdeI/BsaI, а более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Вектор лигировали с отоженными олиго Stuffer-RP5for&revP и RP6-SASRSAforP&rev, а затем трансформировали в E. coli BL21 для получения колоний со спейсерной векторной плазмидой pCW1146 (Stuffer-RP11-XTEN\_AE864\_003-GFP). Клоны подтверждали на предмет последовательностей.

Расщепленный NdeI/BsaI вектор pSD0110 лигировали с L5for&rev отоженными олиго для получения колоний LCW1160 (L5).

Спейсерный вектор pCW1146 расщепляли при помощи NdeI/BsaI, а более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Вектор лигировали с отоженными олиго L2-4 и L6-13 for&rev, как в табл. 31, а затем трансформировали E. coli BL21 для получения колоний конструкций LCW1157 (L2), LCW1158 (L3), LCW1159 (L4), LCW1163 (L6), LCW1171 (L7), LCW1172 (L8), LCW1203 (L9), LCW1204 (L10), LCW1208 (L11), LCW1209 (L12) и LCW1210 (L13).

## Перечень олигонуклеотидов ДНК

Название	Последовательность ДНК
RP11F	CGTCCGCGTCCTCGCCACGTCCACGTCCGCGTCCACGCCCTCGTCCTCGTCCGCG CCCTCGTCCGagcgctctcgttccgctGGGTCTCC
RP11R	ACCTGGAGACCCAGCGGAACGAGACGCGCTCGGACGAGGGCGCGGACGAGGACG AGGGCGTGGACGCGGACGTGGACGTGGGCGAGGACGCG
107N-F	TATGGCTGAAAATCAATATTATGGTACGGGGCGCCGGAAGAGTTCGGCCGCC
107N-R	GACGGCGGCCGAACTCTCCGCGCCCGTACCATAATATTGATTTTCAGCCA
108N-F	TATGGCAGCTCAGCAGAATAAGCCTACACGAAGTAAAAGAGGCGCGCCGGTC GCACGAT
108N-R	GACGATCGTGCACCGCGCGCGCCTCTTTACTTCGTGTAGGCTTATTCTGCTGA GCTGCCA
109N-F	TATGGCAAATGCTAAGAGTGCAAAGAAACGGGGCGGCACAAAGCGAAAAGCTCG GAAACAT
109N-R	GACGATGTTTCCGAGCTTTTTCGCTTTGTGCCCGCCGTTTCTTTGCACTTTAGCAT TTGCCA
110N-F	TATGTCCAGCAAAGAACAGAAGACTCCGGAAGGTCAAGCGCCAGAGGAG
110N-R	GACGCTCCTCGGCGTTGACCTTCCGGAGTCTTCTGTTCTTTGCTGGACA
111N-F	TATGGCAAACAAGCGCTAAAGCCCGAGGCGAAACGTGCAGCCTCTCGCGGA CAAATAT
111N-R	GACGATATTTGTCCGAGAGGCTGCACGTTTCGCCTCGCGGGCTTTAGCGCTTTGT TTGCCA
112N-F	TATGGCTACTGCAAATCAGGCCGCCCGTAAACCTCGAGCACGAAAGGCTGCTAAA TCAAAT
112N-R	GACGATTTGATTTAGCAGCCTTTCGTGCTCGAGGTTTACGGGCGGCCTGATTTGCA GTAGCCA
113N-F	TATGTCAAAGAAAAAGCCGAACGACCAAACCTCATGCTAACGCTGGCACG
113N-R	GACGCGTGCCAGCGTTAGCATGAGGTTTGGTCCGTTCCGGCTTTTCTTTGGACA
114N-F	TATGTCAGCGTCTACGGAGGCAACCGCAAAAAGCTGCTAGTGAAGCGGGCCGTGAT GCCAAT
114N-R	GACGATTCGCATCACGGCCCGCTTCACTAGCAGCTTTTGCGGTTGCCTCCGTAGAC GCTGACA
115N-F	TATGAGCTATACTGCACCGAGCGCACCGTATGCTTATGATGCAGCCGAACCTCAC
115N-R	GACGGTGAGGTTCCGGTGCATCATAAGCATAACGGTGCCTCGGTGCAGTATAGCT CA
116N-F	TATGGCAAACCCGAACAGGCTGAGGAACAGAGAGAAGAAACA
116N-R	GACGTGTTTCTTCTCTCTGTTTCCCTCAGCCTGTTCCGGGTTTGCCA
117N-F	TATGGCTAATACCCCTGCGAGCGGGAACGCCAAGGGCGGAAGCTTACAACAGTAAT CCAAGC



инкубировали при 26°C, встряхивая при 300 об/мин на протяжении 22-24 ч. Затем определяли экспрессию путем помещения 100 мкл культуры в 96-луночный планшет и измеряя флуоресценцию от С-концевого репортера GFP.

Таблица 32

Библиотеки LCW1157-1159

Библиотечка	Описание	N-концевая вспомогательная последовательность (ДНК)	Варианбельность	Количество, для которого был проведен скрининг
LCW 1157	Кодон-оптимизирующая вспомогательная последовательность, замена 2 <sup>го</sup> кодона на Lys (AAA)	ATGaaaAAY(C/T)CCN(A/G/C/T)GAR(A/G)CAR(A/G)GCN(A/C/T/G)GAR(A/G)GAR(A/G)CAR(A/G)M(A/C)GY(C/T)GAR(A/G)GAR(A/G)ACa	98304	406
LCW 1158	Кодон-оптимизирующая вспомогательная последовательность	ATGGCN(A/G/C/T)AAY(C/T)CCN(A/G/C/T)GAR(A/G)CAR(A/G)GCN(A/G/C/T)GAR(A/G)GAR(A/G)CAR(A/G)M(A/C)GY(C/T)GAR(A/G)GAR(A/G)ACa	393216	85
LCW 1159	Вставка AEEQ во вспомогательной последовательности, использует меньше кодонов, чем LCW1157 для сохранения управляемой варианбельности	ATGaaaAAcCCV(A/G/C)GAR(A/G)CAR(A/G)GCD(A/G/T)GAR(A/G)GAaCAR(A/G)GCD(A/G/T)GAR(A/G)GAaCAGM(A/C)GY(C/T)GAaGAR(A/G)ACa	20736	146

После оценки флуоресцентного сигнала шесть клонов, демонстрирующих наибольшую экспрессию, и два клон, демонстрирующих низкую экспрессию, выбирали из каждого исследуемого 96-луночного планшета, а экспрессию этих клонов повторно тестировали в 4 репликах. Для всех трех библиотек были определены клоны, имеющие более высокую экспрессию, чем конструкция pSD0116 (фиг. 82A-C), а между первоначальными исследованиями и повторными исследованиями наблюдали хорошую корреляцию (фиг. 82D-F). Среди трех исследуемых библиотек библиотека LCW1159 показывала в общем случае высокий уровень экспрессии, и конструкция, характеризующаяся наиболее высокой экспрессией на данном этапе скрининга (LCW1159.004), принадлежала этой библиотеке.

8 конструкций с наиболее высокими уровнями экспрессии из этих трех библиотек и контрольные образцы обрабатывали при помощи Pop Culture (EMD Millipore), обрабатывали температурой, а полученные в результате лизаты анализировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания Кумасси (фиг. 83). Подтвердили, что уровни экспрессии для 8 конструкций были выше, чем для контрольных образцов (отрицательный контроль, LSD0114 и LSD0116), а полноразмерные белки получали из этих конструкций. Лизаты 4 конструкций с наибольшей экспрессией (после обработки Pop Culture и температурой) и отрицательный контроль (AP32, очищенный белок XTEN-GFP без маркера RP11) загружали в колонку MacroCap SP при pH 8 и проводимости 6,5 мСм/см. Колонку отмывали 20 мМ фосфата натрия, pH 8, 100 мМ NaCl, а белок элюировали при помощи 20 мМ фосфата натрия, pH 8, 500 мМ NaCl. Образцы из загрузки, профильтрованные, отмывые и элюированные, анализировали в SDS-PAGE геле (фиг. 84). Результаты показывают, что экспрессируемый белок четырех образцов, которые были отобраны из всех трех библиотек, может захватываться MacroCap SP; таким образом, связывание было обусловлено наличием в белке маркера RP11, так как отрицательный контроль (не содержащий маркера RP11) не связывался с колонкой MacroCap SP.

Плазмиды клонов, выбранных для повторного исследования, лизировали щелочью и анализировали последовательности ДНК N-концевых хелперов. В некоторых участках наблюдали расхождение в кодах (табл. 33). Например, 3-я аминокислота LCW1157, N, кодируется AAC или AAT. Большинство характеризующихся высокой экспрессией клонов (77%) в LCW1157 кодируются AAT в 3-й аминокислоте, в то время как большинство клонов, характеризующихся низкой экспрессией (885), кодируются AAC, что указывает на то, что AAT в этой позиции является более предпочтительным, чем AAC для высокой экспрессии. Аналогично, CCG является более предпочтительным в 4-й аминокислоте, в то время как GCG в 7-й аминокислоте накапливается в клонках с низкой экспрессией. Те же тенденции наблюдали и для библиотек LCW1158 и LCW1159.



Анализ результатов секвенирования клонов с высокой и низкой экспрессией  
в библиотеках LCW1157-1159\*

LCW1157		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	13	14				
аминокислота #		K(AAA)	N(AA+)	P(CC+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	R or S(+G+)		E(GA+)	E(GA+)	T(AC+)				
кодон		3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	1-я	3-я	3-я	3-я					
общее количество высок.: 30	A	0%	10%	57%	67%	33%	80%	70%	50%	30%	0%	63%	57%						
	G	0%	43%	43%	33%	7%	20%	30%	50%	0%	0%	37%	43%						
	C	23%	23%	0%	0%	13%	0%	0%	0%	70%	67%	0%	0%						
	T	77%	23%	0%	0%	47%	0%	0%	0%	0%	33%	0%	0%						
общее количество низк.: 8	A	0%	13%	88%	50%	25%	38%	63%	25%	63%	0%	75%	63%		T(ACA)				
	G	0%	13%	13%	50%	63%	63%	38%	75%	0%	0%	25%	38%						
	C	88%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	38%	38%	0%	0%					
	T	13%	75%	0%	0%	13%	0%	0%	0%	0%	63%	0%	0%						
LCW1158		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	13	14				
аминокислота #		A(GC+)	N(AA+)	P(CC+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	R or S(+G+)		E(GA+)	E(GA+)	T(AC+)				
кодон		3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	1-я	3-я	3-я	3-я					
общее количество высок.: 6	A	83%	0%	33%	17%	67%	50%	83%	50%	83%	83%	0%	67%	50%					
	G	0%	0%	83%	33%	0%	17%	50%	17%	0%	0%	33%	50%						
	C	0%	33%	33%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	17%	100%	0%	0%					
	T	17%	67%	33%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%					
общее количество низк.: 2	A	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%			T(ACA)			
	G	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%	0%					
	C	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%					
	T	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%					
LCW1159		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
аминокислота #		K(AAA)	N(AA+)	P(CC+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	R or S(+G+)		E(GA+)	E(GA+)	T(AC+)
кодон		3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	1-я	3-я	3-я	3-я	
общее количество высок.: 12	A	42%	67%	67%	50%	73%	67%	50%	58%	67%	50%	58%			25%	0%		58%	
	G	17%	33%	33%	0%	25%			33%	17%	42%				0%	0%		42%	
	C	42%	0%	0%	0%	0%			0%	0%	0%				75%	75%		0%	
	T	0%	0%	0%	50%	0%			0%	33%	0%				0%	25%		0%	
общее количество низк.: 3	A	33%	100%	67%	0%	67%			E(GAA)	67%	100%	100%	E(GAA)	Q(CAG)	33%	0%	E(GAA)	33%	T(ACA)
	G	33%	0%	33%	100%	33%				33%	0%	0%			0%	0%		67%	
	C	60%	30%	70%	30%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%	0%	
	T	20%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	0%	0%	40%	0%	40%	0%	0%	50%	0%	0%	
предпочтение	A																		
	C																		

\* Общее количество анализируемых клонов с высокой и низкой экспрессией определяли для каждой библиотеки и анализировали процентное содержание А, G, С или Т в каждом участке с изменяющимися кодонами.

#### 4. Скрининг и анализ библиотеки N-концевых хелперов LCW1163.

Так как библиотека LCW1159 в общем случае характеризуется более высокой экспрессией, чем LCW1157 и LCW1158, проект следующей библиотеки создавали на основе LCW1159 путем внесения более вариантов в кодирующую область N-концевого вспомогательного домена. Для 672 клонов из этой библиотеки (с теоретическим значением варибельности в 55296) проводили скрининг и повторное исследование таким же образом, как и для библиотек LCW1157-1159. Наблюдали клоны с более высокой экспрессией, чем LCW1159.004 (образец с наибольшей экспрессией для предыдущего этапа скрининга) (фиг. 85). Для клона с наибольшей экспрессией, LCW1163.029, было достигнуто 40% улучшение по сравнению с LCW1159.004, при этом его уровень экспрессии был на 27% ниже, чем для контрольного CBD. Проводили анализ последовательности клонов с высокой и низкой экспрессией, определяли наиболее предпочтительные для экспрессии нуклеотиды (см. табл. 34) и обобщали полученную информацию. Большинство участков демонстрировали предпочтительность кодона А для высокой экспрессии, в то время как для остальных предпочтительным являлся С.

Таблица 34

Анализ результатов секвенирования для клонов с высокой и низкой экспрессией  
в библиотеке LCW1163\*

количество нуклеотидов	Экспрессия (Процентное содержание)														
	#9	#10	#11	#12	#15	#18	#21	#24	#30	#3	#6	#3	#4	#5	#1
высокая экспрессия	A	74	17	74	40	37	40	66	77	60	43	66	40	0	34
	C	17	83	26	49	0	0	0	0	0	0	0	60	83	0
	T	9	0	0	0	0	0	34	0	0	29	0	0	0	17
низкая экспрессия	G	0	0	0	11	63	60	0	23	40	29	34	0	0	66
	A	20	70	3	20	40	20	60	50	30	10	20	50	0	60
	C	60	30	70	30	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50
предпочтение	T	20	0	0	0	0	0	40	0	0	40	0	0	50	0
	G	0	0	0	50	60	80	0	50	70	50	80	0	0	40
		A	C	A	A/C				A	A		A		C	

\* Проводили анализ процентного содержания А, G, С или Т в каждом участке с варибельным кодоном, а обобщенную информацию по определенным предпочтительным нуклеотидам привели в нижнем ряду.

## 5. Скрининг и анализ RP11 библиотеки LCW1160.

В то же время проводили скрининг и анализ 168 колоний из библиотеки LCW1160 (библиотека с вариабельной кодирующей областью RP11-маркера без N-концевого вспомогательного домена (общая теоретическая вариабельность составляла  $8 \cdot 8 \times 10^{12}$ ). Однако данная библиотека в общем случае имела очень низкий уровень экспрессии (фиг. 86), а после выделения плазмидной ДНК и анализа данных секвенирования было обнаружено, что исключение с высокой экспрессией кодирует процессированный маркер RP11. Результаты скрининга библиотеки в условиях данного эксперимента дают большие основания предполагать, что N-концевой хелпер необходим для достижения высоких уровней экспрессии.

## 6. Скрининг библиотек N-концевых хелперов LCW1171, LCW1172, LCW1203 и LCW1204.

Проводили скрининг и анализ дополнительного количества N-концевых библиотек (LCW1171, LCW1172, LCW1203 и LCW1204) тем же самым образом, как описано выше. LCW1171 и 1172 были сконструированы одинаково, при этом для LCW1171 допускали большее количество аминокислотных замен во вспомогательной последовательности, чем для LCW1172. Результаты скрининга показали, что в целом LCW1171 характеризуется намного более низким уровнем экспрессии, чем LCW1172 (фиг. 94А и В). LCW1203 и 1204 были сконструированы одинаково, акцент делали на рандомизации разных участков вспомогательной последовательности по сравнению с LCW1171 и 1172. Для LCW1204 допускали большее количество аминокислотных замен, чем для LCW1203, что привело в целом к более низкой экспрессии, чем у LCW1203 (фиг. 94С и D). Эти результаты позволяют предположить, что уровень экспрессии чувствителен к заменам в последовательностях вспомогательных доменов.

## 7. Скрининг библиотек N-концевых хелперов LCW1208, LCW1209 и LCW1210.

Конструировали три новые N-концевые библиотеки (LCW1208, LCW1209 и LCW1210) для того, чтобы исследовать эффект дополнительного продления N-концевой вспомогательной последовательности (табл. 35). Во вспомогательный домен LCW1208 и LCW1210 вносили 4 дополнительных остатка, а в LCW1209 вносили 8 дополнительных остатков. Результаты скрининга показали общую тенденцию, согласно которой наиболее высокой экспрессией характеризовался LCW1209, за ним следовал LCW1208, а затем LCW1210 (фиг. 95), что подтверждает положительный эффект от добавления дополнительных аминокислот во вспомогательную последовательность.

Таблица 35

Библиотеки LCW1208-1210

Библиотека	N-концевая вспомогательная последовательность (аминокислота)	Вариабельность	Количество, для которого проводили скрининг
LCW1208	МККQEQEKEQAEEQ <b><u>VBVB</u></b> REET (B=A/S; X=E/K/Q)	2304	336
LCW1209	МККQEQEKEQAEEQ <b><u>VBVBVBVB</u></b> REET (B=A/S; X=E/K/Q)	104976	336
LCW1210	МККQEQEKEQAEEQ <b><u>ZZZZ</u></b> REET (Z=любая аминокислота)	262144	336

Дополнительные остатки во вспомогательной последовательности были подчеркнуты. Конструировали три новые N-концевые библиотеки (LCW1208, LCW1209 и LCW1210) для того, чтобы исследовать эффект дополнительного продления N-концевой вспомогательной последовательности (табл. 36). Во вспомогательный домен LCW1208 и LCW1210 вносили 4 дополнительных остатка, а в LCW1209 вносили 8 дополнительных остатков. Результаты скрининга показали общую тенденцию, согласно которой наиболее высокой экспрессией характеризовался LCW1209, за ним следовал LCW1208, а затем LCW1210 (фиг. 95), что подтверждает положительный эффект от добавления дополнительных аминокислот во вспомогательную последовательность для улучшения экспрессии.

После повторного исследования из трех библиотек выбирали 4 конструкции с наиболее высокими уровнями экспрессии и проводили анализ их N-концевых вспомогательных последовательностей (табл. 36). Конструкция с наиболее высокой экспрессией (LCW 1209.029) достигала 90% от уровня экспрессии контрольного CBD, как показали результаты сравнения средней флуоресценции после вычитания отрицательного контроля.

Таблица 36

Конструкции с наиболее высокими уровнями экспрессии из библиотек LCW1208-1210 и контрольные образцы

Название образца	Ср. флуоресценция	Вспомогательная последовательность*
LCW1208.009	9070	МККQEQEKEQAEEQ <b><u>AESEREET</u></b>
LCW 1208.007	8870	МККQEQEKEQAEEQ <b><u>AESEREET</u></b>
LCW 1208.008	8800	МККQEQEKEQAEEQ <b><u>SOSOREET</u></b>

LCW 1208.010	8740	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> SE <del>SE</del> REET
LCW 1209.029	10010	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> AKAE <del>SE</del> AREET
LCW 1209.015	9440	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> SKSOAE <del>AE</del> AREET
LCW 1209.023	8980	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> AOAOAE <del>DE</del> REET
LCW 1209.010	8580	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> SKSKAE <del>DE</del> REET
LCW 1210.030	8650	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> PE <del>VE</del> OREET
LCW 1210.032	8310	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> VEN <del>P</del> REET
LCW 1210.025	8100	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> EL <del>C</del> REET
LCW 1210.009	8030	MKKQE <del>Q</del> EKEQAE <del>EQ</del> GID <del>T</del> REET
Контрольный CBD	10940	n/a
Отрицательный контроль	1630	n/a

\* Дополнительные остатки во вспомогательной последовательности были подчеркнуты.

Резюмируя результаты скрининга в условиях данного эксперимента, можно с большой вероятностью предположить, что N-концевой хелпер играет важную роль для достижения высоких уровней экспрессии.

Пример 13. Ферментация XTEN с применением индукции PhoA - оценка выхода экспрессии.

*E. coli* BL21, несущие плазмиды, кодирующие Helper\_LCW1159.004-RP11-AE288-His8 (AC767), Helper\_LCW1172.033-RP11-AE576-His8 (AC780) и Helper\_LCW1172.033-RP11-AE864-His8 (AC786), трансформировали в штамм *E. coli* BL21. Для каждого из 3 штаммов проводили по три 10 л ферментации. Для инокуляции 125 мл ЛБ среды, содержащей 10 мг/мл тетрациклина, использовали исходный раствор глицерола. Затем стартовые культуры встряхивали на протяжении ночи при 37°C. Стартовую культуру использовали для инокуляции 4 л среды для периодической ферментации, содержащей -20 г сульфата аммония, 10,4 г безводного двухосновного фосфата калия, 5 г дигидрата цитрата натрия; 4,6 г моногидрата одноосновного фосфата натрия; 106 г соевого пептона NZ BL4 (Kerry Bioscience #5X00043); 54 г экстракта дрожжей (Teknova #Y9020); 3,6 л воды; 0,05 мл полипропиленгликоля; 5,2 мл раствора следовых элементов (Amunix recipe 144-1); 35 мл 1М сульфата магния; и 4 мл канамицина (50 мг/мл) - в 10 л стеклянном сосуде с рубашкой с В контроллером В. Braun Biostat. Настройки управления ферментацией были следующими: pH 6,9±0,1; dO<sub>2</sub> = 10%; каскад растворенного кислорода в режиме перемешивания в диапазоне 125-1180 об/мин; поток воздуха 5 л/мин с 90% кислорода; начальная температура 37°C; основной контроль 13% гидроксид аммония; отсутствие кислотного контроля. После 6 ч культивирования инициировали подпитку 70% глицеролом при скорости 40 г/ч. Когда культуры достигали ОП600, составляющую 50±10 ОП, температуру культуры понижали до 26°C, добавляли 54 мл 1М сульфата магния и солевую подпитку, состоящую из 10 г/л сульфата аммония, 26 г/л безводного двухосновного фосфата калия, 2 г/л дигидрата цитрата натрия; 13 г/л моногидрата одноосновного фосфата натрия; 15 г/л безводного одноосновного фосфата калия; 0,08% раствора следовых элементов, начинали подавать со скоростью 33 г/л и продолжали 6 ч. После истечения общего времени ферментации в 64-70 ч культуру собирали при помощи центрифугирования, получая сгустки из клеток в 1,6-2,3 кг влажной массы. Сгустки хранили замороженными при -80°C до дальнейшего использования. Для анализа титров в конце процесса ферментации образцы из общего бульона замораживали в объеме 0,2 мл, затем размораживали, затем добавляли 0,2 мл воды, затем для того чтобы лизировать и флоккулировать хозяйские белки, образцы инкубировали при 85°C на протяжении 15 мин, затем выдерживали при 4°C на протяжении 15 мин с последующим центрифугированием на протяжении 10 мин при 20000 g. Полученные в результате флоккулированные растворимые лизаты анализировали при помощи C18 обратнофазной HPLC, а площадь абсорбции A214, соответствующую пикам, представляющим Helper-RP11-XTEN-His8, сравнивали с очищенным контрольным эталоном. Далее для того чтобы определить сухую массу клеток (СМК), пеллетировали аликвоты клеток и удаляли надосадочную жидкость. Сгусток клеток один раз промывали водой и затем высушивали в духовке при 80°C на протяжении 3 дней. Пробирки, содержащие сгустки клеток, взвешивали, вычитали из измеренной массы массу пробирки, а оставшуюся массу делили на начальный объем каждого образца (0,0002 л), чтобы получить СМК. Результаты ферментативного выращивания, анализа титров и сухой массы клеток обобщены в табл. 37, приведенной ниже. При скрининговом исследовании 96-луночного планшета, когда проводили скрининг библиотеки LCW1160 конструкций RP11-XTEN-His8 без N-концевого хелпера (пример 12, фиг. 86), уровень экспрессии LCW1160.006, конструкции с наибольшей экспрессией, составил только 50% от экспрессии конструкций LCW1159.004 или LCW1172.033 со вспомогательными последовательностями. Следовательно, ожидается, что конструкции XTEN с N-концевыми вспомогательными последовательностями приведут к существенно более высоким титрам экспрессии по сравнению с конструкциями XTEN, не содержащими вспомогательных последовательностей.

Измеренные параметры экспрессии

Группы XTEN	Ферментация #	Конечная О.П.	Общее время (часы)	Сухая масса клеток на литр ферм (г/л)	Титр по объему культуры (г/л)	Средний титр (микромоли/л)	Титр / Сухая масса ферм (мг XTEN / г <i>E. coli</i> )	ММ (г/моль)	Титр (микромоли/л)	Средний титр (микромоли/л)	Ст. погрешность среднего (микромоли/л)
Helper_LCW1159.004-RP11-AE288-His8 (AC767)	EC846	140	67,5	95	0,5	0,7	5,6	26399	212	271	76
	EC888	140	64	85	0,8		9,4	26399	357		
	EC903	136	69	103	0,7		6,4	26399	243		
Helper_LCW1172.033-RP11-AE576-His8 (AC780)	EC850	125	66	107	1,1	2,0	10,0	52929	189	388	182
	EC869	140	70	90	2,1		22,8	52929	430		
	EC883	170	67	102	2,9		28,8	52929	545		
Helper_LCW1172.033-RP11-AE864-His8 (AC786)	EC873	135	68	91	2,0	2,1	22,2	79284	280	272	41
	EC889	145	65,5	95	2,3		24,4	79284	308		
	EC913	108	67	108	2,0		18,1	79284	228		

Пример 14. Очистка XTEN с маркерами RP11 и His8.

#### 1. Экспрессия, лизис и очистка.

Гибридный белок MKNPEQAEEQAEQREET-RP11-SASRSA-XTEN\_AE432(C12,C217,C422)-SASRSA-His(8)] с N-концевой вспомогательной последовательностью представителя одной из библиотек LCW1159.004, описанного в примере 10, с двумя аффинными маркерами, присоединенными к XTEN в N- и C-конце, соответственно, экспрессировали в *E. coli*, используя 4 л биореактор и условия, описанные в данном тексте. После выращивания клетки собирали при помощи центрифугирования и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до использования. Сгусток клеток перерастворили в лизисном буфере (20 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК pH 8,0, 3 мл буфера на 1 г клеточной пасты). Клетки лизировали, трижды пропуская их через APV гомогенизатор при давлении в 830-900 бар. Лизисный буфер (1 мл буфера на 1 г клеточной пасты) использовали в качестве вытеснителя, чтобы изъять остаточный объем из гомогенизатора. Гомогенизированный лизат инкубировали в водяной ванне при  $85^{\circ}\text{C}$  на протяжении 20 мин с последующим быстрым охлаждением в ванне с ледяной водой на протяжении 20 мин. После обработки нагреванием и охлаждением лизат центрифугировали на скорости 11000 об/мин на протяжении 90 мин в центрифуге SORVALL. После центрифугирования надосадочную жидкость профильтровывали через два фильтра CUNO Bio cap 25 (BC0025L90SP08A). Очищенную надосадочную жидкость хранили при  $4^{\circ}\text{C}$  на протяжении ночи.

#### 2. Этап захвата: Тоуорpearl IMAC хроматография.

Аффинную хроматографию IMAC применяли в качестве этапа захвата для связывания XTEN с интактной C-концевой His- маркером. Вкратце, хроматографическую колонку BPG140/12 (GE Life Sciences) паковали 2000 мл 650М смолы Тоуорpearl IMAC (TOSOH Biosciences). Колонку уравнивали 2 объемами колонки (OK) равновесного буфера (20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, pH 8,0). Очищенный клеточный лизат доводили до конечной концентрации NaCl в 500 мМ, используя 5М маточного раствора NaCl, и затем загружали в IMAC смолу. Колонку промывали 2 объемами колонки равновесного буфера, а затем 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазола pH 8,0, а затем - 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 5 мМ имидазола pH 8,0, чтобы удалить соль. Элюирование проводили с 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ имидазола, pH 8,0. Профильтрованные, отмытые и элюированные фракции анализировали при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE/окрашивания Кумасси, а фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли.

#### 3. Этап полировки/захвата: MacroCap SP хроматография.

На этапе полировки применяли катионообменную хроматографию для подтверждения N-концевой целостности продукта. Из нескольких катионообменных сред выбрали смолу MacroCap SP (GE Life Sciences) благодаря ее превосходной емкости и избирательности по отношению к продукту. 1000 мл смолы MacroCap SP паковали в хроматографическую колонку BPG100/13 (GE Life Sciences) и уравнивали 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 20 мМ NaCl. Пул IMAC загружали в колонку, а смолу промывали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, pH 8,0 и 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 150 мМ NaCl. Белок элюировали с 5 объемами колонки линейного градиента от 150 до 500 мМ NaCl в 20 мМ фосфата натрия pH 8,0. Фракции собирали и анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли для следующего этапа.

#### 4. Расщепление трипсином элюционного пула MacroCap SP.

Расщепление трипсином (сигма трипсин поджелудочной железы быка) элюционного пула SP про-

водили при соотношении фермент/белок 1:200 м/м на протяжении ночи при 37°C.

5. Этап полировки: Масгосар Q хроматография.

После расщепления трипсином отщепленные маркеры отделяли от конечного продукта при помощи Масгосар Q хроматографии. Колонку BPG100/19 (GE Life Sciences) паковали 1500 мл объемами колонки смолы Масгосар Q (GE Life Sciences). Расщепленный трипсином элюционный пул Масгосар SP инкубировали на протяжении 15 мин при 80°C с 20 мМ ДТТ и 2 мМ ЭДТК, для того чтобы восстановить дисульфидные связи и инактивировать трипсин. Охлажденный белковый раствор разбавляли до проводимости ниже 5 мСм/см водой Milli-Q и загружали в колонку Масгосар Q, уравновешенную 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0. Колонку промывали 2 объемами колонки 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0, затем 2 объемами колонки 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, 150 мМ NaCl pH 7,0. Белок элюировали с линейным градиентом от 150 до 500 мМ NaCl в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0 в 20 объемах колонки. Фракции анализировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром.

6. Концентрирование и диафильтрация (получение конечного препарата).

Выбранные фракции Масгосар Q смешивали и концентрировали, используя 10 КД Pellicon mini (Millipore) при давлении подачи питания <20 фунтов на кв.дюйм и ретената <8 фунтов на кв.дюйм, за чем следовала 10X диафильтрация 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0 до достижения конечной концентрации белка >5 мг/мл.

9. Анализ степени очистки белка, очищенного разными методами.

Одну партию (партия 1) очищали в три этапа очистки, как описано выше. Другую партию (партия 2) очищали из того же самого ферментированного материала, но при этом пропускали этап полировки Масгосар SP. Процессированные группы XTEN детектировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром в элюционных фракциях Масгосар Q для партии 2 (фиг. 87А), при этом в элюционных фракциях Масгосар Q для партии 1 практически отсутствовали процессированные варианты (фиг. 87В). Данные результаты позволяют предположить, что в применяемых условиях этап Масгосар SP на основе маркера RP11 является существенным для подтверждения N-концевой целостности и общего качества продукта.

Пример 15. Конструирование 1xAmino, 9xThiol-XTEN432.

Следующие группы праймеров 5Afor&C11BbsIrev-TGGC, C11BsaIfor-TGGC&C12-AE38BbsIrev и C12-AE38BsaIfor&AatIIIC13-2P применяли для проведения ПЦР плазмиды pCW1164, содержащей XTEN\_AE432 (C422), для получения продуктов ПЦР AE-C11, C11-2 и C12-3 соответственно. C11, 2&3 обозначали как Cysteine Island1 (участок цистеина1), 2&3, содержащие одинаковую аминокислотную последовательность TAЕААGCGTAEAA, но с использованием разных кодонов. Очистку гелем продуктов ПЦР проводили для получения полос необходимых размеров, которые расщепляли рестрикционными ферментами SbfI/BbsI, BsaI/BbsI и BsaI/AatII, соответственно, для получения вставок. Расщепление плазмиды pCW1164, которая кодирует ген N-term-RP11-R-XTEN\_AE432 (C422)-R-H8, проводили при помощи SbfI/AatII, для того чтобы удалить фрагмент, состоящий приблизительно из 290 аминокислот в пределах XTEN\_AE432, а очистку гелем проводили для получения оставшегося крупного фрагмента в качестве вектора. Проводили лигирование вектора с тремя вставками из продуктов ПЦР, как описано выше, и использовали для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-XTEN\_AE432 (C319, C370, C422)-R-H8. Для этой конструкции проводили ПЦР с праймерами C11BsaIfor-TGGC&AatIIIC13-2P для получения продукта ПЦР длиной приблизительно в 360 п.н.о. Проводили очистку гелем полосы с необходимым размером, за которой следовало расщепление при помощи BsaI/AatII, как вставки XTEN\_AE120-3Cys, которая содержит три участка цистеина.

В то же время проектировали и синтезировали (Genscript) кодон-оптимизированный фрагмент ДНК XTEN\_AE313-6Cys, содержащий шесть участков цистеина. Фрагмент расщепляли фланкирующими рестрикционными ферментами BsaI/BbsI и очищали гелем для получения вставки, содержащей шесть первых участков цистеина XTEN\_AE432. Расщепление плазмиды pCW1161, которая кодирует ген N-term-RP11-R-XTEN\_AE432\_3Cys-R-H8, проводили при помощи BsaI/AatII, для того, чтобы удалить фрагмент XTEN\_AE432\_3Cys, а очистку гелем проводили для получения крупного фрагмента в качестве вектора. Проводили лигирование вектора с расщепленной BsaI/BbsI вставкой XTEN\_AE313-6Cys и расщепленной BsaI/AatII вставкой XTEN\_AE120-3Cys, как описано выше. Лигированный продукт использовали для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-XTEN\_AE432 (C12, C63, C114, C165, C217, C268, C319, C370, C422)-R-H8. Конструкцию проектировали для получения предшественника N-term-RP11-R-AE432\_9Cys-R-H8 (последовательность в табл. 38, ниже), продукт которого использовали для создания 1xAmino, 9-Thio-XTEN432 после удаления маркера N-term-RP11 и маркера C-term 8xHis при помощи расщепления трипсином. Конечный продукт содержал девять цистеинов в последовательности XTEN432 (Seg 177).

Таблица 38

ДНК- и аминокислотная последовательность для 1xAmino, 9-Thio-XTEN432

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
N-term-RP11-R-AE432_9Cys	ATGAAAAACCCAGAGCAAGCAGAAGAACAAGCTGAAG AACAGCGGAAGAAACACGTCGCGCTCCTCGCCACGT CCACGTCCGCGTCCACGCCCTCGTCTCGTCCGCGCCCT	MKNPEQAEQAEQ QREETRPRRPRP RPRRPRRPRRPR

<b>s-R-H8</b>	CGTCCGagcgcgtctcgtccgctGGGTCTCCAACGGCAGAGGCA GCAGGTTGTGGTACAGCAGAAGCAGCTCCGGGTAGCGA GCCTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGA ATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTTCAGAGCCGGC GACGAGCGGTTTCGGAAACGCCGGGTACTGCTGAAGCGG CTGGTTGTGGTACTGCTGAAGCTGCATCGACCGAACCA GCCGAAGGTTCCGGCACCGGTTACTAGCGAGAGCGCAACC CCTGAAAAGCGGTCCGGGCAGCCGGCAGGTTCTCCAACC AGCACCGAAGAAGGTTCCCTGCTACTGCCGAAGCTGCA GGCTGCGGTACTGCGGAGGCGGCTCCCAACTTCTACT GAGGAAGGTAAGTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAAGCGG TCCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACC AGGCACTTCTGAGTCTGCTACTACCGCCGAAGCCGCTGG TTGTGGTACCGCAGAAGCTGCATCTGAGACTCCAGGCAC TTCTGAGTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCTGTTCTGA ACCAGTACTTCCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGA GTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTACCGCGGAAGCGGCTGG TTGTGGTACTGCAGAGGAGGCTGGTTCTCCGGCTGGTAG CCCGACGAGCAGGAGGAGGTTACGCTGAATCTGCAA CGCCGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGCTCTG GCAGCGAAACCCCGGTTACCGCGCGGAAGCGGCAGGT TGTGGCACCGCGGAGGAGCAGCTGGTTCTCAACCTCT ACCGAGGAGGTTACCGCGAGGTAGCCGACTAGCAC TGAAGAAGGTAAGTACGACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTG CTCCGGGTACGAGCGAGACCGGCAGAAGCCGCTGGCt gcGGTACTGCTGAAGCGGCAACCCCTGAGAGCGGCCAG GTACTTCTGAGAGCGCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTA GCGAGCCGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCCGG AACCAGCGACCAGCGGTACCGCTGAAGCCGCAAGTgtGG CACTGCGGAAGCTGCAACCGAAGAGGGTACCAGCACGG AACCGAGCGAGGGTTCTGCCCGGGTACTTCCACCGAAC CATCGGAGGGCTCTGCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGT CTGGTTCTGAAACCGCGACTGCAGAAGCGGCTGGTgtGG CACCGCCGAAGCAGCTagcgcctctcgtccgcaCATCACCATCA CCACCATCATCACTAA	PSASRSAGSPTAE AAGCGTAEAAPGS EPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEP ATSGSETPGTAE AGCGTAEAASTEP SEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPT STEEGSPATAEAA GCGTAEAAAPTST EEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAP GTSEATTAEEAG CGTAEAASETPGT SESATPESGPGSE PATSGSETPGTSE SATPESGTAEAG CGTAEAAAGSPAGS PTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSG SETPGTTAEAAAG GTAEAAAGSPTST EEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAP GTSESTAEAAAGCG TAEAAATPESGPGT SESATPESGPGSE PATSGSETPGSEP ATSGTAEAAAGCGT AEAATEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSG SETPTAEAAAGCGT AEAASASRSANHH HHHHH
---------------	---	---

Пример 16. Конструирование 1xAmino, 9xThiol-XTEN864.

Праймеры PhoAfor&RP11-SASRSABsIrevAGGT применяли для проведения ПЦР плазмиды, содержащей маркер N-term-RP11 для получения продуктов ПЦР N-term-RP11-R. Проводили очистку гелем полосы необходимого размера и расщепляли ее при помощи NdeI/BsaI для получения первой вставки. Другую ПЦР проводили с праймерами AE432BsaIforAGGT&AE432\_001BbsIrev-AACG для плазмиды, содержащей XTEN\_AE864\_003 для получения продуктов ПЦР XTEN\_AE432. Проводили очистку гелем полосы необходимого размера, которую затем расщепляли при помощи BsaI/BbsI для получения второй вставки. Расщепление конструкции N-term-RP11-R-AE432\_9Cys-R-H8 из примера 10 проводили при помощи NdeI/BsaI для того, чтобы удалить фрагмент N-term-RP11-R, а очистку гелем проводили для получения крупного фрагмента в качестве вектора. Проводили лигирование вектора с первой и второй вышеописанными вставками, а полученный продукт использовали для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-XTEN\_AE864 (C444, C495, C546, C597, C649, C700, C751, C802, C854)-R-H8. Полученную в результате конструкцию расщепляли для получения предшественника N-term-RP11-R-AE864\_9Cys-R-H8 (последовательность в табл. 39, ниже), продукт которого позволяет создавать 1xAmino, 9-Thio-XTEN864 после удаления маркера N-term-RP11 и маркера C-term 8xHis при помощи расщепления трипсином. Конечный продукт содержал N-концевую аминокислотную группу и девять цистеинов в последовательности XTEN864 для конъюгации (Seg 175).

## ДНК- и аминокислотная последовательность для 1xAmino, 9-Thio-XTEN864

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
N-term- RP11-R- AE864_9Cy s-R-H8	ATGAAAAACCCAGAGCAAGCAGAAGAACAAGCTGAAG AACAGCGCGAAGAAACACGTCCGCGTCCCTCGCCACGT CCACGTCCGCGTCCACGCCCTCGTCCCTCGTCCGCGCCCT CGTCCGagcgcgtctcgttccgctGGGTCTCCAGGTAGCCAGCTG GTAGCCCAACCTTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCG CTACTCCAGAATCCGGTCTGGTACTAGCACTGAGCCAA GCGAAGTTCTGCTCCAGGCTCCCGCGCAGGTAGCCCTA CCTTACCGAAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAG GGTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGC AGTGCTCCGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAATCC GGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACT CCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCA GGTTACCGGCGGGTAGCCGACGAGCACGGAGGAAGG TACCTCTGAGTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCAC GAGCACCGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGGTACCA GCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTCTCCG GCGGGTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGTCCACT GAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCGACTGA ACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTG CGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCA AGCGAAGGCAGCGCCCAAGTACCTCTGAATCTGCTACC CCAGAACTGGCCCCGGGTCCGAGCCAGCTACCTCTGGT TCTGAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGT AGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTC CCCTGGTACGTGAAAGCGCTACCCTGAAAGCGGC CCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCGGTCCA GGCTTCCAGCAGGTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC ACCTCTGAGTCTGTACCCCTGAATCTGGTCTGGTCC GAACCTGTACTCTGGTCCGAAACTCCAGGTACTCTG GAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCAC GGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACAGGTACCAGCACTG AGCCTTCTGAGGGTCTGACCCGGTACCTCCACGGAAC TTCCGGAAGTTCTGCGCCGGTACCTCCACTGAGCCAT CCGAGGGTTACGACCAAGTACTAGCACCGAACCCTCC GAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCGTCCGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAA GCCCGAAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCGGAAGGT TCCGACCAACGGCAGAGGCAGCAGGTTGTGGTACAGC AGAAGCAGTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAGCGGTT CTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGT CCGGTCCAGTTCTAGAGCCGGCAGCGGTTCTCGAA ACGCGGGTACTGTGAAGCGGCTGGTTGTGGTACTGCT GAAGCTGCATCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACC GGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGG GCAGCCCGCAGGTTCTCAACCAGCACCGAAGAAGGT TCCCTGCTACTGCCGAAGCTGCAAGCTGCGGTACTGCG GAGGCGGCTCCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCT GAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGCTCTGGTACTTCCACT GAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAAGGCACTTCTGAGTCT	MKNPEQAEAE QRETRPRRPRP RPRRPRRPRRPR PSASRSAGSPGSP AGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTST PSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGS PGTSESATPESG GTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSE PATSGSETPGTSE SATPESGPGTST PSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTST EGTSTEPSEGSAP TAEAAAGCGTAEAA PGSEPATSGSETP GTSESATPESGPG SEPATSGSETPGT AEAAGCGTAEAA TEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPATA EAAGCGTAEAA TSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPE
	GCTACTACCGCCGAAGCGCTGGTTGTGGTACCGCAGAA GCTGCATCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACG CCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGC AGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAG TCTGGTACCGCGGAAGCGGCTGGTTGTGGTACTGCAGAG GCAGCTGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACCGAGCACGGAG GAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCC AGGTTCCGGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAAACCCCGG GTACCACGGCGAAGCGGCAAGTTGTGGCACCGCGGAG GCAGCAGCTGGTTCTCCAACCTTACCGAGGAGGGTTCA CCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAG CACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTCTCCGGGTACGAGCG AGAGCACGGCAGAAGCCGCTGGTgcGGTACTGCTGAAG CGGAAACCCCTGAGAGCGGGCCAGGTACTTCTGAGAGC GCCACTCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACC TCCGGCTCAGAAACTCTGGTTCGGAACCAGCGACCGAGC GGTACCGCTGAAGCCGCAAGTgtGGCACTGCGGAAGCTG CAACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGT TCTGCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGGCTCT GCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACG CCGACTGCAGAAGCGGCTGGTgtGGCACCGCCGAAGCAG CTagcctctcgtccgcaCATCACCATCACCATCATCACTA A	AAGCGTAEAASET PGTSESATPESGP GSEPATSGSETPG TSESATPESGTAE AAGCGTAEAAAGSP AGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPA TSGSETPGTTAEA AGCGTAEAAAGSP TSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEG SAPGTSESTAEAA GCGTAEAAATPESG PGTSESATPESGP GSEPATSGSETPG SEPATSGTAEAA CGTAEAAATEEGTS TEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPA TSGSETPTAEAA CGTAEAAASARSA HHHHHHHH

### Пример 17. Ферментация XTEN для конъюгации.

Стартовые культуры получали путем инокуляции исходных глицероловых растворов *E. coli*, несущей плазмиду, содержащую подходящие XTEN для конъюгации белковых последовательностей, в 125 мл ЛБ-среды, содержащей 50 мкг/мл канамицина. Затем культуры встряхивали на протяжении ночи при 37°C. Стартовую культуру применяли для инокуляции 2 л среды для периодической ферментации, содержащей 12,5 г сульфата аммония, 15 г безводного двухосновного фосфата калия, 2,5 г дигидрата цитрата натрия; 8,5 г моногидрата одноосновного фосфата натрия; 50 г соевого пептона NZ BL4 (Kerry Bioscience #5X00043); 25 г экстракта дрожжей (Teknova #Y9020); 1,8 л воды; 0,5 мл полипропиленгликоля; 2,5 мл раствора следовых элементов (Amunix recipe 144-1); 17,5 мл 1М сульфата магния и 2 мл канамицина (50 мг/мл) в 5-л стеклянном сосуде с рубашкой с В контроллером В. Braun Biostat. Настройки управления ферментацией были следующими: pH 6,9±0,1; dO<sub>2</sub> = 10%; каскад растворенного кислорода в режиме перемешивания в диапазоне 125-1180 об/мин; поток воздуха 5 л/мин с 90% кислорода; начальная температура 37°C; основной контроль 13% гидроксид аммония; отсутствие кислотного контроля. После 6 ч культивирования инициировали подпитку 50% глюкозой при скорости 30 г/ч. После 20 ч культивирования добавляли 25 мл 1М сульфата магния и 3 мл 1М ИПТГ. После истечения общего времени ферментации в 45 ч культуру собирали при помощи центрифугирования, получая сгустки из клеток в 0,45-1,1 кг влажной массы для всех конструкций. Сгустки хранили замороженными при -80°C до дальнейшего использования. Образцы культур брали в разные временные точки на протяжении процесса ферментации, клетки лизировали, затем клеточный дебрис флоккулировали при помощи нагревания и быстрого охлаждения, очищенные растворимые лизаты готовили для центрифугирования и анализировали при помощи невосстанавливающего SDS-PAGE в постоянном поле с применением NuPAGE 4-12% Bis-Tris геля от Invitrogen согласно инструкции производителя с окрашиванием Кумасси. Пример накопления гибридного белка XTEN как функции от времени ферментации показан на фиг. 45. Результаты показывают, что гибридные белковые конструкции XTEN экспрессировались при ферментации с титрами >1 г/л, с кажущейся молекулярной массой, составляющей около 160 кДа (замечка: фактическая молекулярная масса составляет 100 кДа. Наблюдаемая миграция в SDS-PAGE была сравнима с той, которую наблюдали для других XTEN-содержащих гибридных белков).

Пример 18. Очистка реагента 1xThiol-XTEN (цистеин-сконструированный XTEN) при помощи меток CBD и His8.

Данный пример описывает очистку цистеин-сконструированного XTEN, содержащего один остаток цистеина.

#### Материалы и методы.

##### 1. Очистка.

20 г клеточной пасты, полученной при ферментации, перерастворили в 100 мл 20 мМ фосфата натрия, pH 8,0 (лизисный буфер). Лизат клеток трижды гомогенизировали в гомогенизаторе при приблизительно 800-900 барах. 50 мл лизисного буфера использовали в качестве вытеснителя, чтобы изъять остаточный объем из гомогенизатора. Гомогенизированный лизат инкубировали в водяной ванне при 85°C на протяжении 20 мин с последующим быстрым охлаждением в ванне с ледяной водой на протяжении 20 мин. После обработки нагреванием и охлаждением лизат центрифугировали при 11000 об/мин на протяжении 90 мин в центрифуге SORVALL. После центрифугирования надосадочную жидкость профильтровывали через два фильтра CUNO Bio cap 25 (BC0025L90SP08A). Фильтры прочищали при помощи 40 мл лизисного буфера. Конечный объем очищенного материала составил 230 мл. Очищенную надосадочную жидкость хранили при 4°C на протяжении ночи.

##### 2. Этап захвата: хроматография с гидрофобным взаимодействием.

Хроматографию с гидрофобным взаимодействием применяли на первом этапе, используя гидрофобный маркер CBD для XTEN для подтверждения захвата N-концевого интактного белка. Для пакования XK16 до высоты слоя в 15 см (30 мл объема колонки) использовали Toyopearl Phenyl 650M (Part # 0014783, TOSOH Bioscience). Хроматографию проводили, используя АКТА FPLC (GE Biosciences). Перед загрузкой смолу Toyopearl Phenyl уравнивали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 1М сульфата натрия, pH 8,0. Нагрузку HIC готовили путем добавления сульфата натрия до концентрации 1М в очищенный вышеприведенным способом лизат (конечный объем ~250 мл). Образец загружали на смолу HIC (~4 мг/мл нагрузки из смолы) при 2 мл/мин. Загрузку завершали заполнением ~9 объемами колонки равновесного буфера (20 мМ фосфата натрия, 1М сульфата натрия, pH 8,0) до того момента, пока UV215 был стабильным.

Белок поэтапно элюировали при помощи 100% В (20 мМ фосфата натрия, pH 8,0). Для подтверждения полного элюирования применяли в общем счете 7 объемов колонки элюционного буфера (фиг. 46).

Образцы анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (невосстанавливающего) для определения элюционного пула (фиг. 47). На основании последующего элюирования в геле фракции E1, E2, E3 и E4 были отобраны для дальнейшей обработки. Общее количество белка было оценено в 85 г в элюционном пуле HIC с 65% выходом на этапе, определенном путем прогонки другого количественного геля.

##### 3. Этап полировки/захвата: Toyopearl IMAC хроматография.



На этапе захвата применяли аффинную хроматографию IMAC для связывания с интактной С-концевой His-маркером XTEN. Хроматографическую колонку XK26 паковали Toyopearl IMAC 650M (Part #0014907, TOSOH Biosciences) с высотой слоя в 15 см (85 мл объема колонки). Колонку уравнивали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ имидазола, 0,25M NaCl, pH 8,0 (равновесный буфер). Нагрузку IMAC готовили, добавляя 5M NaCl в элюционный пул HIS чтобы получить 0,25M NaCl в конечном объеме. Образец загружали на смолу IMAC при скорости потока в 4 мл/мин. Загрузку завершали 2 объемами колонки равновесного буфера. Смолу промывали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ имидазола, pH 8,0 для удаления соли. Линейное элюирование проводили от 0 до 100% В в 7 объемах колонки с буфером А (20 мМ фосфата натрия, 10 мМ имидазола, pH 8,0) и буфером В (20 мМ фосфата натрия, 200 мМ имидазола, pH 8,0) с последующим добавлением 2 объемов колонки 100% В. Наличие имидазола обуславливало поглощение на UV 215, составляющее около 3500 мЕа с АКТА FPLC, поэтому элюционный пик не наблюдали. Профильтрованные, отмывые и элюированные фракции анализировали при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE геля (фиг. 48). Гель показал успешное удаление белка клеток-хозяев и процессированные группы XTEN (фиг. 48А). Фракции С5, С6 и С7 объединяли на основе данных по второму гелю (фиг. 48В). Всего в элюционном пуле IMAC было обнаружено 70 мг белка.

#### 4. Расщепление трипсином элюционного пула IMAC.

Расщепление трипсином элюционного пула IMAC проводили в соотношении 1:200 м/м. 0,35 мг трипсина из поджелудочной железы быка (Sigma, cat #T1426) инкубировали вместе с 70 мг белка (элюционный пул IMAC) на протяжении ночи при 37°C. Анализ при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE проводили для подтверждения того, что расщепление маркера CBD было полным, как показано на фиг. 49.

#### 5. Этап полировки: MacroCap Q хроматография.

После расщепления трипсином отщепленные маркеры отделяли при помощи MacroCap Q хроматографии. Колонку XK 16 паковали MacroCap Q (GE Life Sciences, Cat #17-5469-02) с высотой слоя в 18 см. Расщепленный трипсином элюционный пул IMAC инкубировали на протяжении 1 ч при 37°C с 2 мМ ТХЭФ для снижения количества димеров XTEN перед загрузкой в колонку MacroCap Q. Колонку уравнивали 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. Образец загружали при 4 мл/мин (~2 мг/мл нагрузки смолой). Загрузку колонки завершали добавлением 2 объемов колонки 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ pH 7,0. Колонку промывали 2 объемами колонки (20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, 150 мМ NaCl pH 7,0). Проводили линейное градиентное элюирование от 150 до 500 мМ NaCl в буфере из 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, pH 7,0 в 20 объемах колонки. UV 215 наблюдали на высоком уровне на протяжении всего процесса хроматографии (фиг. 50) благодаря наличию ТХЭФ, но при этом наблюдали элюционный пик от 22 до 30 мСм/см. Все образцы анализировали при помощи SDS-PAGE, окрашивания серебром и C18 RP-HPLC. Удаление расщепленных CBD наблюдали в профильтрованных образцах (фиг. 51А), в то время как слабоинтенсивные полосы XTEN наблюдали в элюционных фракциях (фиг. 51В) в элюционных фракциях E11, E12, F12, F11, F10, ..., F6. Отделение процессированных групп XTEN наблюдали при помощи окрашивания серебром в более ранних элюционных фракциях E11, E12, F12 и F11 как в группах, мигрирующих быстрее, чем основной полипептид XTEN (фиг. 51С). На основании вышеприведенных результатов элюционные фракции дополнительно анализировали при помощи C18 RP-HPLC. На фиг. 52 показана группа профилей RP-HPLC анализа. Более ранние элюционные фракции имеют широкое главное плечо, указывающее на существенное присутствие процессированных групп. Также эти более ранние элюционные фракции (E12, F12 и F11) обогащали протеолизисными маркерами. На основе вышеприведенного анализа были объединены элюционные фракции F10, F9, F8, F7 и F6. Элюционный пул снова анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 53). Обнаружили, что очищенный белок был очищен на 97,5%.

#### 6. Концентрирование и диафильтрация (получение конечного препарата).

Вышеупомянутый пул MacroCap Q концентрировали при помощи центрифуги Amicon Ultracel-15 (НОММ 10к) до 5 мл с последующей 7X диафильтрацией с 20 мМ ГЭПЭС pH 7,0 до конечной концентрации белка, составляющей 8,13 мг/мл. Всего из 20 г сгустка клеток было очищено 43 мг белка. Общее выделение для трех этапов хроматографии оценили в ~33%.

#### Пример 19. Очистка реагента 1xAmino-XTEN с маркерами CBD и His8.

Очистку amino-XTEN проводили практически таким же способом, который описан для очистки 1xThiol-XTEN, содержащего один цистеин (для подробностей см. пример 15). 20 г клеточной пасты, полученной при ферментации, гомогенизировали в 100 мл 20 мМ фосфата натрия, pH 8,0 (лизисный буфер), обрабатывали теплом и очищали при помощи центрифугирования и фильтрации. Хроматографию с гидрофобным взаимодействием применяли на первом этапе для захвата N-концевого интактного белка. (фиг. 54). Фракции E2, E3 и E4 объединяли для дальнейшей обработки. Аффинную хроматографию IMAC использовали на этапе захвата для связывания интактного С-концевого His-маркера XTEN (фиг. 55). Фракции E2 и E3 объединяли. Расщепление трипсином элюционного пула IMAC проводили в соотношении 1:200 м/м на протяжении ночи при 37°C. После этого отщепленные трипсином маркеры отделяли при помощи MacroCap Q хроматографии. Фракции анализировали при помощи SDS-PAGE с последующим окрашиванием серебром (фиг. 56) и C18 RP-HPLC (фиг. 57). На основе вышеприведенного ана-

лиза были объединены элюционные фракции C10, C11 и C12. Элюционный пул анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 58). Было обнаружено, что белок очищен на >98%. Пул MacroCap Q концентрировали при помощи центрифуги Amicon Ultracel-15 (HOMM 10к) при 3000 об/мин до 5 мл с последующей 7X диафильтрацией при помощи 20 мМ ГЭПЭС pH 7,0 до конечной концентрации белка в 5,35 мг/мл.

Пример 20. Очистка и оценка системы RP11/His8-XTEN с двумя маркерами.

Используя вышеописанные экспрессионные векторы, конструировали белки XTEN с двумя маркерами для кодирования гибридных белков со следующими аминокислотными последовательностями или компонентами:

МКИКТГАРИЛСАЛТТММФСАСАЛААРТТАГAG-Tag-XTEN\_AE869(Am1)-RHHHHHHHH, где МКИКТГАРИЛСАЛТТММФСАСАЛА является распознающей последовательностью MalE, которая отщепляется от экспрессируемого полипептида и транспортируется в периплазму клетки-хозяина, АРТТАГAG является спейсером, а маркер выбран из следующих (название маркера сопровождается последовательностью в скобках): RP5 (RPRPRPRPRPRPGR); RP7 (RPRPRPRPRPRPGR); KP5 (KPKPKPKPKPGR); RP9 (RPRPRPRPRPRPRPGR); RP11 (RPRPRPRPRPRPRPRPGR); P5K4P9 (RPRPKPRPKPRPKPGR) и R6K5P11 (RPRPKPRPKPRPKPGR). Были созданы все вариации конструкций с маркерами, а белки экспрессировались в *E.coli* при помощи описанных в примере 15 методов. Из клетки-хозяина получали растворимые экстракты для проведения анализа при помощи SDS-PAGE/окрашивания Кумасси. Согласно анализу длина и аминокислотный состав N-концевого маркера не оказывали существенного влияния на экспрессию белка (см. фиг. 59) в случае экспрессии конструкций с маркерами RP7, RP9, RP11 и R6K5P11. Экспрессируемые белки с белковыми маркерами RP5, RP7, RP9 и RP11 дополнительно исследовали на предмет связывания со смолой MacroCap SP. Белки с более длинными маркерами связывались более эффективно с катионообменной смолой, а оставшиеся связывались в более жестких отмывочных условиях. Таким образом, маркер RP11 выбрали в качестве N-концевого маркера для очистки XTEN при помощи катионообменной хроматографии. Дополнительный эксперимент показал, что полипептид RP11-XTEN-His8 эффективно экспрессировался в биореакторе, а большая часть экспрессируемого белка была обнаружена в клеточном супернатанте (фиг. 60).

Пример 21. Очистка реагента системы 1x Amino-XTEN с двумя маркерами RP11/H8.

#### 1. Экспрессия.

Предшественник RP11-XTEN-His8 для 1x Amino-XTEN получали путем экспрессии в трансформированных *E. coli*, применяя вышеописанную 4 л реакцию ферментации. Клетки собирали при помощи центрифугирования и замораживали при -80°C до использования.

#### 2. Лизис и очистка.

25 г клеточной пасты пеперастворяли в 75 мл 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК. Лизис проводили путем трехкратного пропускания перерастворенной пасты через гомогенизатор при 800-900 барах. Гомогенат выдерживали при 85°C в водяной ванне на протяжении 15 мин перед тем, как быстро охладить, используя ледяную/водяную ванну, пока температура не падала ниже 10°C. Затем обработанный гомогенат центрифугировали при 10, 000 об/мин на роторе SLA-3000 на протяжении 60 мин. Надосадочную жидкость собирали и фильтровали, используя 0,22 мкм фильтрующую насадку.

#### 3. Этап катионообменного захвата.

На этапе захвата применяли катионообменную хроматографию для подтверждения N-концевой целостности продукта. Из нескольких катионообменных сред выбрали смолу MacroCap SP (GE Life Sciences) благодаря ее превосходной емкости и избирательности по отношению к продукту. 20 мл колонку MacroCap SP паковали в среду Redi-Sep и уравнивали буфером из 20 мМ фосфата натрия (pH 8,0), 20 мМ NaCl. Лизат загружали в колонку при помощи гравитации. Три объема колонки (ОК) 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 100 мМ NaCl применяли на этапе отмывки перед тем, как проводить этап элюирования белка с 3 ОК 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 500 мМ NaCl. Половину фракций ОК (10 мл) собирали для элюатов и анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (фиг. 61). Элюционные фракции 2-4 объединяли для последующего этапа хроматографии.

#### 4. Этап полировки IMAC.

20-мл колонку ToyoPearl AF-Chelate паковали в колоночную среду Redi-Sep и заряжали 100 мМ сульфата никеля. Колонку уравнивали 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 500 мМ NaCl перед тем как загружать пул MacroCap SP в колонку при помощи гравитации. Применяли два отмывочных этапа, используя буфер из 20 мМ фосфата натрия (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазола, а затем 20 мМ фосфата натрия (pH 8,0), 5 мМ имидазола. Затем продукт элюировали из колонки, используя 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ имидазола, а половину фракций ОК (10 мл) собирали для 4 ОК элюата. Образцы на каждом этапе исследовали при помощи 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE (фиг. 62). На основе данных по гелю элюаты 2 и 3 объединяли для дополнительной обработки. Общий выход составил 30%.

#### 5. Расщепление трипсином элюционного пула IMAC.

Расщепление трипсином элюционного пула IMAC проводили в соотношении 1:200 и 1:500 м/м путем добавления 1 мг/мл бычьего трипсина (Sigma, Cat #T1426, трипсин из поджелудочной железы быка)

в пул ИМАС. Реакционную смесь выдерживали при 37°C на протяжении ночи, а завершение расщепления подтверждали при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF. Образцы до и после расщепления анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris-SDS/PAGE с окрашиванием Кумасси и серебром (фиг. 63). Менее интенсивное окрашивание в окрашенном Кумасси геле, а также сдвиг по молекулярной массе для образцов после расщепления по сравнению с образцами до расщепления указывает на успешное удаление как N-, так и C-концевых меток. В окрашенном серебром геле после расщепления наблюдали гомогенные полосы, предполагающие отсутствие в образце процессированных групп, подтверждая вывод о том, что система с двумя маркерами RP11/H8 и методы очистки обеспечивают гомогенный конечный продукт XTEN.

Пример 22. Очистка XTEN с аффинными маркерами RP11 и His8.

1. Экспрессия.

Гибридный белок RP11-XTEN-His8 с двумя аффинными маркерами, присоединенными к XTEN в N- и C-концах, соответственно, экспрессировался в *E.coli* с применением 4 л реакции ферментации с вышеописанными условиями.

2. Лизис и очистка.

После выращивания клетки собирали при помощи центрифугирования и замораживали при -80°C до использования. Клеточный сгусток перерастворили в лизисном буфере (20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК pH 8,0, 3 мл буфера на 1 г клеточной пасты). Клетки лизировали, трижды пропуская их через гомогенизатор APV при давлении в 830-900 бар. Лизисный буфер (1 мл буфера на 1 г клеточной пасты) использовали в качестве вытеснителя, чтобы изъять остаточный объем из гомогенизатора. Гомогенизированный лизат инкубировали в водяной ванне при 85°C на протяжении 20 мин, а затем быстро охлаждали в ванне с ледяной водой на протяжении 20 мин. После обработки нагреванием и охлаждением лизат центрифугировали на скорости 11000 об/мин на протяжении 90 мин в центрифуге SORVALL. После центрифугирования надосадочную жидкость профильтровывали через два фильтра CUNO Bio cap 25 (BC0025L90SP08A). Очищенную надосадочную жидкость хранили при 4°C на протяжении ночи.

3. Этап захвата: Тоуорpearl ИМАС хроматография.

Аффинную хроматографию ИМАС применяли в качестве этапа захвата для связывания XTEN с интактным C-концевым His-маркером. Вкратце, хроматографическую колонку BPG140/12 (GE Life Sciences) паковали 2000 мл 650М смолы Тоуорpearl ИМАС (TOSOH Biosciences). Колонку уравнивали 2 объемами колонки (ОК) равновесного буфера (20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, pH 8,0). Очищенный клеточный лизат доводили до конечной концентрации NaCl в 500 мМ, используя 5М маточного раствора NaCl, и затем загружали в ИМАС смолу. Колонку промывали 2 объемами колонки равновесного буфера, а затем 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазола pH 8,0, а затем 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 5 мМ имидазола pH 8,0, чтобы удалить соль. Элюирование проводили с 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ имидазола, pH 8,0. Профильтрованные, отмытые и элюированные фракции анализировали при помощи невозстанавливающего 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE/окрашивания Кумасси, а фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли.

4. Этап полировки/захвата: МасроСар SP хроматография.

На этапе полировки применяли катионообменную хроматографию для подтверждения N-концевой целостности продукта. Из нескольких катионообменных сред выбрали смолу МасроСар SP (GE Life Sciences) благодаря ее превосходной емкости и избирательности по отношению к продукту. 1000 мл смолы МасроСар SP паковали в а хроматографическую колонку BPG100/13 (GE Life Sciences) и уравнивали 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 20 мМ NaCl. Пул ИМАС загружали в колонку, а смолу промывали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, pH 8,0 и 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 150 мМ NaCl. Белок элюировали с 5 объемами колонки линейного градиента от 150 до 500 мМ NaCl в 20 мМ фосфата натрия pH 8,0. Фракции собирали и анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris-SDS-PAGE. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли для следующего этапа.

5. Расщепление трипсином элюционного пула Масросар SP.

Расщепление трипсином (сигма трипсин поджелудочной железы быка) элюционного пула SP проводили при соотношении фермент/белок 1:200 м/м на протяжении ночи при 37°C.

6. Этап полировки: Масросар Q хроматография.

После расщепления трипсином отщепленные маркеры отделяли от конечного продукта при помощи Масросар Q хроматографии. Колонку BPG100/19 (GE Life Sciences) паковали 1500 мл объема колонки смолы Масросар Q (GE Life Sciences). Расщепленный трипсином элюционный пул Масросар SP инкубировали на протяжении 15 мин при 80°C с 20 мМ ДТТ и 2 мМ ЭДТК для того, чтобы восстановить дисульфидные связи и инактивировать трипсин. Охлажденный белковый раствор разбавляли до проводимости ниже 5 мСм/см водой Milli-Q и загружали в колонку Масросар Q, уравнированную 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0. Колонку промывали 2 объемами колонки 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0, затем 2 объемами колонки 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, 150 мМ NaCl pH 7,0. Белок элюировали с линейным градиентом от 150 до 500 мМ NaCl в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0 в 20 объемах колонки. Фракции анализировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром.

#### 7. Концентрирование и диафильтрация (получение конечного препарата).

Выбранные фракции MacroCap Q смешивали и концентрировали, используя 10 КД Pellicon mini (Millipore) при давлении подачи питания <20 фунтов на кв.дюйм и ретенгата <8 фунтов на кв.дюйм, за чем следовала 10X диафильтрация 20 mM ГЭПЭС, 50 mM NaCl, pH 7,0 для достижения конечной концентрации белка >5 мг/мл.

#### 8. Анализ степени очистки белка, очищенного разными методами.

Одну партию (партия 1) очищали в три этапа очистки, как описано выше. Другую партию (партия 2) очищали из того же самого ферментированного материала, но при этом пропускали этап полировки MacroCap SP. Процессированные группы XTEN детектировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром в элюционных фракциях MacroCap Q для партии 2 (фиг. 87A), при этом в элюционных фракциях MacroCap Q для партии 1 практически отсутствовали процессированные варианты (фиг. 87B). Данные результаты позволяют предположить, что в применяемых условиях этап MacroCap SP на основе маркера RP11 является существенным для подтверждения N-концевой целостности и общего качества продукта, а также что система с двумя маркерами RP11/H8 и методы очистки обеспечивают гомогенный конечный продукт XTEN.

#### Пример 23. Конъюгация линкера ДБЦО-Мал с 3xThiol-XTEN для создания предшественника XTEN.

Цистеин-сконструированный сегмент XTEN из 3x-Thiol-XTEN (XTEN\_AE905 (Am1,C8,C453,C898, Seg 174)) готовили для реакции в виде 193 мкМ (16 мг/мл) раствора в 20 mM ГЭПЭС, pH 7,0, 50 mM NaCl. ДБЦО-малеинимид (Click Chemistry Tools, Inc., cat. #A108) растворяли в ДМФ до конечной концентрации в 50 mM. Аликвоту 3xThiol-XTEN (5,1 мг, 320 мкл) восстанавливали при помощи 10 mM недавно перерастворенного ДТТ при 70°C на протяжении 20 мин. Образец белка разводили водой до общего объема в 600 мкл. Добавляли 1200 мкл 100% ацетонитрила и центрифугировали смесь при 13000 об/мин на протяжении 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, добавляли 1000 мкл 80% ацетонитрила и центрифугировали смесь при 13000 об/мин на протяжении 1 мин. Этап отмывки повторяли еще один раз. Сгусток растворяли в 300 мкл 100 mM ГЭПЭС pH 7,0. Добавляли 7,7 мкл 50 mM раствора ДБЦО-малеинимид в ДМФ (молярное соотношение 3xThiol-XTEN к ДБЦО-малеинимиду составляло 1:6) и инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи анализа C18 RP-HPLC (фиг. 64A). Белковую смесь очищали при помощи хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), используя 1,6 мл бутиловую колонку Toyopearl. Элюирование проводили в 30 объемах колонки с понижающимся градиентом сульфата аммония от 1,05 до 0,3M в 20 mM фосфатного буфера, pH 7,0 при скорости потока 0,5 мл/мин (фиг. 64B). Хроматографические фракции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 64C).

#### Пример 24. Расщепление трипсином и очистка дважды меченого предшественника.

##### Расщепление трипсином.

Дважды меченный (CBD/His8) предшественник XTEN\_AE870\_Am1,C1 хорошо окрашивается Кумасси благодаря наличию последовательности CBD, в то время как немеченая версия XTEN\_AE870\_Am1,C1 плохо окрашивается Кумасси, но ее можно детектировать при помощи окрашивания серебром. Следовательно, завершение расщепления трипсином отслеживали при помощи методов окрашивания как Кумасси (фиг. 65A), так и серебром (фиг. 65B). Дважды меченный предшественник XTEN\_AE870\_Am1,C1 расщепляли, применяя разные соотношения бычьего трипсина и свиного трипсина по протеономической шкале (положительный контроль) в 20 mM фосфатного буфера, pH 8. Инкубация на протяжении ночи при 37°C позволила получить более полное расщепление, чем инкубация на протяжении ночи при 25°C, что показали данные по детектированию оставшейся окрашенной Кумасси полосы дважды меченого предшественника в 160 кДа (фиг. 65A: все соотношения являются соотношениями масса/масса трипсина к субстрату). Фиг. 65B показывает, что при соотношениях 1:100, 1:200 и 1:500 расщепление происходит с бычьим трипсином, а при 1:100 расщепление происходит со свиным трипсином, что приводит к эффективному расщеплению предшественника XTEN.

##### MacroCap Q очистка расщепленного трипсином дважды меченого предшественника.

Для расщепления на протяжении ночи при 37°C использовали соотношение 1:200 бычьего трипсина к дважды меченому предшественнику (мас./мас.). Фиг. 66A показывает >90% преобразования дважды меченого предшественника в расщепленный продукт. Это демонстрировало исчезновение после расщепления окрашенной Кумасси полосы в ~160 кДа и появление фрагмента CBD в 20 кДа.

Расщепленный трипсином материал подвергали поэтапной очистке с применением анионообменной смолы MacroCap Q и следующих буферов: А: 20 mM ГЭПЭС, 50 mM NaCl, pH 7,5 и В: 20 mM ГЭПЭС, 500 mM NaCl, pH 7,5. Расщепленные материалы загружали при помощи гравитации и элюировали поэтапным методом, используя последовательную отмывку 3 объемами колонки 0, 20, 40, 60, 80 и 100% буфером В. XTEN\_AE870 элюировали в 60% В. Фиг. 66B показывает, что расщепленный фрагмент CBD не связывался с MacroCap Q в применяемых условиях и был полностью отделен от XTEN. Поэтапное элюирование XTEN от MacroCap Q только частично отделяет процессированные полипептиды. Лучшего отделения достигали при помощи градиентного элюирования XTEN (фиг. 66C).

##### Исследование остаточной активности трипсина.

Для исследования наличия остаточной активности трипсина в конечных составах препаратов XTEN

образец белка смешивали с синтетическим пептидом [G2]GLP2 в соотношении мас./мас. 10:1. Положительный контроль для расщепления содержал пептид [G2]GLP2 и бычий трипсин; отрицательный контроль содержал только пептид [G2]GLP2. Все образцы инкубировали на протяжении ночи при 37°C. После инкубации образцы блокировали 1% ТФК и подвергали C18 RP-HPLC анализу, используя C18 5 мкм 300 А аналитическую колонку от Phenomenex Jupiter. Буфер А содержал 0,1% ТФК, 99,9% H<sub>2</sub>O по шкале HPLC; буфер В содержал 0,1% ТФК, 99,9% ацетонитрила по шкале HPLC. Анализ проводили, используя градиент от 5% В до 50% В за 45 мин времени элюирования. Фиг. 67 показывает результаты RP-HPLC анализа остаточной активности трипсина в конечном препарате XTEN\_AE869(Am1,C2). На фиг. 67А показан интактный пептид GLP2 (время удержания 41 мин). На фиг. 67В показано расщепление трипсином пептида GLP2 с двумя характерными фрагментами трипсина (время удержания 33,5 мин и 34 мин). Фиг. 67С показывает, что пептид GLP2 остается интактным после инкубации на протяжении ночи с XTEN, и не наблюдается никаких фрагментов трипсина. Этот результат указывает на то, что конечные очищенные MacroCap Q препараты не содержат никакой остаточной активности трипсина.

Пример 25. Ферментация и очистка цистеин-сконструированного XTEN для конъюгации.

*E. coli*, содержащие AC292 на плазмиде, выращивали до насыщения на протяжении ночи в 2хYT, а затем использовали 200 мл этой культуры для инокуляции 25 л культуры среды 2хYT в одноразовом биореакторе. Обе культуры находились в присутствии 50 мкг/мл канамицина. Вторую культуру выращивали до ОП600 в ~1,0 при 37°C, охлаждали до 26°C и индуцировали 12 мл 1М ИПТГ на протяжении ночи. Клеточный сгусток собирали при 4000 об/мин в роторе SLA-3000 на протяжении 20 мин вращения. Сгусток клеток (184 г) перерастворяли в 736 мл 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl. Перерастворенные клетки лизировали при помощи микрофлюидизатора при 20000 фунтах на кв. дюйм, а затем нагревали до 75°C на протяжении 15 минут с последующим быстрым охлаждением на льду на протяжении 30 минут. Затем лизат очищали при помощи центрифугирования. Очищенный лизат загружали в колонку DE52, предварительно очищенную NaOH и уравновешенную 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl. Колонку отмывали 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 150 мМ NaCl и элюировали с 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 250 мМ NaCl. Затем объединенные элюционные фракции загружали в колонку MacroCap Q, предварительно очищенную NaOH и уравновешенную 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl. Колонку отмывали 9 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl, 9 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 100 мМ NaCl и элюировали с 9 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 250 мМ NaCl. Объединенные элюционные фракции доводили до 15% м/о сульфата натрия и затем загружали в октил сефарозную FF колонку, предварительно очищенную NaOH и уравновешенную с Трис pH 7,5. Колонку отмывали 4 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5 15% м/о сульфата натрия и элюировали с 4 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5 15% м/о сульфата натрия. Образец хранили при 4°C и присвоили ему номер # AP197. Очищенный цистеин-сконструированный XTEN может впоследствии служить в качестве подходящего реактанта для конъюгации с нагрузочным веществом, таким как лекарственное вещество из табл. 11, которая приводит к образованию конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

Пример 26. Конъюгация GLP2-Cys с 1xAmino-XTEN для получения конъюгата XTEN-нагрузочное вещество GLP2-XTEN.

1xAmino-XTEN (XTEN\_AE869(Am1)) готовили в виде 67 мкМ (5,35 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Сульфо-СМЦК (Thermo Scientific, cat. # 22322) был свежеприготовленным в виде 100 мМ раствора в ДМСО. 10 мг аминоксид-XTEN (1,87 мл) смешивали с 15-кратно превышающим в молярном отношении количеством сульфо-СМЦК (18,7 мкл) и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Избыточные кросс-линкеры удаляли при помощи фильтрации в центрифуге, используя центрифугу Amicon Ultra-15, НОММ 5к. Реакционную смесь объемом 1,8 мл смешивали с 8 мл 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl и центрифугировали на протяжении 20 мин в центрифуге Sorvall RT6000 при 3000 об/мин, 4°C. Процедуру повторяли еще два раза. Конечный объем восстановленного ретентата составил 1,8 мл. Пептид GLP2-Cys (CSBio, обычный синтез) растворяли в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl до конечной концентрации в 3 мг/мл. N-малеинимид-XTEN смешивали с 2,3-кратно превышающим в молярном отношении количеством пептида GLP2-Cys и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации и полученный в результате конъюгат отслеживали при помощи C18 RP-HPLC. 20 мкг белковых образцов загружали на C18 5 мкм 300А 4,6 мм × 150 мм колонку Phenomenex Jupiter. Белки элюировали с 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте и детектировали по поглощению на 214 нм. Практически все N-малеинимид-XTEN были преобразованы в конъюгат GLP2-Cys-XTEN согласно результатам HPLC и масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI-MS анализ образцов проводили для 100 мкг белковых образцов, обессоленных при помощи центрифуги NanoSep 3K Omega (Pall Corp.). Белковые растворы в 50% ацетонитриле, 0,5% муравьиной кислоте заливали в масс-спектрометр с высоким разрешением при скорости потока в 10 мкл/мин. Спектры получали в диапазоне 800-1600 а.е.м. и пересчитывали в спектры для нулевого заряда при помощи программного обеспечения Bayesian Protein Reconstruction (фиг. 68). Непрореагировавшие XTEN и пептиды GLP2 отделяли от конъюгата при помощи последовательных этапов хроматографии с анионным обменом (MacroCap Q) и гидрофобным взаимодействием (Toyopearl Phenyl). Результаты RP-HPLC а MS-анализа демонстрируют

высокий выход и степень очистки реактантов и конечного продукта (фиг. 68).

Пример 27. Конъюгация GLP2-N-Mal с 1xThiol-XTEN (цистеин-сконструированным XTEN).

1xThiol-XTEN (XTEN\_AE880(Am1,C8) (Seg 181) готовили в виде 122 мкМ (9,84 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Пептид GLP2-N-малеинимид (CSBio, обычный синтез) растворяли в ДМСО до финальной концентрации в 3 мг/мл. 1xThiol-XTEN (8,8 мг в 900 мкл) смешивали с 3-кратно превышающим в молярном отношении количеством пептида GLP2-N-Mal и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации и полученный в результате конъюгат отслеживали при помощи C18 RP-HPLC (20 мкг образцов белка загружали на C18 5 мкМ 300 А 4,6 мм × 150 мм колонку Phenomenex Jupiter. Белки элюировали с 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте и детектировали по поглощению на 214 нм) и масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI-MS анализ образцов проводили для 100 мкг белковых образцов, обессоленных при помощи центрифуги NanoSep 3К Omega (Pall Corp.). Белковые растворы в 50% ацетонитриле, 0,5% муравьиной кислоте заливали в масс-спектрометр с высоким разрешением при скорости потока в 10 мкл/мин. Спектры получали в диапазоне 800-1600 а.е.м. и пересчитывали в спектры для нулевого заряда при помощи программного обеспечения Bayesian Protein Reconstruction. Результаты анализа приведены на фиг. 69. Конъюгат GLP2-XTEN очищали при помощи препаративной C4 RP-HPLC (колонка белка Vydac C4 5 мкМ 300 А 10 мм × 250 мм), используя 5-50% градиент ацетонитрила в 0,1% ТФК в качестве мобильной фазы (см. фиг. 70А). Конечный HPLC-очищенный конъюгат GLP2-XTEN анализировали, используя C18 5 мкМ 300 А 4,6 мм × 150 мм колонку Phenomenex Jupiter (см. фиг. 70В). Выход очищенного конъюгата GLP2-XTEN составил 6,2 мг (70%).

Пример 28. Конъюгация ДБЦО-Мал с 1xThiol-XTEN.

1xThiol-XTEN (XTEN\_AE880(Am1,C8) (Seg 181) готовили в виде 150 мкМ (12 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. ДБЦО-малеинимид (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A108) растворяли в ДМФ до конечной концентрации в 50 мМ. Объем 200 мкл (2,4 мг) 1xThiol-XTEN доводили до 100 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, используя 1М маточного раствора. 1,2 мкл объем 50 мМ ДБЦО-Мал в ДМФ добавляли в белковый раствор (в молярном соотношении 1:2 между 1xThiol-XTEN и реагентом ДБЦО-малеинимид) и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение реакции модификации отслеживали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 71А). Белковую смесь очищали при помощи хроматографии с белковым взаимодействием (HIC), используя 1,6 мл колонку Toyopearl Butyl. Элюирование проводили с 30 об. колонки в понижающемся градиенте сульфата аммония от 1,05 до 0,3М в буфере из 20 мМ фосфата, pH 7,0 при скорости потока в 0,5 мл/мин (фиг. 71В). Хроматографические фракции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 71С).

Пример 29. Получение А-биспецифического конъюгата из моноспецифических предшественников XTEN, связанных в N-концах.

Данный пример описывает создание композиции XTEN-нагрузочное вещество при помощи связывания двух разных предшественников XTEN-нагрузочное вещество в конфигурации N- к N-концу; одного с нагрузочным веществом А и второго с нагрузочным веществом В, что приводит к образованию биспецифического конъюгата.

На первом этапе молекулы XTEN, содержащие множественные цистеины (цистеин-сконструированные XTEN) ,готовили, используя описанную выше систему очистки RP11-His8 с двумя маркерами, и формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Нагрузочное вещество А-малеинимид растворяли в водном растворе 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, ДМФ или ДМЦО либо любом другом подходящем растворителе в зависимости от растворимости реагента. Нагрузочное вещество А-малеинимид добавляли в цистеин-сконструированный XTEN в количестве, которое в молярном отношении в 2-6 раз превышает XTEN, и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи C18 RP-HPLC. Полученный в результате конъюгат нагрузочного вещества и А-XTEN очищали от примесей и непрореагировавших компонентов при помощи препаративной C4-C18 RP-HPLC. Конъюгат нагрузочного вещества и А-XTEN формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Далее конъюгат нагрузочного вещества и А-XTEN дополнительно модифицировали путем добавления дибензилциклооктина (ДБЦО)-NHS эфира или ДБЦО-сульфо-NHS эфира в количестве, которое в молярном отношении в 10-50 превышает XTEN, и инкубировали на протяжении 1-2 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи аналитической C18 RP-HPLC. В случае низкой конъюгационной активности (например, <90%) или образования большого количества неспецифических продуктов конъюгат ДБЦО-нагрузочное вещество и А-XTEN очищали, используя препаративную C4-C18 RP-HPLC. В случае высокой конъюгационной эффективности ДБЦО-NHS эфира (>90%) без существенного присутствия побочных продуктов, конъюгат ДБЦО-нагрузочное вещество и А-XTEN очищали от избытка реагента при помощи буферного обмена, используя центрифугу с 10-30 кДа НОММ, преципитацию ацетонитрилом или анионообменную хроматографию. Для создания второго предшественника XTEN-нагрузочное вещество, нагрузочное вещество В-малеинимид растворяли в водном растворе 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, ДМФ или ДМЦО либо любом другом подходящем растворителе в зависимости от растворимости реагента. Нагрузочное вещество В-малеинимид добавляли во второй цистеинсодержащий XTEN

в количестве, которое в молярном отношении в 2-6 раз превышает XTEN, и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи аналитической C18 RP-HPLC. Полученный в результате конъюгат нагрузочного вещества и В-XTEN очищали от примесей и реактантов при помощи препаративной C4-C18 RP-HPLC. Конъюгат нагрузочного вещества и В-XTEN формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Азид-ПЭГ4-NHS эфир добавляли в количестве, которое в молярном отношении в 10-50 раз превышает нагрузочное вещество В-XTEN и инкубировали на протяжении 1-2 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи C18 RP-HPLC. В случае низкой конъюгационной активности (например, <90%) или образования большого количества неспецифических продуктов конъюгат азид-нагрузочное вещество и В-XTEN очищали, используя препаративную C4-C18 RP-HPLC. В случае высокой конъюгационной эффективности ДБЦО-NHS эфира (>90%) без существенного присутствия побочных продуктов, конъюгат азид-нагрузочное вещество и В-XTEN очищали от избытка реагента при помощи буферного обмена, используя центрифугу с 10-30 кДа НОММ, преципитацию ацетонитрилом или анионообменную хроматографию. Конечный продукт создавали путем смешивания очищенных и концентрированных белков ДБЦО-нагрузочное вещество А-XTEN и азид-нагрузочное вещество В-XTEN в эквимолярном соотношении в 20 мМ ГЭПЭС буфере, pH 7,0, 50 мМ NaCl и инкубировали при 25°C на протяжении 1 ч или более до завершения реакции. Завершение модификации отслеживали при помощи C4 или C18 RP-HPLC. При необходимости биспецифический конъюгат нагрузочное вещество А-XTEN-нагрузочное вещество В очищали при помощи препаративной RP-HPLC, хроматографии с гидрофобным взаимодействием или анионным обменом.

Пример 30. Приготовление тримерного конъюгата из моноспецифических предшественников XTEN, связанных в N-концах.

Моноспецифические предшественники XTEN-нагрузочное вещество получают в виде N-концевых продуктов слияния нагрузочного вещества А, связанного с молекулой XTEN; например, имеющих длину в диапазоне от АЕ144 до АЕ890, содержащих один цистеин в С-конце (полученных и очищенных, как описано в примере 25). Очищенные предшественники формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl Трис-(2-малеинимидоэтил)амин (ТМЭА, Thermo Scientific, cat. # 33043) и растворяли в ДМЦО или ДМФ. Предшественник (в количестве в молярном отношении в 4-6 раз превышающем количество кросс-линкера) и реагент ТМЭА смешивали и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи C4 или C18 RP-HPLC или эксклюзионной хроматографии. Полученный в результате трехвалентный конъюгат нагрузочное вещество А-XTEN очищали от белковых реактантов или смеси частичных продуктов при помощи хроматографии с гидрофобным взаимодействием (НІС), анионообменной хроматографии или препаративной C4-C18 RP-HPLC.

Пример 31. Конъюгация и очистка FITC-X-XTEN.

Очищенный белок, полученный из AC272, lot # AP197, метили малеинимидом FITC. Образец восстанавливали путем инкубации при комнатной температуре с 5 мМ ТХЭФ на протяжении 1 ч. Затем образец обессоливали в ФСБ, используя колонки DG-10. Образец метили, добавляя 25-кратно превышающее в молярном отношении количество FITC-малеинимида в ДМЦО и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 2 ч. Следует отметить, что объем довели таким образом, что концентрация ДМЦО составляла <5% от общего растворителя. Реакцию завершали, добавляя 2 мМ ДТТ, а затем образец расщепляли на протяжении ночи при помощи TEV-протеазы. Образец разводили до двух объемов с 20 мМ Трис pH 7,5 и загружали в колонку MacroCap Q, предварительно очистив NaOH и уравновесив 20 мМ Трис pH 7,5. Колонку отмывали 5 об. колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 135 мМ NaCl, 5 об. колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 175 мМ NaCl и элюировали с 5 об. колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 250 мМ NaCl. Затем объединенные элюционные фракции расщепляли при помощи TEV более 60 ч при 4С для завершения расщепления. Затем расщепленные образцы дважды пропускали через колонку с 1 мл перлозы, предварительно очистив NaOH и уравновесив 20 мМ Трис pH 7,5, 135 мМ NaCl. Для удаления из образца свободных FITC образец диализировали против 20 мМ Трис pH 7,5, 135 мМ NaCl, используя 10000 НОММ мембрану. Совместная миграция белкового сигнала ОП214 и FITC-сигнала ОП495 в SEC-колонеке указывает на успешную конъюгацию XTEN с маркером с минимальным загрязнением свободными красителями (фиг. 72В). На успешную конъюгацию также указывает большая величина кажущейся молекулярной массы белка с FITC-флуоресценцией в SDS-PAGE (фиг. 72А).

Пример 32. Очистка GFP-X-XTEN.

GFP (AC219) химическим способом перекрестно сшивали с XTEN посредством бифункционального кросс-линкера с аминреакционноспособной группой для сопряжения с лизинами GFP и цистеинреакционноспособной группой для сопряжения со свободным цистеином, внесенным в XTEN в AC292. GFP метили бифункциональным кросс-линкером сульфо-СМЦК при помощи инкубации при комнатной температуре на протяжении 2 ч. Белок обессоливали в ФСБ, используя колонки DG-10 для удаления свободных сульфо-СМЦК. Очищенный белок, полученный из AC272, lot # AP197, восстанавливали и обессоливали в ФСБ на колонках DG-10 и смешивали с меченым GFP для того, чтобы обеспечить возможность перекрестного сшивания. Реакцию перекрестного сшивания завершали с 2 мМ ДТТ и TEV, которую добавляли, чтобы удалить домен CBD во время инкубации на протяжении ночи при 4°C.

На следующий день добавляли дополнительное количество TEV для завершения расщепления с до-

полнительной 60-часовой инкубацией при 4°C. После расщепления TEV образец разводили до 100 мл в 20 mM Трис pH 7,5 и загружали в колонку MacroCap Q, предварительно очистив NaOH и уравновесив 20 mM Трис pH 7,5. Колонку отмывали 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 300 mM NaCl и 5 об. колонки 20 mM Трис pH 7,5, 500 mM NaCl. Пиковые элюционные фракции объединяли и хранили при 4°C. Перекрестное сшивание подтверждали по совместной миграции белкового сигнала ОП214 и GFP-сигнала ОП395 в SEC-колонке, на фиг. 73 выход SEC показан в виде накладывающегося слоя.

Пример 33. Фармакокинетика конъюгатов GFP-XTEN и FITC-XTEN.

Фармакокинетику перекрестно-шитых конъюгатов GFP-XTEN и FITC-XTEN, полученных как описано в вышеприведенных примерах, исследовали на яванских макаках. GFP-XTEN и FITC-XTEN вводили взрослым макакам IV в дозировке 2 мг/кг и с объемами доз, составляющими 0,77 и 0,68 мл соответственно. Образцы крови (1,0 мл) собирали в предварительно охлажденные гепаринизированные пробирки перед дозированием и через временные отрезки, составляющие 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 336, 388, 432, 504 ч после дозирования, и перерабатывали в плазму. Количественную оценку проводили при помощи метода ELISA, используя антитело к XTEN как для захвата, так и для и детектирования в случае GFP-XTEN, и анти-XTEN для захвата и анти-FITC для детектирования в случае FITC-XTEN. Анализ без учета компартментов проводили в WinNonLin с включением всех временных отрезков для определения ФК-параметров. Результаты фармакокинетики обобщены в табл. 40 и на фиг. 74. Данные показывают, что XTEN может продлевать период полувыведения молекул, к которым он конъюгирован химически, способом, сравнимым с генетическим слиянием с нагрузочными веществами сходного размера.

Таблица 40

ФК-параметры конъюгационных композиций XTEN-нагрузочное вещество

Конструкция	С <sub>max</sub> (нг/мл)	ППК (ч*нг/мл)	T <sub>1/2</sub> (ч)
GFP-X-XTEN (AP197d)	52800	8220000	107
FITC-X-XTEN AP197e	18900	3930000	84,2

Фармакокинетику GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN\_AF576, GFP-XTEN\_Y576 и XTEN\_AD836-GFP исследовали на яванских макаках, чтобы установить влияние состава и длины неструктурированных полипептидов на параметры ФК. Анализировали образцы крови в разные временные отрезки после инъекции, а концентрацию GFP в плазме крови определяли при помощи ELISA, используя поликлональное антитело к GFP для захвата и биотинилированное приготовление того же самого поликлонального антитела для детектирования. Результаты обобщены на фиг. 75. Они показывают резкое увеличение периода полувыведения с увеличением длины последовательности XTEN. Например, для GFP-XTEN\_L288 (с 288 аминокислотными остатками в XTEN) был зарегистрирован период полувыведения, составляющий 10 ч. Удвоение длины неструктурированного полипептидного участника слияния до 576 аминокислот увеличивало период полувыведения до 20-22 ч для множественных гибридных белковых конструкций; т.е. GFP-XTEN\_L576, GFP-XTEN\_AF576, GFP-XTEN\_Y576. Дополнительное увеличение длины неструктурированного полипептидного участника слияния до 836 остатков приводило к периоду полувыведения в 72-75 ч для XTEN\_AD836-GFP. Таким образом, увеличение длины полимера на 288 остатков до 576 остатков увеличивало *in vivo* период полувыведения приблизительно на 10 ч. При этом увеличение длины полипептида на 260 остатков от 576 остатков до 836 остатков увеличивало период полувыведения на более чем 50 ч. Данные результаты показывают, что существует определенное пороговое значение длины неструктурированного полипептида, которое приводит к *in vivo* приросту в периоде полувыведения, который превышает пропорциональное увеличение. Таким образом, ожидается, что гибридные белки, содержащие продленные неструктурированные полипептиды, будут обладать свойством усиленной фармакокинетики по сравнению с полипептидами меньшей длины.

Пример 34. Приготовление 1xDBCO,3xLHRH-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN\_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 196 мкМ (7,7 мг/мл) раствора в 20 mM ГЭПЭС, pH 7,0, 50 mM NaCl. На фиг. 88A показан C18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. 2,2'-Дипиридилдисульфид (ДПД, Sigma, cat. # D5767) растворяли в диметилформамиде (ДМФ) до конечной концентрации в 100 mM. 4 мл раствора 1xAmino,3xThiol-XTEN432 смешивали с 0,2 мл 1M ГЭПЭС, pH 8,0, чтобы довести pH до ~7,5 и с 78 мкл раствора ДПД (в количестве, в 10× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 88B). ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 10 mM. 0,865 мл раствора ДБЦО-сульфо-NHS добавляли в белковый раствор (в количестве, в 11× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 88C). Добавляли раствор 1M этано-



ламина pH 8,0 до конечной концентрации в 50 мМ для погашения непрогеагировавшего ДБЦО-сульфо-NHS. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а затем на протяжении ночи при 4°C. Добавляли 500 мМ ТХЭФ-раствора Bond-Breaker™ (Thermo Scientific, cat. # 77720) до конечной концентрации в 20 мМ. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи С18 RP-HPLC (фиг. 88D). Реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную С4 RP-HPLC колонку Vydac C4 250 × 22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин.

Фракции, содержащие 1хDBCO,3хThiol-XTEN432, доводили до pH ~7 при помощи 1М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме. Пептид Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, модифицированный 3-малеинимидопропионовой кислотой в ε-аминогруппе D-Lys (LHRH-Mal), синтезировали при помощи CSBio Co. (Менло Парк, Калифорния). Пептид растворяли до конечной концентрации в 25 мг/мл в безводном ДМФ и добавляли в раствор 1хDBCO,3хThiol-XTEN432 в количестве, в 5× превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи С18 RP-HPLC (фиг. 88E). Реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку С4 RP-HPLC Vydac C4 250×22 мм. Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1хDBCO,3хLHRH-XTEN432, доводили до pH ~7 при помощи 1М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме до 2 мл для получения конечного продукта.

Пример 35. Приготовление 1хAzide,3хММАЕ-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1хAmino,3хThiol-XTEN432 (XTEN\_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 196 мкМ (7,7 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. На фиг. 89А показан С18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. МА6-Val-Cit-PAВ-ММАЕ (ММАЕ-Mal, стандартный синтез от Concoctis Biosystems, Inc.) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до конечной концентрации в 1 мг/мл. 2,2 мл объем раствора 1хAmino,3хThiol-XTEN432 смешивали с 2,5 мл ММАЕ-Mal (в количестве, в 3,5× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи С18 RP-HPLC (фиг. 89В). Азид-ПЭГ4-NHS эфир (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A103) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 500 мМ. Реакционную смесь (4,7 мл) смешивали с 0,235 мл 1М ГЭПЭС, pH 8,0 и с 9,75 мкл 500 мМ азид-ПЭГ4-NHS (в количестве, в 10× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи С18 RP-HPLC (фиг. 89С). Конъюгационную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку С4 RP-HPLC Vydac C4 250×22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1хAzide,3хММАЕ-XTEN432, доводили до ~pH 7 при помощи 1М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

Пример 36. Приготовление 3хLHRH,3хММАЕ-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1хDBCO,3хLHRH-XTEN432 готовили в виде 143 мкМ (6,26 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. 1хAzide,3хММАЕ-XTEN432 готовили в виде 135 мкМ (5,90 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. Два белковых реактанта смешивали в растворе для получения молярного избытка 1хDBCO,3хLHRH-XTEN432, составляющего 1,1. Реакционную смесь инкубировали на протяжении ночи при 25°C. Завершение реакции клик-химии анализировали при помощи SDS-PAGE (фиг. 90А) и RP-HPLC (фиг. 90В). Конъюгационную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку С4 RP-HPLC Vydac C4 250×10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 3хLHRH,3хММАЕ-XTEN, доводили до pH ~7 при помощи 1М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

Пример 37. Приготовление 1хLHRH,3хММАЕ-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1хAmino,3хThiol-XTEN905 (XTEN\_AE905(Am1,C8,C453,C898, Seg 174)) готовили в виде 131 мкМ (10,9 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. На фиг. 91А показан С18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. 2,2'-Дипиридилдисульфид (ДПД, Sigma, cat. # D5767) растворяли в диметилформамиде (ДМФ) до конечной концентрации в 100 мМ. Раствор 1хAmino,3хThiol-XTEN905 доводили до pH ~7,5, используя 1М ГЭПЭС pH 8, и смешивали с раствором ДПД (в количестве, в 10× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи С18 RP-HPLC (фиг. 91В). ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 10 мМ. Раствор ДБЦО-сульфо-NHS добавляли в белковый раствор (в количестве, в 10× превы-

шающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 91C). 1M этаноламина pH 8,0 добавляли до конечной концентрации в 50 mM для погашения непрогеагировавшего ДБЦО-сульфо-NHS. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а затем на протяжении ночи при 4°C. 500 mM ТХЭФ-раствора Bond-Breaker™ (Thermo Scientific, cat. # 77720) добавляли до конечной концентрации в 20 mM. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 91D). Реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250×22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBC0,3xThiol-XTEN905, доводили до pH ~7 при помощи 1M ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме. МА6-Val-Cit-PAВ-ММАЕ (ММАЕ-Mal, стандартный синтез от Concords Biosystems, Inc.) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до конечной концентрации в 1 мг/мл. Раствор 1xDBC0,3xThiol-XTEN905 смешивали с ММАЕ-Mal в количестве, в 3,5× превышающем его в молярном отношении. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC. Пептид Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2 модифицировали азидо-гексановой кислотой в ε-аминогруппе D-Lys (LHRH-Mal, стандартный синтез от CS Bio Co., Менло Парк, Калифорния). Пептид растворяли до конечной концентрации в 25 мг/мл в безводном ДМФ и добавляли в раствор 1xDBC0,3xММАЕ-XTEN905 в количестве, в 1,5-5× превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC. Конечную реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250×22 мм. Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBC0,3xLHRH-XTEN432, доводили до pH ~7 при помощи 1M ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

Пример 38. Приготовление 1xDBC0,3xFolate(γ)-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN\_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 203 мкМ (8,0 мг/мл) раствора в 20 mM ГЭПЭС, pH 7,0, 50 mM NaCl. На фиг. 107A показан C18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. Фолат-γ-аминопентил-малеинимид (FA(γ)-Mal, стандартный синтез от CPC Scientific) растворяли в диметилформамиде (ДМФ) до конечной концентрации в 21 мг/мл (9,8 mM). 1,1 мл объем раствора 1xAmino,3xThiol-XTEN432 смешивали с 0,08 мл FA(γ)-Mal (в количестве, в 3,5× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 107B). pH реакционной смеси доводили при помощи 0,06 мл буфера из 1M ГЭПЭС pH 8,0. ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 50 mM. 0,53 мл раствора ДБЦО-сульфо-NHS добавляли в белковый раствор (в количестве, в 11× превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 107C). 1M этаноламина pH 8,0 добавляли до конечной концентрации в 50 mM для погашения непрогеагировавшего ДБЦО-сульфо-NHS. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а затем на протяжении ночи при 4°C. Реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили до pH ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250×10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBC0,3xFA(γ)-XTEN432, доводили до pH ~7 при помощи 1M ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

Конъюгат 1xDBC0,3xFolate(α)-XTEN готовили преимущественно так, как описано выше, используя фолат-α-малеинимид (FA(α)-Mal, стандартный синтез от CPC Scientific).

Пример 39. Приготовление 3xFA(γ),3xММАЕ-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1xDBC0,3xFA(γ)-XTEN432 готовили в виде 191 мкМ (8,8 мг/мл) раствора в 20 mM ГЭПЭС, pH 7,0. 1xAzide,3xММАЕ-XTEN432 (полученный так, как описано в примере 32) готовили в виде 242 мкМ (11,1 мг/мл) растворов 20 mM ГЭПЭС, pH 7,0. Два белковых реактанта смешивали в растворе, чтобы получить количество 1xDBC0,3xFA(γ)-XTEN432 с 1.1 молярным избытком. Реакционную смесь инкубировали на протяжении ночи при 25°C. Завершение реакции клик-химии анализировали при помощи RP-HPLC (фиг. 108). Конъюгационную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250×10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 3xFA(γ),3xММАЕ-XTEN, доводили до pH ~7 при помощи 1M ГЭПЭС pH 8 и кон-

центрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта. Конечный продукт анализировали при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC-HPLC) (фиг. 109A), RP-HPLC (фиг. 109B) и ESI-MS (фиг. 109C).

Конъюгат 3xFA( $\alpha$ ),3xMMAE-XTEN готовили преимущественно так, как описано выше, используя клик-реакцию между 1xDBCO,3xFA( $\alpha$ )-XTEN432 и 1xAzide,3xMMAE-XTEN432.

Пример 40. Сравнение вязкости в растворах разветвленных и линейных XTEN.

Вязкость линейных и разветвленных XTEN (последние - в виде тримерных и тетрамерных конфигураций) можно определить при помощи вискозиметров и реометров разных типов. Например, можно определить время, необходимое для набора 1 мл жидкости в шприц через 30G иглу, как описано у Miller, M.A., et al. (2010) *Langmuir*, 26:1067. Для того чтобы сравнить вязкость мономерных и тримерных или тетрамерных конфигураций XTEN, готовят конструкции, имеющие одинаковые молекулярные массы аминокислотных компонентов XTEN, и затем делают растворы с фиксированными, эквивалентными концентрациями белка, составляющими 20, 50, 100 мг/мл для каждого. Затем растворы оценивают, используя метод Миллера. Используя данный метод, берут данные по известным характеристикам для построения калибровочной кривой, а затем измеряют характеристики растворов XTEN. Ожидается, что результаты покажут, что вязкость эквимольных растворов XTEN с одинаковыми молекулярными массами будет значительно снижаться с повышением разветвленности; трехрукий конъюгат XTEN288 будет обладать значительно меньшей вязкостью по сравнению с такой же концентрацией линейного XTEN864, даже если они содержат одинаковые количества аминокислот. Аналогично, ожидается, что XTEN216 с четырехрукой конфигурацией будет иметь еще меньшую вязкость, чем трехрукий конъюгат XTEN288.

Пример: 41. Приготовление Her2-XTEN-PTX путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN\_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 196 мкМ (7,7 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Паклитаксел-Мал (PTX-Mal) представляет собой стандартно синтезируемую модификацию паклитаксела с янтарным ангидридом с последующей конъюгацией с аминоэтилmaleинимидом. PTX-Mal растворяли в диметилформамиде (DMF) и добавляли в белок в количестве, в 3,5-5× превышающем его в молярном отношении. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1-2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC. Сульфо-СМЦК (Thermo Scientific, cat. #22122) растворяли в безводном DMF до конечной концентрации в 50 мМ и добавляли в белковый раствор в количестве, в 10× превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (см. фиг. 92). Реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250×22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xMal,3xPTX-XTEN432, доводили до pH ~7 при помощи 1М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме. Антитело герцептин (трастузумаб, Roche) восстанавливали в воде согласно инструкциям и меняли буфер на ФСБ pH 7,2, содержащий 5 мМ ЭДТК. ДТТ добавляли в белковый раствор до 1-10 мМ конечной концентрации и инкубировали на протяжении 5-30 мин при 37°C. Избыток ДТТ удаляли при помощи гель-фильтрации или фильтрации при помощи отделяющей мембраны. 1xMal,3xPTX-XTEN432 добавляли к частично восстановленному антителу в количестве, в 3-4× превышающем его в молярном отношении. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а конечные продукты реакции анализировали при помощи SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографии в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Пример 42. Приготовление йодоацетил-XTEN путем конъюгации.

Аликвоту гибридного белка 1xAmino-XTEN869 (XTEN\_AE869(Am1)) готовили в виде 164 мкМ (13,1 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. 1/20 об. 1М ГЭПЭС, pH 8 добавляли в белковый раствор, чтобы довести pH белкового раствора до ~7,5. N-сукцинимидил йодоацетат (SIA, Thermo Scientific, cat. # 22349) растворяли в безводном DMF до конечной концентрации в 100 мМ и добавляли в количестве, в 10× превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (фиг. 93A). Избыток SIA удаляли при помощи смены буфера, используя ультрацентрифугирующее устройство Vivaspin 500 (НОММ 5000, VivaScience, cat. # VS0112). Модификация N-концевой аминокислотной группой не приводит к изменению времени удержания модифицированного XTEN (фиг. 93A), следовательно, ковалентная модификация подтверждалась при помощи ESI-MS (фиг. 93B). Также конъюгат IA-XTEN эффективно реагировал с цистеинсодержащим пептидом HCKFWW (Bachem, cat. # H-3524) (фиг. 93C).

Пример 43. In vitro клеточный скрининг конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности.

Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество оценивали на предмет in vitro активности и избирательности. Каждый конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество, соответствующую ему ненативную молекулу XTEN-лекарственное вещество и соответствующий ему контрольное свободное лекар-

ственное вещество исследовали в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к рецепторам LHRH клеточных линий, перечисленных в табл. 41. Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и время инкубации, определяли, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество исследовали следующим образом: клетки собирали в лог-фазе, пересчитывали и высевали с заданной клеточной плотностью в 96-луночный микротитровальный аналитический планшет. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносили в растворах в подходящих диапазонах дозровок, в двух параллельных исследованиях, а планшеты инкубировали на протяжении 2-5 дополнительных дней. После истечения соответствующего времени инкубации в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo, смешивали на протяжении 2 мин на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугировали при 90×g и инкубировали при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 мин, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывали при помощи люминометра и рассчитывали величины IC<sub>50</sub> (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC<sub>50</sub> даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям. Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество продемонстрируют высокоселективную эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к рецепторам LHRH клеток, но не в отношении негативных к рецепторам LHRH клеток. В отличие от этого, для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в цитотоксичности к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец XTEN-лекарственное вещество будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с LHRH-рецепторами путем добавления в анализ свободного конкурентоспособного пептида LHRH, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество, дополнительно подтверждая избирательную активность данных конструкций.

Позитивные и негативные к рецепторам LHRH клеточные линии

Клеточная линия	Ткань	Статус LHRHR
MCF-7	Молочная железа	Позитивный
MDA-MB-231	Молочная железа (HER2-/ER-/PR-)	Позитивный
HCC1806	Молочная железа (HER2-/ER-/PR-)	Позитивный
HCC1937	Молочная железа (HER2-/ER-/PR-)	Позитивный
OV-1063	Яичники	Позитивный
EFO-21	Яичники	Позитивный
EFO-27	Яичники	Позитивный
NIH:OVCAR-3	Яичники	Позитивный
BG-1	Яичники	Позитивный
HEC-1A	Эндометрий	Позитивный
HEC-1B	Эндометрий	Позитивный
Ishikawa	Эндометрий	Позитивный
KLE	Эндометрий	Позитивный
AN-3-CA	Эндометрий	Позитивный
MiaPaCa	Поджелудочная железа	Позитивный
Panc-1	Поджелудочная железа	Позитивный
rat Dunning R-3327-H	Простата (андроген-зависим)	Позитивный
PC-82	Простата (андроген-зависим)	Позитивный
MDA-PCa-2b	Простата (андроген-независим)	Позитивный
C4-2 (производное от LNCaP)	Простата (андроген-зависим)	Позитивный
A549	Легкие	Позитивный
UCI-107	Яичники	Негативный
SK-OV-3	Яичники	Негативный
SW 626	Яичники	Негативный
MFE-296	Эндометрий	Негативный

ER: рецептор эстрогена; PR: рецептор прогестерона.

Пример: 44. In vitro клеточный скрининг конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности.

Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество впервые подвергали скринингу in vitro активности и избирательности. Каждый конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество, соответствующую ему ненацеленную молекулу XTEN-лекарственное вещество и соответствующий ему контрольное свободное лекарственное вещество исследовали в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к фолатным рецепторам клеточных линий, перечисленных в табл. 42. Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолиевой кислоты, клетки выращивают, а анализ проводят в среде, не содержащей фолиевой кислоты, но содержащей 5-10% инактивированной теплом фетальной телячьей сыворотки (ФТС) при 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (инактивированная теплом ФТС содержит эндогенный уровень фолиевой кислоты, достаточный для выживания и пролиферации экспрессирующих фолатные рецепторы клеток). Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и времена инкубации, устанавливаются, используя бесфолатную среду, содержащую 5-10% инактивированную теплом ФТС, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Затем конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество исследовали следующим образом: клетки собирали в лог-фазе, пересчитывали и высевали с заданной клеточной плотностью в 96-луночные микротитровальные аналитические планшеты. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносили в растворах в подходящих диапазонах дозировок, в двух параллельных исследованиях, а планшеты инкубировали на протяжении 2-5 дополнительных дней. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo, смешивали на протяжении 2 мин на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугировали при 90×g и инкубировали при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 мин, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывали при помощи люминометра и рассчитывали величины IC<sub>50</sub> (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количе-

ственное сравнение величин  $IC_{50}$  даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям. Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты фолат-ХТЕН-лекарственное вещество продемонстрируют высокоселективную эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к фолатным рецепторам клеток, но не в отношении негативных к фолатным рецепторам клеток. В отличие от этого для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в цитотоксичности к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец ХТЕН-лекарственное вещество будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты фолат-ХТЕН-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с фолатными рецепторами путем добавления в анализ свободной конкурентоспособной фолиевой кислоты, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов фолат-ХТЕН-лекарственное вещество, дополнительно подтверждая избирательную активность данных конструкций.

Таблица 42

Позитивные и негативные к фолатным рецепторам клеточные линии

Клеточная линия	Ткань	Статус фолатного рецептора
KB	Носоглоточная	Позитивный
IGROV	Яичники	Позитивный
SK-OV-3	Яичники	Позитивный
HeLa	Шейная	Позитивный
LoVo	Толстая кишка	Позитивный
SW620	Толстая кишка	Позитивный
A549	Легкие	Негативный
A375	Множественная меланома	Негативный
LS-174T	Толстая кишка	Негативный
SK-BR-3	Молочная железа	Негативный

Пример 45. *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество.

При определении стабильности конъюгаты LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и мыши при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество в течение времени. Количество свободного лекарственного вещества оценивают при помощи RP-HPLC и/или LC-MS/MS, а количество интактного конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество определяют, используя ELISA для ХТЕН/лекарственное вещество и/или LHRH/лекарственное вещество. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу, и сравнивают с известными стандартами лекарственных веществ. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной tandemной масс-спектрометрии и сравнивают с известными стандартами лекарственных веществ. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированной версии детекторного антитела) либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небитинилированной версии детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки до-

бавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы.  $t_{1/2}$  для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

Пример 46. *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

При определении стабильности конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и мыши при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Количество свободного лекарственного вещества оценивают при помощи HPLC и/или LC-MS/MS, а количество интактного конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество определяют, используя ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или фолат/лекарственное вещество. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу, и сравнивают с известными стандартами лекарственных веществ. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной tandemной масс-спектрометрии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированную версию детекторного антитела), либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированную версию детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы.  $t_{1/2}$  для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

Пример 47. *In vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгата LHRH-XTEN-Cy5.5.

Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 LHRH-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей активности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к рецепторам LHRH опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Вкратце, самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к рецепторам LHRH опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой LHRH-XTEN-Cy5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Cy5.5 контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 ч после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают, регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Cy5.5 выбирают как соответствующие длине волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения, по меньшей мере, нескольких тысяч отсчетов от

сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области  $Cy5.5$ . Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, красный определяет самую высокую интенсивность, а полученные в результате изображения используют для оценки поглощения конъюгатов и контрольных образцов.

Пример 48. *In vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгатов фолат-XTEN- $Cy5.5$ .

Молекулу флуоресцентно меченого  $Cy5.5$  фолат-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей активности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышях с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к фолатным рецепторам опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолата, позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, нормальная пища грызунов содержит высокую концентрацию фолиевой кислоты; бестимусных мышей в данном исследовании держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении визуализационного анализа для того, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке крови.

Вкратце, самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой фолат-XTEN- $Cy5.5$  и соответствующими дозами ненацеленного меченого  $Cy5.5$  контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации FVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 ч после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм)  $Cy5.5$  выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения, по меньшей мере, нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области  $Cy5.5$ . Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, красный определяет самую высокую интенсивность, а полученные в результате изображения используют для оценки поглощения конъюгатов и контрольных образцов.

Пример 49. Анализ фармакокинетики конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество.

*In vivo* фармакокинетику конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов, полученных от мышей, крыс, яванских макаков и собак. Составы конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество готовят в водных буферах, совместимых с *in vivo* введением (например: фосфатно-солевой буфер, Трис-солевой буфер или Гэпэс-солевой буфер). Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 ч и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS. Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество, например комбинации XTEN/LHRH, XTEN/лекарственное вещество, LHRH/лекарственное вещество и/или XTEN/XTEN. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество, покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело к второму компоненту конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу), либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небитинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидаина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрацию конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры.



Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC.

Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами.

Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной tandemной масс-спектрографии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление XTEN к LHRH и лекарственному компоненту сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства нацеленного и лекарственного компонента, не связанного с XTEN.

Пример 50. Анализ фармакокинетики конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

In vivo фармакокинетику конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов, полученных от мышей, крыс, яванских макаков и собак. Так как в нормальном питании содержатся высокие концентрации фолиевой кислоты (приблиз. 6 мг/кг мышинного корма), животных, принимающих участие в фармакокинетических исследованиях фолатных конъюгатов, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 ч и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS.

Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество, например, комбинации XTEN/фолат, XTEN/лекарственное вещество, фолат/лекарственное вещество и/или XTEN/XTEN. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу) либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небитинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет Win-NonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры.

Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами.

Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной tandemной масс-спектрографии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление XTEN к фолату и лекарственному компоненту сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства нацеленного и лекарственного компонента, не связанного с XTEN.

Пример 51. In vivo анализ эффективности и токсичности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное

вещество.

Конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество предназначен для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к рецепторам LHRH опухолевым клеткам. Поэтому *in vivo* фармакологическую активность конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие рецепторы LHRH, трансплантированные бестимусным мышам.

Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений LHRH-XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Вкратце, эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирования определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на LHRH веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (см. выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съезживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение отслеживают ежедневно. Наибольшая доза соединения LHRH-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД. Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом LHRH-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД; другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В табл. 42 приведены примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Таким образом, подходящее количество позитивных к рецепторам LHRH клеток из соответствующей человеческой опухолевой линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как  $0,5 \times L \times W^2$ , где L = значение для большей оси в мм, а W = значение для оси, перпендикулярной L, в мм. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, контрольное лекарственное вещество и конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и проводят клинические исследования патологии и гистопатологии основных органов.

Предполагается, что результаты подтвердят то, что конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество будет иметь положительный терапевтический индекс, что демонстрирует высокая эффективность, и низкую общую токсичность. В противоположность этому ожидается, что ненацеленное на LHRH свободное лекарственное вещество при одинаковых дозах будет менее эффективно, но намного более токсично. Ожидается, что контрольный растворитель приведет к неконтролируемому росту опухоли и будет высокотоксичным.

Пример 52. *In vivo* анализ эффективности и токсичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество предназначены для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к фолатным рецепторам опухолевым клеткам. *In vivo* фармакологическую активность конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие фолатные рецепторы, трансплантированные бестимусным мышам. Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений фолат-XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Так как в нормальном корме для грызунов содержится высокая концентрация фолиевой кислоты (6 мг/кг корма), мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирования определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на фолат веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (см. пример ФК выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съезживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение тщательно отслежи-

вают ежедневно. Наибольшая доза соединения фолат-ХТЕН-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД.

Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом фолат-ХТЕН-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД, другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В табл. 42 приведены примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Для снижения содержания фолата позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке, мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении исследования. Подходящее количество позитивных к фолатным рецепторам клеток из соответствующей человеческой опухолевой линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как  $0,5 \times L \times W^2$ , где  $L$  = значение для большей оси в мм, а  $W$  = значение для оси, перпендикулярной  $L$ , в мм. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, контрольное лекарственное вещество и конъюгат фолат-ХТЕН-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и удаляют основные органы для проведения клинических исследований патологии и гистопатологии.

Предполагается, нацеленный химиотерапевтический конъюгат фолат-ХТЕН-лекарственное вещество будет более эффективным и менее токсичным, чем одно свободное цитотоксичное лекарственное вещество, для позитивных к фолатным рецепторам опухолей в мышинной модели.

Пример 53. Проекты клинических исследований на человеке для оценки конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество.

Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. LHRH представляет собой пептид, который функционирует в репродуктивных органах. Так как его рецепторы сконцентрированы преимущественно на определенных опухолях и не экспрессируются в большинстве нормальных тканей, рецептор LHRH является идеальной мишенью для избирательного разрушения злокачественных опухолей. Действительно, ~52% образцов рака молочной железы, ~80% образцов рака яичников и эндометрия и ~85% образцов рака простаты являются мишенями вследствие наличия рецепторов LHRH. Следует отметить, что LHRH-зависимая терапия была бы в особенности целесообразной для тройных негативных опухолей молочной железы, которые не характеризуются сверхэкспрессией рецепторов эстрогена или прогестерона или HER2 и, следовательно, не подходят для лечения многими доступными нацеленными лекарственными веществами. У пациентов с поздними стадиями рака эндометрия, яичников или простаты часто наблюдается исключительно неблагоприятный исход, так как данные опухоли могут иметь тенденцию к повторному появлению и/или быть устойчивыми к современным способам лечения. Слияние ХТЕН, несущего  $\geq 1$  копии LHRH с ХТЕН, несущим  $\geq 3$  молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенный терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях ниже МПД, уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

Клиническую оценку композиции LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от распространенных раков молочной железы, эндометрия, яичников и простаты или мочевого пузыря, с исследованиями, разработанными так, чтобы подтвердить эффективность и безопасность конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество для человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетики, чтобы определить максимальную переносимую дозу (МПД) и охарактеризовать ограничивающую дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах с метастатическими или неоперабельными раками и пациентах, для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся, а критерием отбора является позитивный статус в отношении рецепторов LHRH у пациента. Схемой исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров, которые позволяют определить МПД, а также пороговую и максимальную концентрации для дозирования и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в фазе II и фазе III, а также определить потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях. Клиниче-

ские исследования на людях в фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (стадия 3 или 4) или повторным раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря. В данном исследовании оценивают эффективность и безопасность конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно вводят клинический кандидатный конъюгат LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество в дозировке и согласно лечебной схеме, предопределенным в фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость.

В фазе III проводят исследования эффективности и безопасности на пациентах с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (устойчивым, повторным) раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря, чтобы исследовать способность достижения статистически значительных клинических конечных точек, таких как отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Результаты эффективности определяют, используя стандартные статистические методы. Токсичность и признаки побочных эффектов также отслеживают при исследовании, чтобы подтвердить, что соединение является безопасным при применении описанным способом.

Пример 54. Проекты клинических исследований на человеке для оценки конъюгатов фолат-ХТЕН-лекарственное вещество.

Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. Фолат, также известный как фолиевая кислота, витамин B<sub>9</sub>, является жизненно важным питательным веществом, необходимым для всех живых клеток для нуклеотидного биосинтеза, и функционирует как кофактор в некоторых биологических процессах. Фолатный рецептор является точкой фокусировки для разработки терапии для лечения быстро развивающихся злокачественных опухолей; в частности, рака яичников и немелкоклеточной карциномы легких. Хотя экспрессия фолатных рецепторов в нормальных яичниках является весьма незначительной, при ~90% эпителиальных раков яичников наблюдается сверхэкспрессия фолатных рецепторов, то же самое наблюдается для многих аденокарцином легких, тем самым открывая возможность для нацеленной терапии. Слияние ХТЕН, несущего  $\geq 1$  копии фолата с ХТЕН, несущим  $\geq 3$  молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенный терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях значительно ниже максимальной переносимой дозы (МПД), уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

Клиническую оценку композиции фолат-ХТЕН-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей, или для пациентов, страдающих от рака яичников, устойчивого к лечению препаратами платины, или немелкоклеточной карциномы легких, которым не помогло применение другой химиотерапии. Клинические исследования, разработаны так, чтобы подтвердить эффективность и преимущества конъюгата фолат-ХТЕН-лекарственное вещество по сравнению со стандартными терапиями человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетике, чтобы определить МПД и охарактеризовать ограничивающие дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам статусом, которые имеют повторные или не поддающиеся лечению распространенные опухоли, и для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся. Предметом исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата фолат-ХТЕН-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров, которые позволяют определить МПД, а также установить пороговую и максимальную концентрации для дозирования и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в фазе II и фазе III, а также определить потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях.

Клинические исследования на людях в фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам раком яичников, устойчивым к лечению препаратами платины, пациентам с немелкоклеточной карциномой легких, которым не помогли многочисленные химиотерапии, и пациентам, страдающим от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей. В данных исследованиях оценивают эффективность и безопасность конъюгата фолат-ХТЕН-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно вводят конъюгат фолат-ХТЕН-лекарственное вещество в дозировке и согласно ле-

чебной схеме, определенным в фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость. В фазе III проводят исследования эффективности и безопасности на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам раком яичников, устойчивым к лечению препаратами платины, пациентам с немелкоклеточной карциномой легких или пациентам с повторными или не поддающимися лечению распространенными раками, чтобы исследовать способность достижения статистически значительных клинических конечных точек, таких как отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Результаты эффективности определяют, используя стандартные статистические методы. Токсичность и признаки побочных эффектов также отслеживают при исследовании, чтобы подтвердить, что соединение является безопасным при применении описанным способом.

Пример 55. Стабильность XTEN в сыворотке крови.

Гибридный белок, содержащий XTEN\_AE864, сшитый с N-концом GFP, инкубировали в плазме крови обезьяны и лизате из почек крысы до 7 дней при 37°C. Образцы брали в самом начале, на день 1 и день 7, и анализировали при помощи SDS-PAGE с последующим детектированием при помощи Вестерн-блоттинга с антителами к GFP, как показано на фиг. 76. Последовательность XTEN\_AE864 демонстрировала незначительные признаки деградации после 7 дней в плазме крови. Однако XTEN\_AE864 быстро деградировал в лизате из почек крысы после 3 дней. В образцах плазмы исследовали *in vivo* стабильность гибридного белка, при этом GFP\_AE864 был иммунопреципитирован и проанализирован при помощи SDS-PAGE, как описано выше. Образцы, которые брали вплоть до 7 дней после инъекции, демонстрировали очень небольшое количество признаков деградации. Данные результаты демонстрируют устойчивость aaT-XTEN деградации, обусловленной сывороточными протеазами; это является одним из факторов, приводящих к усилению фармакокинетических свойств гибридных белков aaT-XTEN.

Пример 56. Характеристика вторичной структуры XTEN, связанного с эксендином-4.

Уровень вторичной структуры XTEN\_AE864-E<sub>x4</sub> оценивали при помощи спектроскопии кругового дихроизма. КД-спектроскопию проводили на спектрополяриметре Jasco J-715 (Jasco Corporation, Токио, Япония), оборудованном температурным регулятором Jasco Peltier (TPC-348WI). Концентрацию белка доводили до 0,2 мг/мл в 20 мМ фосфата натрия pH 7,0, 50 мМ NaCl. Эксперименты проводили, используя кварцевые ячейки HELLMА с длиной оптического пути в 0,1 см. КД-спектры снимали при 5°, 25°, 45° и 65°C и обрабатывали, используя J-700 версию 1.08.01 (Build 1) программного обеспечения Jasco для Windows. Образцы при каждой температуре уравнивали на 5 мин перед проведением КД-измерений. Все спектры записывали в двойном экземпляре от 300 до 185 нм, используя ширину полосы в 1 нм и временную постоянную в 2 с при скорости сканирования в 100 нм/мин. На КД-спектре, приведенном на фиг. 77, отсутствуют признаки стабильной вторичной структуры, и он соответствует неструктурированному полипептиду.

Пример 57. Увеличение растворимости и стабильности нагрузочного пептида, обусловленное соединением к XTEN.

Для того чтобы оценить способность XTEN усиливать физико-химические свойства, такие как растворимость и стабильность, готовили и оценивали гибридные белки из глюкагона плюс XTEN меньшей длины. Исследуемые объекты готовили в Трис-солевом буфере при нейтральном уровне pH, а характеристику раствора Gcg-XTEN получали при помощи HPLC и эксклюзионной хроматографии для подтверждения гомогенности и неагрегированности белка в растворе. Данные представлены в табл. 43. В целях сравнения измеряли порог растворимости для немодифицированного глюкагона при 60 мкМ (0,2 мг/мл), и результат демонстрирует, что для всех длин добавляемого XTEN было достигнуто существенное увеличение растворимости. Важным является то, что в большинстве случаев гибридные белки глюкагон-XTEN готовили так, чтобы получить целевые концентрации, и не оценивали в плане определения порога максимальной растворимости для данной конструкции. Однако в случае глюкагона, соединенного с AF-144 XTEN, определили порог растворимости с результатом, который показал достижение 60-кратного увеличения растворимости по сравнению с глюкагоном, не соединенным с XTEN. Вдобавок, при оценке стабильности глюкагон-AP144 обнаружили, что это соединение стабильно в составе жидкого препарата на протяжении по меньшей мере 6 месяцев в охлажденном состоянии и приблизительно на протяжении одного месяца при 37°C (данные не приведены).

Данные подтверждают заключение о том, что соединение полипептидов XTEN небольшой длины с биологически активным белком, таким как глюкагон, может значительно усилить свойства растворимости посредством образования гибридного белка, а также обеспечивает стабильность при более высоких концентрациях.

Растворимость конструкций глюкогон-ХТЕН	
Объект исследования	Растворимость
Глюкогон	60 мкМ
Глюкогон-У36	>370 мкМ
Глюкогон-У72	>293 мкМ
Глюкогон-АF108	>145 мкМ
Глюкогон-АF120	>160 мкМ
Глюкогон-У144	>497 мкМ
Глюкогон-АЕ144	>467 мкМ
Глюкогон-АF144	>3600 мкМ
Глюкогон-У288	>163 мкМ

Пример 58. Аналитическая эксклюзионная хроматография ХТЕН, соединенных с различными нагрузочными веществами.

Анализ при помощи эксклюзионной хроматографии проводили для гибридных белков, содержащих различные терапевтические белки и неструктурированные рекомбинантные белки с увеличивающейся длиной. В одном из примеров исследований использовали колонку TSKGel-G4000 SWXL (7,8 мм × 30 см), в которой 40 мкг очищенного гибридного белка глюкогона с концентрацией 1 мг/мл отделяли при скорости потока в 0,6 мл/мин в 20 мМ фосфата pH 6,8, 114 мМ NaCl. Профили хроматограмм отслеживали, используя ОП214 нм и ОП280 нм. Калибровку колонок для всех исследований проводили, используя калибровочный стандарт для эксклюзионной хроматографии от BioRad; маркеры включают тироглобулин (670 кДа), бычий  $\gamma$ -глобулин (158 кДа), цыплячий овальбумин (44 кДа), конский миоглобулин (17 кДа) и витамин B12 (1,35 кДа). Типичные хроматографические профили для Глюкогон-У288, Глюкогон-У144, Глюкогон-У72, Глюкогон-У36 показаны в виде накладывающихся слоев на фиг. 78. Данные показывают, что молекулярная масса каждого компонента пропорциональна длине присоединенной последовательности ХТЕН. Однако данные также показывают, что кажущаяся молекулярная масса каждой конструкции значительно выше ожидаемой для глобулярного белка (как показано в сравнении со стандартными белками, оцененными в том же исследовании). На основе данных SEC-анализа для всех оцениваемых конструкций в табл. 44 приведены кажущиеся молекулярные массы, фактор кажущейся молекулярной массы (выраженный как отношение кажущейся молекулярной массы к рассчитанной молекулярной массе) и гидродинамический радиус ( $R_H$  в нм). Результаты указывают на то, что инкорпорация различных ХТЕН длиной в 576 аминокислот или более обеспечивает кажущуюся молекулярную массу гибридного белка приблизительно от 339 кДа до 760, и что ХТЕН длиной в 864 аминокислоты или более обеспечивает кажущуюся молекулярную массу, большую чем приблизительно 800 кДа. Результаты, показывающие пропорциональное увеличение кажущейся молекулярной массы по сравнению с фактической молекулярной массой согласованы для гибридных белков, созданных при помощи ХТЕН из нескольких разных семейств мотивов; т.е. AD, AE, AF, AG и AM, при этом увеличение является по меньшей мере четырехкратным, а отношение достигает 17-кратного. Вдобавок, инкорпорация участников слияния ХТЕН, содержащих 576 аминокислот или более, в гибридные белки с различными нагрузочными веществами (и 288 остатков в случае глюкогона, слитого с У288) приводит к значению гидродинамического радиуса в 7 нм или более; что сильно превышает размер глобулярных пор, составляющий приблизительно 3-5 нм. Соответственно, ожидается, что гибридные белки, содержащие прирост и ХТЕН, будут характеризоваться сниженным почечным клиренсом вследствие увеличения конечного периода полувыведения и улучшением терапевтического или биологического эффекта по сравнению с соответствующим негибридным биологическим нагрузочным белком.

## SEC-анализ разных полипептидов

Название конструкции	XTEN или участник слияния	Терапевтический белок	Фактическая ММ (кДа)	Кажущаяся ММ (кДа)	Фактор кажущейся молекулярной массы	R <sub>H</sub> (нм)
AC14	Y288	Глюкагон	28,7	370	12,9	7,0
AC28	Y144	Глюкагон	16,1	117	7,3	5,0
AC34	Y72	Глюкагон	9,9	58,6	5,9	3,8
AC33	Y36	Глюкагон	6,8	29,4	4,3	2,6
AC89	AF120	Глюкагон	14,1	76,4	5,4	4,3
AC88	AF108	Глюкагон	13,1	61,2	4,7	3,9
AC73	AF144	Глюкагон	16,3	95,2	5,8	4,7
AC53	AG576	GFP	74,9	339	4,5	7,0
AC39	AD576	GFP	76,4	546	7,1	7,7
AC41	AE576	GFP	80,4	760	9,5	8,3
AC52	AF576	GFP	78,3	526	6,7	7,6
AC398	AE288	ФVII	76,3	650	8,5	8,2
AC404	AE864	ФVII	129	1900	14,7	10,1
AC85	AE864	Эксендин-4	83,6	938	11,2	8,9
AC114	AM875	Эксендин-4	82,4	1344	16,3	9,4
AC143	AM875	ГРЧ	100,6	846	8,4	8,7
AC302	AE912 + AE144	ГРЧ	119,1	2,287	19,2	11,0
AC227	AM875	IL-1ra	95,4	1103	11,6	9,2
AC228	AM1318	IL-1ra	134,8	2286	17,0	10,5
AC493	AE864	FIX	127,7*	3967	31,1	12,2
AC616	AE864	GLP2-2G	83,1	1427	17,2	10
AC647	AE864	Ghrelin	82,7	996	12	9,2
AC659	AE864	C-пептид	82,7	822	10	8,8
AC663	AE1296	C-пептид	122,2	2348	19,2	11,1
AC434	AE288	aaT	71,1	500	7,0	7,7
AC435	AE576	aaT	97,5	1,127	11,6	9,5
AC345	AM875	aaT	122,6	1,390	11,3	9,9
AC450	AE288	aHer2_scFv	56,2	312	5,5	6,7
AC451	AE576	aHer2_scFv	82,6	760	9,2	8,6
AC452	AE864	aHer2_scFv	109,1	1,390	12,7	9,9

\* за исключением гликозилирования.

Пример 59. Анализ вторичной структуры последовательностей при помощи алгоритмов прогнозирования.

Вторичную структуру аминокислотных последовательностей можно оценить при помощи определенных компьютерных программ или алгоритмов, таких как широко известный алгоритм Чоу-Фасмана (Chou, P.Y., et al. (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) и метод Гарнье-Осгурта-Робсона или "GOR" (Gamier J, Gibrat J.F., Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 266:540-553). Для заданной последовательности с помощью алгоритмов можно спрогнозировать наличие какой-либо вторичной структуры или ее полное отсутствие, выраженное в виде общего количества и/или процентного содержания в последовательности остатков, которые образуют, например, альфа-спирали или бета-слои, либо процентного содержания в последовательности остатков, для которых прогнозируется образование произвольных спиралей.

Оценивали несколько типичных последовательностей, принадлежащих "семействам" XTEN, используя два инструмента для алгоритмов согласно методам Чоу-Фасмана и GOR для оценки уровня вторичной структуры в этих последовательностях. Инструмент для алгоритма Чоу-Фасмана предоставлен Вильямом Р. Пирсоном и Университетом Виржинии на интернет-сайте "Biosupport", URL в World Wide Web: [fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_www.cgi?rm=misc1](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1) на момент 19 июня 2009 г. Инструмент для алгоритма GOR предоставлен Pole Informatique Lyonnais на интернет-сайте Network Protein Sequence Analysis, URL в World Wide Web: [npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_gor4.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl) на момент 19 июня 2008 г.

На первом этапе анализа единичную последовательность XTEN анализировали при помощи двух алгоритмов. Композиция AE864 представляет собой XTEN с 864 аминокислотными остатками, созданный из множественных копий четырех мотивов 12-аминокислотных последовательностей, состоящих их аминокислот G, S, T, E, P и A. Мотивы последовательностей характеризуются тем фактом, что в пределах мотивов и в пределах полной последовательности существует ограничение по повторяемости, так, что последовательность из двух последовательных аминокислот не повторяется более чем дважды в лю-

бом из 12-аминокислотных мотивов, а в полноразмерном XTEN не существует идентичных групп из трех последовательных аминокислот. Более протяженные части последовательности AF 864 из N-конца анализировали одну за другой при помощи алгоритмов Чоу-Фасмана и GOR (для последнего необходима минимальная длина в 17 аминокислот). Последовательности анализировали путем введения последовательностей в формате FASTA в инструменты прогнозирования и проведения анализа. Результаты анализа представлены в табл. 45.

Результаты показывают, что согласно расчетам по алгоритму Чоу-Фасмана короткие XTEN из семейств AE и AG длиной по меньшей мере в 288 аминокислотных остатков не образуют  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев, но количество прогнозируемого процентного содержания произвольных спиралей согласно алгоритму GOR варьируется в пределах 78-99%. С увеличением длины XTEN от 504 остатков до более чем 1300, анализ XTEN по алгоритму Чоу-Фасмана дал прогноз процентного содержания  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -слоев от 0 до около 2%, а рассчитанное процентное содержание произвольных спиралей возросло до 94-99%. XTEN с прогнозируемыми  $\alpha$ -спиралями или  $\beta$ -слоями были те последовательности, которые содержали одну или более групп из трех последовательных остатков серина, что привело к прогнозированию образования  $\beta$ -слоев. При этом даже эти последовательности характеризуются вероятностью образования произвольных спиралей в 99%.

Данный анализ подтверждает заключение о том, что 1) для XTEN, созданных из множественных мотивов последовательностей из G, S, T, E, P и A, которые имеют ограниченную повторяемость в отношении последовательных аминокислот, прогнозируется очень низкая вероятность образования  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев; 2) увеличение длины XTEN не приводит к значительному увеличению вероятности образования  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев; и 3) прогрессивное увеличение длины последовательности XTEN путем добавления неповторяющихся 12-меров, состоящих из аминокислот G, S, T, E, P и A, приводит к увеличенному процентному содержанию произвольных спиральных образований. На основе многих последовательностей, оцененных при помощи данных методов, можно заключить, что XTEN, созданные из мотивов последовательностей G, S, T, E, P и A, которые имеют ограничение по повторяемости (определяемое как присутствие не более двух идентичных последовательных аминокислот в любом из мотивов), как ожидается, имеют очень ограниченную вторичную структуру. За исключением мотивов, содержащих три последовательных серина, в общем случае любой порядок или комбинацию мотивов последовательностей из табл. 1 можно использовать для создания полипептида XTEN, что приведет к образованию последовательности XTEN, практически лишенной вторичной структуры, а эффект, оказываемый тремя последовательными серинами, улучшается при увеличении длины XTEN. Ожидается, что такие последовательности будут обладать характеристиками, описанными в вариантах реализации XTEN-содержащих композиций изобретения, раскрытых в данном тексте.



Прогнозные расчеты по методам Чоу-Фасмана и GOR для последовательностей полипептидов

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
AE36: LCW0402 _002	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAP	36	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	94,44%
AE36: LCW0402 _003	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAP	36	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	94,44%
AG36: LCW0404 _001	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSP	36	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	77,78%
AG36: LCW0404 _003	GSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSST PSGATGSP	36	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	83,33 %
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGS	42	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	90,48%
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGS	42	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	90,48%
AG42_1	GAPSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSPG	42	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	88,10%
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPASTGTGPGASP	42	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	88,10%
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAP	144	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	98,61%
AG144_1	PGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPAS TGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGS GTASS	144	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	91,67%
AE288	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP	288	Итоги по остаткам:	99,31%

	ESPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSEATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSEATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAP		Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	
AG288_2	GSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPAS TGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSP PGTPGSGTASSSP	288	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	92,71
AF504	GASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGNSPASTGTGPGASPGTSSG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGNSPASTGTGPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSG SPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPG GTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSP PGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPG ASPGTSSGSP	504	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	94,44%
AD 576	GSSSEGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSE SGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSS EGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGG PGESPGSSGSESGSESGSGPGESSGSS ESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGS SEGGPGSGGEPSESGSSGEPGSSGSGS ESGESPGSSGSESGSGGEPSESGSSGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGE PSESGSSGSESGSGPGESSGESPGSSG SESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG SGGEPSESGSSGSESGSSEGGPGESPG GSSGSESGEPGSSGSESGESPGSSG GSESGEPGSSGSESGESPGSSGSESG GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSE GSSGPGESSGSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSESGSSEGGPGSGGEPSESG SSGESPGSSGSESGESPGSSGSESGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESG SSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESG	576	Итоги по остаткам: Н: 7 Е: 0 процент: Н: 1,2 Е: 0,0	99,65%

	GSSGESPGSSGSESGSESSGPGESS GSSESGSSEGGPGSESSGPGESS			
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP	576	Итоги по остаткам: Н: 2 Е: 0 процент: Н: 0,4 Е: 0,0	99,65%
AG576	PGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGT PGSGTASSPGASPGTSSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSPGASPGTSSSTGSP GASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSS PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS STGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGT SSSTGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPG ASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSP GSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGT ASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTG	576	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 3 процент: Н: 0,4 Е: 0,5	99,31%
AF540	GSTSTAESPGPGSTSSTAESPGPGST ESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTA SPGPGTSTEPESGASPGTSESPSGTAP GTSPGESSTAPGSTSESPSGTAPGST ESPSGTAPGTSPGESSTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSPGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGST ESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSESPS GTAPGTSTEPESGASPGTSSTAESPGP GSTSTAESPGPGTSTEPESGASPGTST PESGASPGTSESPSGTAPGTSTEPESG SASPGTSTEPESGASPGTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGST	540	Итоги по остаткам: Н: 2 Е: 0 процент: Н: 0,4 Е: 0,0	99,65

	STAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESG SASPGTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAP			
AD836	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESP GGSSGESSEGGEPSESGSSGESPPGGS SGSESGESPGGSSGESSESGSSEGG PGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGES PGSSSGSESGESPSSSGSESGESPGG SSGESSESGSSEGGPGSSESGSSEGG GPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPG SSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGG EPSESGSSGESPPGSSGESSESGSPGSS GSESGSGGEPSESGSSGSESSGPGESS GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSE GSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGESPPGSSGESSESGSGGEPSESG SSGSGGEPSESGSSGESSESGSSEGGPGS GGEPSESGSSGGGEPSESGSSGSESS GPGESSGESPPGSSGESSESGSSGPG ESSGSESGSGPGESSGSGGEPSESGSSG SSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESP GSSGESSEGGEPSESGSSGSESSGP GESSGESPPGSSGESSESGSSGPGSSE SGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESSG PGESSGSESSGPGESSGSESSGPGES SGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGES PGSSGESSESGSPGSSGESSESGGEP SESGSSGSESSGPGESSGESPPGSSGS ESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSESG SSEGGPGESPSSGESSESGSGGEPSESG GSSGESSESGSSEGGPGESPSSGESSESG GSGGEPSESGSSGESPPGSSGESSESGG GEPSESGSS	836	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	98,44%
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT	864	Итоги по остаткам: Н: 2 Е: 3 процент: Н: 0,2 Е: 0,4	99,77%

	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP			
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESG SASPSTPESGASAPGTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGTSTPESGSASPGTSESPS GTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGTSTSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSTSTAESPGPGTSPSGES STAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAP GTSTPESGPGXXXGASASGAPSTXXXX SESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESP SGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTA PGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTS PSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSAS PGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTS PSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGTSTPESGSASPGTSESPSGTA PGTSTPESGSASPGTSTSTAESPGPGST SESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGE SSTAPGTSSTAESPGPGTSPSGESSTA PGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTS PSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSTA ESPGPGTSTSTAESPGPGTSPSGESSTA PGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSP	875	Итоги по остаткам: Н: 2 Е: 0 процент: Н: 0,2 Е: 0,0	95,20%
AG864	GASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG	864	Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0,0 Е: 0,0	94,91%

	PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSP			
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTPESG SASPGTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTEPSEGSAPGTSTPESGSASPGESEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSSTAESPGPGTSESPSGTA PGTSPGESSTAPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSSTAESPGPGTSTAESPGPGT SPGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTAESP GPGTSTPESGSASPSTSESPSGTAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP	875	Итоги по остаткам: Н: 7 Е: 3 процент: Н: 0,8 Е: 0,3	98,63%
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTPESG SASPGTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTEPSEGSAPGTSTPESGSASPGESEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA	1318	Итоги по остаткам: Н: 7 Е: 0 процент: Н: 0,7 Е: 0,0	99,17%

	<p>GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE          GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP          GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE          SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG          SETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSP          GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTS          TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS          GSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE          EGTSTEPSEGSAPGPEPTGPAPSGGSEP          ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT          STEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE          GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPA          GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAE          SPGPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP          GSTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSP          SGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP          ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP          GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST          EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE          GSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP          GTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPA          GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSAST          GTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS          PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA          SPGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPSG          ESSTAPGTSSTAESPGPGTSPSGESST          APGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG          TSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTP          SGATGSPGASPGTSSGSPGTSTEPESG          SASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP          GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST          EPSEGSAPGTSESPSGTAPGTSESPS          GTAPGTSTEPSEGSASPGSPAGSPTSTEE          GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA          GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG          SETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSP          GSSTPSGATGSPGTSESPSGTAPGTSP          SGESSTAPGTSSTAESPGGSSTPSGA          TGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSP          GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST          EPSEGSAP</p>			
AM923	<p>MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSGSPGS          STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSTEP          SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST          EEGTSSTAESPGPGTSTEPSEGSASPGS          TSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPE          SGSASPGTSTEPSEGSASPGSEPATSGSE          TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT          STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP          SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST          EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT          SESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEP          SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES          GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS          PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGS          GTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSE          SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG          SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE</p>	924	Итоги по остаткам: Н: 4 Е: 3 процент: Н: 0,4 Е: 0,3	98,70%

	PSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG STSSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTS STAESPGPGSTSSSTAESPGPGTSPSGES STAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAS PGTSTGSPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSTGSPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAP			
AE912	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASPGTSSGSPGPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAP	913	Итоги по остаткам: Н: 8 Е: 3 процент: Н: 0,9 Е: 0,3	99,45%
BC 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEP ATSGTEPSGGASEPTSTEPGSEPAT GTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEP SGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSE PATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPAT GTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGS AGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGS		Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0 Е: 0	99,77%



EPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSGAS EPTSTEPGTSEPSTSEPGAGSEPATSGT EPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAG TSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPA TSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGT EPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAG SEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTE PSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTS TEPGTSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPG SEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPA TSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEP GSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTST EPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSE PGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTST EPSEPGSAGTSEPSTSEPGAGSGASEPT STEPGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSG ASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATS GTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEP SGTSEPSTSEPGAGSEPATSGTEPSGSG ASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATS GTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGS A			
--	--	--	--

\* Н:  $\alpha$ -спираль, Е:  $\beta$ -слой.

Пример 60. Анализ полипептидных последовательностей на повторяемость.

Повторяемость полипептидных аминокислотных последовательностей можно оценить путем подсчета количества появлений более короткой подпоследовательности во всем полипептиде. Например, полипептид из 200 аминокислотных остатков содержит 192 перекрывающихся 9-аминокислотных подпоследовательности (или 9-мерных "рамок"), но количество уникальных 9-мерных подпоследовательностей зависит от количества повторов в пределах последовательности. В настоящем анализе оценивали на повторяемость различные последовательности путем суммирования появления всех уникальных 3-мерных подпоследовательностей для каждой 3-аминокислотной рамки среди первых 200 аминокислот части полимера и деления на абсолютное количество уникальных 3-мерных подпоследовательностей в пределах последовательности из 200 аминокислот. Полученное в результате значение для подпоследовательностей отображает степень повторяемости в пределах полипептида.

Результаты, приведенные в табл. 46, указывают на то, что неструктурированные полипептиды, состоящие из 2 или 3 типов аминокислот, имеют высокие значения для подпоследовательностей, в то время как те, что состоят из 12 аминокислотных мотивов из шести аминокислот G, S, T, E, P и A с низкой степенью интервальной повторяемости, имеют значения для подпоследовательностей менее 10 и в некоторых случаях менее 5. Например, последовательность L288 содержит два типа аминокислот и имеет короткие, часто повторяющиеся последовательности, что приводит к значению для подпоследовательностей в 50,0. Полипептид J288 содержит три типа аминокислот, но также имеет короткие, часто повторяющиеся последовательности, что приводит к значению для подпоследовательностей в 33,3. Y576 также содержит три типа аминокислот, но не состоит из интервальных повторов, что отображается на величине для подпоследовательностей, составляющей 15,7 для первых 200 аминокислот. W576 состоит из четырех типов аминокислот, но имеет более высокую степень интервальной повторяемости, например, "GGSG", что приводит к значению для подпоследовательностей в 23,4. AD576 состоит из четырех типов 12-аминокислотных мотивов, каждый из которых состоит из четырех типов аминокислот. Из-за низкой степени интервальной повторяемости отдельных мотивов общее значение для подпоследовательностей среди первых 200 аминокислот составляет 13,6. В противоположность этому XTEN, состоящий из четырех мотивов, содержит шесть типов аминокислот, каждая с низкой степенью интервальной повторяемости, и имеет более низкие значения для подпоследовательностей: т.е. AE864 (6,1), AF864 (7,5) и AM875 (4,5). Выводы: Данные результаты указывают на то, что комбинация из 12-аминокислотных мотивов подпоследовательностей, каждый из которых содержит от четырех до шести типов аминокислот, которые являются в основном неповторяемыми, в более протяженном полипептиде XTEN приводит к тому, что вся последовательность является неповторяемой. Это справедливо, несмотря на тот факт, что каждый мотив подпоследовательностей может быть неоднократно использован на протяжении последовательности. В противоположность этому полимеры, созданные из меньшего количества типов аминокислот, имеют более высокие значения для подпоследовательностей, хотя реальная последовательность может быть обрезана для уменьшения степени повторяемости и получения более низких значений для подпоследовательностей.





	GSGGEPSESGSSGESPGGSSGESGESPGGSSGESGSSESSESSEGGPGSGGEP SESGSSGSSESSEGGPGSGGEPSESGSSGSSEGGEPSESGSSGESPGGSSGES GSESGSGPGESSGSSESSEGGPGSEGGSSGPGESS	
AE576	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	6,1
AF540	GSTSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSES PGTAPGTSSTAESP GPGTSSSTA ESPGPGTSTEPESGASPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGES TAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTS ESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSTEPESGAS PGTSTEPESGASPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSTEPESGASPGTSES PSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSSSTAESP GPGTSTEPESGASPG TSTEPESGASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSES GTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGT PSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSTEPESGASPGTSESPSGTAP	8,8
AF504	GASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTSGGTASSSPGSSTPS GATGSPGNPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGNPSASTGTGPG GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGT SSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSP GASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTSGGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGT SSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSGSP	7,0
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	6,1
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGTSTEPESGASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGES TAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSTEPESGASPGTSTEPESGASPGTS ESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSSSTAESP GPGTSTEPESGAS PGTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTEP SGSASPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPGTSSSTAESP GPG TSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGPGXXXGASASGA PSTXXXSES PGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGT SESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTEPESGASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESST	7,5

	APGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGSTSE SPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSSSTAESP GPGTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGT SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSSSTAES P GPGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	
AG868	GGSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGA SPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSS GSPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGAS PGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTG SPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGS PGASPGTSSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSA STGTGPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSP	7,5
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTPES GSASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGS EPATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASAG APSTGGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGS TSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSEPATSGSETPGTSEATPESGPGSEPATSGSETPGTSSSTAESP GPGS STAESP GPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS PGTSSSTAESP GPGTSTPESGSASPGTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSP GSEPATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSSTGSPGTPSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	4,5
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSSTAESPGPGTSTPES GSASPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGS EPATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSEATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGPEPTGP APSGGSEPATSGSETPGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSSTAESPGGTPSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSESPSGTAPGTSE SPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSEATPESGPGTSEATPESGP GSEPATSGSETPGTSEATPESGPGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSEAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGAS ASGAPSTGGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSEATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSEATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESPSGTAPGTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGSPAGSPTSTEEGTSEATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT	4,5
	SEATPESGPGSEPATSGSETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGSSTPSGAT GSPGTSSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSSSTAESP GPGSSTPSGATGSPGASP GTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS A	

Пример 61. Расчет значений для ТЕРИТОРЕ.

Значения для ТЕРИТОРЕ 9-мерной пептидной последовательности можно рассчитать путем добавления карманных потенциалов, как описано у Sturniolo [Sturniolo, T., et al. (1999) Nat Biotechnol, 17: 555]. В настоящем примере отдельные значения для Територе рассчитывали для индивидуальных аллелей HLA. В табл. 47 в качестве примера приведены карманные потенциалы для HLA\*0101B, который имеет большую частоту появления среди европоидной расы. Для того чтобы рассчитать значение для ТЕРИТОРЕ пептида с последовательностью P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9, добавляли соответствующие индивидуальные карманные потенциалы из табл. 47. Значение для HLA\*0101B 9-мерного пептида с последовательностью FDKLPRTSG представляет собой сумму 0, -1,3, 0, 0,9, 0, -1,8, 0,09, 0, 0.

Для оценки значений ТЕРИТОРЕ протяженных пептидов можно повторить процесс для всех 9-мерных подпоследовательностей, принадлежащих последовательностям. Этот процесс можно повторять для белков, кодируемых другими аллелями HLA. В табл. 48-51 приведены карманные потенциалы для белковых продуктов аллелей HLA, которые имеют большую частоту появления среди европоидной расы.

Рассчитанные по данному методу значения для ТЕРИТОРЕ находятся в диапазоне от приблизительно -10 до +10. При этом 9-мерные пептиды, у которых отсутствует гидрофобная аминокислота (FKLMVWY) в позиции P1, характеризуются расчетными значениями ТЕРИТОРЕ в диапазоне от -1009 до -989. Данная величина является биологически бессмысленной и отображает тот факт, что гидрофобная аминокислота служит в качестве якорного остатка для связывания HLA, а пептиды, у которых отсутствует гидрофобный остаток в P1, считаются не связывающимися с HLA. Так как в большинстве последовательностей ХТЕН отсутствуют гидрофобные остатки, все комбинации 9-мерных подпоследовательностей будут характеризоваться значениями ТЕРИТОРЕs в диапазоне от -1009 до -989. Данный метод подтверждает то, что полипептиды ХТЕН прогнозируемо могут содержать мало или не содержать эпитопы Т-клеток.

Таблица 47

Карманный потенциал для аллеля HLA\*0101B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-2,4	-	-2,7	-2	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,4	-	-2,4	-0,6	-	-1,9
F	0	0,8	0,8	0,08	-	-2,1	0,3	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	-0,7	-	-0,3	-1,1	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	-0,7	-	-2,2	0,1	-	-1,1
I	-1	1,1	1,5	0,5	-	-1,9	0,6	-	0,7
K	-999	1,1	0	-2,1	-	-2	-0,2	-	-1,7
L	-1	1	1	0,9	-	-2	0,3	-	0,5
M	-1	1,1	1,4	0,8	-	-1,8	0,09	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	0,04	-	-1,1	0,1	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-1,9	-	-0,2	0,07	-	-1,1
Q	-999	1,2	0	0,1	-	-1,8	0,2	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	-2,1	-	-1,8	0,09	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,7	-	-0,6	-0,2	-	-0,3
T	-999	0	0	-1	-	-1,2	0,09	-	-0,2
V	-1	2,1	0,5	-0,1	-	-1,1	0,7	-	0,3
W	0	-0,1	0	-1,8	-	-2,4	-0,1	-	-1,4
Y	0	0,9	0,8	-1,1	-	-2	0,5	-	-0,9

Таблица 48

Карманный потенциал для аллеля HLA\*0301B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	2,3	-	-2,4	-0,6	-	-0,6
E	-999	0,1	-1,2	-1	-	-1,4	-0,2	-	-0,3
F	-1	0,8	0,8	-1	-	-1,4	0,5	-	0,9
G	-999	0,5	0,2	0,5	-	-0,7	0,1	-	0,4
H	-999	0,8	0,2	0	-	-0,1	-0,8	-	-0,5
I	0	1,1	1,5	0,5	-	0,7	0,4	-	0,6
K	-999	1,1	0	-1	-	1,3	-0,9	-	-0,2
L	0	1	1	0	-	0,2	0,2	-	-0
M	0	1,1	1,4	0	-	-0,9	1,1	-	1,1
N	-999	0,8	0,5	0,2	-	-0,6	-0,1	-	-0,6
P	-999	-0,5	0,3	-1	-	0,5	0,7	-	-0,3
Q	-999	1,2	0	0	-	-0,3	-0,1	-	-0,2
R	-999	2,2	0,7	-1	-	1	-0,9	-	0,5
S	-999	-0,3	0,2	0,7	-	-0,1	0,07	-	1,1
T	-999	0	0	-1	-	0,8	-0,1	-	-0,5
V	0	2,1	0,5	0	-	1,2	0,2	-	0,3
W	-1	-0,1	0	-1	-	-1,4	-0,6	-	-1
Y	-1	0,9	0,8	-1	-	-1,4	-0,1	-	0,3

Карманный потенциал для аллеля HLA\*0401B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	1,4	-	-1,1	-0,3	-	-1,7
E	-999	0,1	-1,2	1,5	-	-2,4	0,2	-	-1,7
F	0	0,8	0,8	-0,9	-	-1,1	-1	-	-1
G	-999	0,5	0,2	-1,6	-	-1,5	-1,3	-	-1
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-1,4	0	-	0,08
I	-1	1,1	1,5	0,8	-	-0,1	0,08	-	-0,3
K	-999	1,1	0	-1,7	-	-2,4	-0,3	-	-0,3
L	-1	1	1	0,8	-	-1,1	0,7	-	-1
M	-1	1,1	1,4	0,9	-	-1,1	0,8	-	-0,4
N	-999	0,8	0,5	0,9	-	1,3	0,6	-	-1,4
P	-999	-0,5	0,3	-1,6	-	0	-0,7	-	-1,3
Q	-999	1,2	0	0,8	-	-1,5	0	-	0,5
R	-999	2,2	0,7	-1,9	-	-2,4	-1,2	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	0,8	-	1	-0,2	-	0,7
T	-999	0	0	0,7	-	1,9	-0,1	-	-1,2
V	-1	2,1	0,5	-0,9	-	0,9	0,08	-	-0,7
W	0	-0,1	0	-1,2	-	-1	-1,4	-	-1
Y	0	0,9	0,8	-1,6	-	-1,5	-1,2	-	-1

Карманный потенциал для аллеля HLA\*0701B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-1,6	-	-2,5	-1,3	-	-1,2
E	-999	0,1	-1,2	-1,4	-	-2,5	0,9	-	-0,3
F	0	0,8	0,8	0,2	-	-0,8	2,1	-	2,1
G	-999	0,5	0,2	-1,1	-	-0,6	0	-	-0,6
H	-999	0,8	0,2	0,1	-	-0,8	0,9	-	-0,2
I	-1	1,1	1,5	1,1	-	-0,5	2,4	-	3,4
K	-999	1,1	0	-1,3	-	-1,1	0,5	-	-1,1
L	-1	1	1	-0,8	-	-0,9	2,2	-	3,4
M	-1	1,1	1,4	-0,4	-	-0,8	1,8	-	2
N	-999	0,8	0,5	-1,1	-	-0,6	1,4	-	-0,5
P	-999	-0,5	0,3	-1,2	-	-0,5	-0,2	-	-0,6
Q	-999	1,2	0	-1,5	-	-1,1	1,1	-	-0,9
R	-999	2,2	0,7	-1,1	-	-1,1	0,7	-	-0,8
S	-999	-0,3	0,2	1,5	-	0,6	0,4	-	-0,3
T	-999	0	0	1,4	-	-0,1	0,9	-	0,4
V	-1	2,1	0,5	0,9	-	0,1	1,6	-	2
W	0	-0,1	0	-1,1	-	-0,9	1,4	-	0,8
Y	0	0,9	0,8	-0,9	-	-1	1,7	-	1,1

Карманный потенциал для аллеля HLA\*1501B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-0,4	-	-0,4	-0,7	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,6	-	-1	-0,7	-	-1,9
F	-1	0,8	0,8	2,4	-	-0,3	1,4	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	0	-	0,5	0	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-0,5	0,6	-	-1,1
I	0	1,1	1,5	0,6	-	0,05	1,5	-	0,7
K	-999	1,1	0	-0,7	-	-0,3	-0,3	-	-1,7
L	0	1	1	0,5	-	0,2	1,9	-	0,5
M	0	1,1	1,4	1	-	0,1	1,7	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	-0,2	-	0,7	0,7	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-0,3	-	-0,2	0,3	-	-1,1
Q	-999	1,2	0	-0,8	-	-0,8	-0,3	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	0,2	-	1	-0,5	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,3	-	0,6	0,3	-	-0,3
T	-999	0	0	-0,3	-	-0	0,2	-	-0,2
V	0	2,1	0,5	0,2	-	-0,3	0,3	-	0,3
W	-1	-0,1	0	0,4	-	-0,4	0,6	-	-1,4
Y	-1	0,9	0,8	2,5	-	0,4	0,7	-	-0,9

Пример 62. Анализ мобилизационной активности GPCR Ca<sup>2+</sup>.

Рекомбинантный GLP2-2G-XTEN готовили, как описано в Alters, S. et al. (2012) GLP2-2G-XTEN: фармацевтический белок с улучшенными сывороточным периодом полувыведения и эффективностью в крысиной модели болезни Крона. PLoS One; 7(11): e50630. Конъюгат GLP2-2G-XTEN готовили, как описано в примере 26 (фиг. 68), и очищали при помощи препаративной RP-HPLC (фиг. 70). Анализ мобилизационной активности потока GPCR Ca<sup>2+</sup> проводили, используя кальций-оптимизированную стабильную клеточную линию рекомбинантных человеческих рецепторов GLP-2 семейства глюкоагонов от EMD Millipore ChemiSCREEN, используемую согласно инструкциям производителя, с результатами, представленными на фиг. 110. Данные по рекомбинантному и конъюгированному GLP2-2G-XTEN были представлены в виде восьмиточечной кривой доза-ответ для трехкратного серийного разведения. Кривые доза-ответ аппроксимировали, используя 4PL-регрессионный график, где по оси Y отложены ОЕФ, с данными, выраженными в процентах относительно абсолютного максимума ОЕФ, в зависимости от концентрации, отложенной по оси X. Как рекомбинантный GLP2-2G-XTEN, так и конъюгат GLP2-2G-XTEN демонстрировали зависимость от дозировки активность агонистов с прогнозируемыми величинами эффективности EC<sub>50</sub> в 423 нМ и 529 нМ соответственно.

Пример 63. Анализ *in vitro* плазменной стабильности конъюгата GLP2-2G-XTEN.

Одинаковые концентрации рекомбинантного GLP2-2G-XTEN и конъюгата GLP2-2G-XTEN независимо вносили соответственно в плазму крови крысы, яванского макака и человека. Образцы инкубировали при 37°C до 10 дней, забирая аликвоты в соответствующие временные интервалы, и хранили при -80°C до проведения анализа. Плазменную стабильность конъюгированного GLP2-2G-XTEN для различных видов сравнивали с соответствующей величиной для рекомбинантного GLP2-2G-XTEN при помощи анти-XTEN/GLP2 ELISA, проводимого в соответствующих плазменных матрицах. Анти-XTEN/GLP2 ELISA состоит из мышиного антитела к XTEN в качестве захватывающего антитела и биотинилированного антитела к человеческому GLP2 в качестве детекторного антитела. Как показано на фиг. 111, *in vitro* стабильность конъюгата GLP2-2G-XTEN в человеческой плазме сравнима со значением для рекомбинантного GLP2-2G-XTEN, имеющего рассчитанный стабильный период полувыведения >240 ч. Аналогичную *in vitro* стабильность наблюдали для двух белков GLP2-2G-XTEN в плазме крови крысы и яванского макака (данные не приведены).

Пример 64. Фармакокинетика конъюгата GLP2-2G-XTEN для крыс.

Самок крыс штамма SD (200-220 г) случайным образом собирали в группы по 3 животных в каждой. Рекомбинантный GLP2-2G-XTEN и конъюгат GLP2-2G-XTEN вводили каждому животному путем подкожной инъекции в дозировке 2 мг/кг. Образцы крови (0,2 мл) собирали в предварительно охлажденные гепаринизированные микротайнеры перед дозированием, и через 0,08, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч после введения исследуемых соединений. Затем кровь перерабатывали в плазму, моментально замора-



живали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа. Образцы плазмы анализировали при помощи анти-XTEN/GLP2 ELISA, в котором используется мышинное антитело к XTEN в качестве захватывающего антитела и биотинилированное антитело к человеческому GLP2 в качестве детекторного антитела. ELISA проводили, используя подходящий рекомбинантный GLP2-2G-XTEN или конъюгат GLP2-2G-XTEN в качестве соответствующих калибровочных стандартов ELISA (фиг. 112). Рассчитанный период полувыведения для рекомбинантного GLP2-2G-XTEN ( $36 (\pm 7)$  ч) и конъюгата GLP2-2G-XTEN ( $37 (\pm 7)$  ч) оказался сходным.

Пример 65. Тримерный конъюгат XTEN, соединенный посредством С-концевых цистеинов.

Тримерный конъюгат XTEN готовили согласно следующей процедуре. Аликвоту белка XTEN 1xAmino,1xThiol-XTEN432 (XTEN\_AE432(Am1,C422)) с одним внутренним остатком цистеина готовили в виде 587 мкМ (23,23 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Трис-[2-малеинимидоэтил]амин (ТМЭА, Thermo Scientific, cat. # 33043) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 10 мМ. ТМЭА добавляли в белковый раствор для связывания тиоловой группы XTEN (с количеством белка, в 5× превышающем в молярном отношении количество линкера). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при  $25^{\circ}\text{C}$ , а продукт реакции анализировали при помощи SEC-HPLC (Phenomenex BioSep-SEC-s4000 600×7,80 мм, буфер: 50 мМ фосфата натрия pH 6,5, 300 мМ NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, изократическое элюирование на протяжении 70 мин). Линейные XTEN\_432, XTEN\_864 и XTEN\_1296 (содержащие 432, 864 и 1296 аминокислоты соответственно) анализировали в тех же условиях, чтобы определить реакционные продукты (фиг. 113). Пик 1, элюированный на 28 мин, в то же время, что и XTEN\_1296, идентифицировали как тример XTEN\_432. Пик 2, элюированный на 30,5 мин, в то же время, что и XTEN\_864, идентифицировали как димер XTEN\_432. Пик 3, элюированный на 35 мин, в то же время, что и XTEN\_432, идентифицировали как предшественник XTEN\_432. Выходы тримерного конъюгата XTEN и димерного конъюгата XTEN составили 19 и 36% соответственно. В основном схожие времена удержания для тримерного конъюгата 3xXTEN\_432 и линейной молекулы XTEN\_1296 дают возможность предположить, что кажущаяся молекулярная масса и гидродинамический радиус белка XTEN не зависят от его геометрической конфигурации.

Пример 66. Тримерный конъюгат XTEN, соединенный посредством N-концевых  $\alpha$ -аминогрупп.

Тримерный конъюгат XTEN готовили согласно следующей процедуре.

#### 1. Синтез 1xDBCO-XTEN288.

Аликвоту белка 1xAmino-XTEN288 (XTEN\_AE288(Am1)) готовили в виде 758 мкМ (20 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. 2 мл белка смешивали с 0,1 мл 1М ГЭПЭС pH 8,0 и 0,152 мл 50 мМ ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ для связывания группы ДБЦО с N-концевой аминогруппой XTEN. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при  $25^{\circ}\text{C}$  и анализировали при помощи аналитической RP-HPLC (фиг. 114А). Реакционную смесь разводили до 15 мл с 0,01% ТФК, а pH доводили до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор делили на две одинаковые части, и каждую часть загружали в препаративную C4 RP-HPLC колонку Vydac C4 250×10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO-XTEN288, доводили до pH ~7 при помощи 1М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме.

#### 2. Синтез 3xAzide-PEG4-TAЕА.

Трис-(2-аминоэтил)амин (ТАЕА, Sigma Aldrich, cat. # 225630) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 200 мМ. Азидо-ПЭГ4-NHS эфир (Click Chemistry Tools, cat. # AZ103) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 1М. Азидо-ПЭГ4-NHS смешивали в количестве, 5-кратно превышающем в молярном отношении, с Трис-(2-аминоэтил)амином и инкубировали при  $25^{\circ}\text{C}$  на протяжении 1 ч. 3xAзид-ПЭГ4-ТАЕА очищали, используя C18 RP-HPLC, используя колонку Phenomenex Jupiter C18 5u 300 Å 150 × 4.60 мм, буфер А 0,1% ТФК в воде, буфер В 0,1% ТФК в ацетонитриле, скорость потока 1 мл/мин, градиент от 5 до 50% В за 45 мин. Хроматографические пики собирали и анализировали при помощи MALDI-TOF MS и ESI-MS, чтобы зарегистрировать продукт с ММ в 966 Да. 3xAзид-ПЭГ4-ТАЕА определяли как пик со временем удержания в 33 мин (фиг. 114В). Фракции нейтрализовали, используя 1М ГЭПЭС pH 8,0 и концентрировали выпариванием в вакууме.

#### 3. Синтез тримерного конъюгата XTEN.

1xDBCO-XTEN288 готовили в виде 7,85 мг/мл (293 мкМ) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. 3xAзид-ПЭГ4-ТАЕА очищали при помощи RP-HPLC и формулировали в том же буфере. Концентрацию синтезированного линкера не определяли, а 1xDBCO-XTEN288 и 3xAзид-ПЭГ4-ТАЕА смешивали эмпирически в разных соотношениях и инкубировали при  $25^{\circ}\text{C}$  на протяжении 4 ч. Продукты конъюгации анализировали, используя SEC-HPLC (Phenomenex BioSep-SEC-s4000 600×7,80 мм, буфер: 50 мМ фосфата натрия pH 6,5, 300 мМ NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, изократическое элюирование на протяжении 70 мин). Линейные XTEN\_288, XTEN\_576 и XTEN\_864 анализировали в тех же условиях, чтобы определить реакционные продукты (фиг. 115). Пик 1, элюированный на 30,5 мин, в то же время, что и XTEN864, идентифицировали как тример XTEN288. Пик 2, элюированный на 34 мин, в то же время, что

и XTEN\_576, идентифицировали как димер XTEN\_288. Пик 3, элюированный на 39 мин, в то же время, что и XTEN\_288, идентифицировали как предшественник XTEN\_288. Пик 4 соответствует соединениям с низкой молекулярной массой и не был включен в количественный анализ групп XTEN. Выход тримерного конъюгата XTEN при оптимизированном соотношении белок/линкер составил 57%. В основном схожие времена удержания для тримерного конъюгата 3xXTEN\_288 и линейной молекулы XTEN\_864 подтверждают более раннее наблюдение, что кажущаяся молекулярная масса и гидродинамический радиус белка XTEN не зависят от его геометрической конфигурации.

Пример 67. Избирательная цитотоксичность 3xFA( $\gamma$ ),3xММАЕ-XTEN для KB-клеток.

Оценивали способность избирательного нацеливания и уничтожения клеток, содержащих фолатные рецепторы. Исследуемые образцы свободного ММАЕ, ненацеленного конъюгата 3xММАЕ-XTEN (XTEN, соединенный с токсином) и нацеленного на фолатный рецептор конъюгата 3xFA( $\gamma$ ),3xММАЕ-XTEN оценивали в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа, используя позитивную к фолатным рецепторам клеточную линию KB. Так как культуральная среда характеризуется высоким содержанием фолиевой кислоты, KB-клетки выращивали в не содержащей фолиевой кислоты среде, содержащей 10% инактивированную теплом фетальную телячью сыворотку при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> на протяжении по меньшей мере 7 дней до начала эксперимента по жизнеспособности клеток. Также эту среду использовали для проведения эксперимента. Вкратце, KB-клетки высевали в количестве 10000 клеток на лунку на 96-луночный микротитровальный планшет для анализа. KB-клеткам давали возможность прикрепиться к планшету путем инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем использованную среду удаляли, и в лунки, содержащие конкурентное фолиевой кислоте вещество, добавляли среду для количественного определения, содержащую фолиевую кислоту, в то время как в лунки, не содержащие конкурентное фолиевой кислоте вещество, добавляли только среду для количественного определения. Планшет инкубировали на протяжении 30 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, перед тем как удалить среду для количественного определения, и планшет отмывали средой для количественного определения. Свободный ММАЕ, 3xММАЕ-XTEN и 3xFA( $\gamma$ ),3xММАЕ-XTEN в присутствии или отсутствие конкурентного фолиевой кислоте вещества добавляли затем в соответствующих диапазонах дозирования. Затем планшет дополнительно инкубировали на протяжении 2-4 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем среду удаляли, планшет отмывали и вносили свежую среду, а планшет инкубировали на протяжении дополнительных 48-72 ч. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo и считывали планшет на люминесцентном счетчике. Для каждого исследуемого объекта определяли IC<sub>50</sub>, используя аппроксимацию логистической кривой с 4 параметрами при помощи GraphPad Prism.

Результаты. Как показано на фиг. 116, свободное лекарственное вещество ММАЕ демонстрирует высокоэффективный киллинг KB-клеток и характеризуется IC<sub>50</sub> в 0,8 нМ, в то время как 3 копии ММАЕ, конъюгированного с ненацеленным XTEN, приводят по меньшей мере к 3 log снижению клеточного киллинга (IC<sub>50</sub> >1000 нМ). Важным является то, что дополнительные 3 копии нацеленных на фолат доменов конъюгата 3xММАЕ-XTEN сохранили свойство клеточного киллинга и характеризуется IC<sub>50</sub> в 4,2 нМ; а также имеют уровень активности, близкий наблюдаемому для свободного ММАЕ. Также важно то, что внесение фолиевой кислоты в качестве конкурента нацеленного конъюгата снизило наблюдаемую активность клеточного киллинга у 3xFA( $\gamma$ ),3xММАЕ-XTEN в отношении клеточной линии KB. Данное снижение эффективного клеточного киллинга лекарственного конъюгата фолат-XTEN (от 4,2 до >1000 нМ) подтверждает вывод о том, что зарегистрированная клеточная токсичность в условиях эксперимента стимулировалась применением фолата в качестве механизма нацеливания лекарственного конъюгата на клеточную линию KB.

Пример 68. In vitro клеточно-основанный скрининг конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности.

Оценивали способность избирательного нацеливания и киллинга клеток, содержащих фолатные рецепторы, применяя нацеленные конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество, при помощи in vitro-основанного скрининга и анализа избирательности.

Каждый конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество, соответствующая ему ненацеленная молекула XTEN-лекарственное вещество и соответствующее свободное контрольное лекарственное вещество исследуют в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к фолатным рецепторам клеточных линий. Выбор клеточных линий основан на соответствии предложенным клиническим применениям и включает KB, IGROV, SK-OV-3, HeLa, LoVo, SW620, Madison 109, A549, A375, LS-174T, HT-29, 4T1, SK-BR-3. Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолиевой кислоты, клетки выращивают, а анализ проводят в среде, не содержащей фолиевой кислоты, но содержащей 5-10% инактивированной теплом фетальной телячьей сыворотки (ФТС) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Инактивированная теплом ФТС содержит эндогенный уровень фолиевой кислоты, достаточный для выживания и пролиферации экспрессирующих фолатные рецепторы клеток. Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и времена инкубации, устанавливаются, используя бесфолатную среду, содержащую 5-10% инактивированную теплом ФТС, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Затем конъюгаты фолат-XTEN-

лекарственное вещество исследуют следующим образом: клетки собирают в лог-фазе, пересчитывают и высевают с заданной клеточной плотностью в 96-луночные микротитровальные аналитические планшеты. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Конъюгаты фолат-ХТЕН-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносят в растворах в подходящих диапазонах дозирования, в двух параллельных исследованиях, а планшеты инкубируют на протяжении 2-5 дополнительных дней. В альтернативном варианте в клетки на протяжении 2-6 ч импульсно вносят конъюгаты фолат-ХТЕН-лекарственное вещество и соответствующие контроли, отмывают, добавляют свежую среду, и инкубируют на протяжении дополнительных 48-72 ч. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляют реагент CellTiter-Glo, смешивают на протяжении 2 мин на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугируют при 90g и инкубируют при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 мин, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывают при помощи люминометра и рассчитывают величины IC<sub>50</sub> (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC<sub>50</sub> даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям.

Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты фолат-ХТЕН-лекарственное вещество демонстрируют высокоселективную эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к фолатным рецепторам клеток, но не в отношении негативных к фолатным рецепторам клеток. В отличие от этого для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в высокой цитотоксичности к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец ХТЕН-лекарственное вещество будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты фолат-ХТЕН-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с фолатными рецепторами путем добавления в анализ свободной конкурентоспособной фолиевой кислоты, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов фолат-ХТЕН-лекарственное вещество.

Пример 69. *In vitro* клеточно-основанный скрининг конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности.

Оценивали способность избирательного нацеливания и киллинга клеток, содержащих рецепторы LHRH, применяя нацеленные конъюгаты LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество, при помощи *in vitro*-основанного скрининга и анализа избирательности. Каждый конъюгат LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество, соответствующая ему ненацеленная молекула ХТЕН-лекарственное вещество и соответствующее свободное контрольное лекарственное вещество исследуют в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к рецепторам LHRH клеточных линий. Выбор клеточных линий основан на соответствии предложенным клиническим применениям и включает MCF-7, MDA-MB-231, HCC1806, HCC1937, OV-1063, EFO-21, EFO-27, NIH:OVCAR-3, BG-1, HEC-1A, HEC-1B, Ishikawa, KLE, AN-3-CA, MiaPaCa, Panc-1, rat Dunning R-3327-H, PC-82, MDA-PCa-2b, C4-2 (производное LNCaP), A549, A2780, UCI-107, SK-OV-3, SW 626, MFE-296. Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и времена инкубации, устанавливаются, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Конъюгаты LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество исследуют следующим образом: клетки собирают в лог-фазе, пересчитывают и высевают с заданной клеточной плотностью в каждую лунку в 96-луночный микротитровальный аналитический планшет. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Конъюгаты LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносят в растворах в подходящих диапазонах дозирования, в двух параллельных исследованиях, а планшет инкубируют на протяжении 2-5 дополнительных дней в зависимости от используемых клеточных линий. После истечения соответствующего времени инкубации в каждую лунку добавляют реагент CellTiter-Glo, смешивают на протяжении 2 мин на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугируют при 90xg и инкубируют при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 мин, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывают при помощи люминометра и рассчитывают величины IC<sub>50</sub> (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC<sub>50</sub> даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям.

Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество демонстрируют высокоселективную и эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к рецепторам LHRH клеток, но не в отношении негативных к рецепторам LHRH клеток. В отличие от этого для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в высокой цитотоксичности к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец ХТЕН-лекарственное вещество без нацеленного на LHRH компонента будет обладать низкой цитотоксической

активностью. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с рецепторами LHRH путем добавления в анализ свободного конкурентоспособного пептида LHRH, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

Пример 69. *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество.

При определении стабильности соединения с лекарственным веществом конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и грызуна при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Количество свободного лекарственного вещества оценивают при помощи RP-HPLC и/или LC-MS/MS, а количество интактного конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество определяют при помощи ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или LHRH/лекарственное вещество. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной tandemной масс-спектрологии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированную версию детекторного антитела) либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированную версию детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы,  $t_{1/2}$  для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейно-регрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

Пример 70. *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

При определении стабильности соединения с лекарственным веществом конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и грызуна при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Наличие свободного лекарственного вещества оценивают при помощи HPLC, LC-MS/MS и/или антипролиферативного анализа, описанного в соответствующем разделе выше. Количество интактного конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество определяют, используя ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или фолат/лекарственное вещество. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Рас-

творимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектрологии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. При применении антипролиферативного анализа в качестве метода детектирования наличия деконъюгированного лекарственного вещества, можно использовать позитивные или негативные к фолатным рецепторам клетки. Ингибитор фолиевой кислоты добавляют при проведении оценки позитивных к рецепторам клеточных линий, а для негативных к рецепторам клеточных линий он не нужен. Для любых типов рецепторных клеток увеличение концентрации де-конъюгированного лекарственного вещества приводит к увеличению клеточной токсичности. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированной версии детекторного антитела), либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небитинилированной версии детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы.  $t_{1/2}$  для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

Пример 71. *In vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгата LHRH-XTEN-Cy5.5.

Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 LHRH-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей эффективности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к рецепторам LHRH опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Вкратце, самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к рецепторам LHRH опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой LHRH-XTEN-Cy5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Cy5.5 контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 ч после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Cy5.5 выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения, по меньшей мере, нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области Cy5.5. Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, а красный определяет самую высокую интенсивность.

Пример 72. *In vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгатов фолат-XTEN-Cy5.5.

Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 фолат-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей эффективности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к фолатным рецепторам опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолата, позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, нормальная пища грызунов содержит высокую концентрацию фолиевой кислоты; бестимусных мышей в данном исследовании держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации

опухоли и на протяжении визуализационного анализа для того, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке крови. Самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой фолат-ХТЕН-Су5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Су5.5 контрольного ХТЕН. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 ч после инъекции.

После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Су5.5 выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения, по меньшей мере, нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображениях для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области Су5.5. Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, красный определяет самую высокую интенсивность.

Пример 73. Анализ фармакокинетики конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество.

In vivo фармакокинетику конструкций LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов. Фармакокинетику оценивают для разных видов, при этом предпочтительными являются мыши, крысы, яванские макаки и собаки, так как именно их обычно используют для прогнозирования фармакокинетики человека. Составы конструкций LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество готовят в водных буферах, совместимых с in vivo введением (например: фосфатно-солевой буфер, Трис-солевой буфер или Гэпэс-солевой буфер). Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 ч и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS. Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество, например комбинации ХТЕН/LHRH, ХТЕН/лекарственное вещество, LHRH/лекарственное вещество и/или ХТЕН/ХТЕН. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество, покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки собранные в различные временные точки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу) либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небитинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной tandemной масс-спектропии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление ХТЕН к LHRH и лекарственному веществу, соответствующее приговлению конъюгата, сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства по сравнению с нацеленными пептидами и лекарственными веществами, не связанными с ХТЕН. Это, в свою очередь, приведет к менее частым и более удобным схемам дозирования для таких конъюгатов.

Пример 74. Анализ фармакокинетики конъюгатов фолат-ХТЕН-лекарственное вещество.

*In vivo* фармакокинетику конструкций фолат-ХТЕН-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов. Фармакокинетику оценивают для разных видов, при этом предпочтительными являются мыши, крысы, яванские макаки и собаки, так как именно их обычно используют для прогнозирования фармакокинетики человека. Так как в нормальном питании содержатся высокие концентрации фолиевой кислоты (приблиз. 6 мг/кг мышиноного корма), животных, принимающих участие в фармакокинетических исследованиях фолатных конъюгатов, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Составы конструкций фолат-ХТЕН-лекарственное вещество обычно готовят в водных буферах, совместимых с *in vivo* введением (например, фосфатно-солевой буфер, Трис-солевой буфер или Гэпэс-солевой буфер). Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно нутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 часов и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов фолат-ХТЕН-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS. Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата фолат-ХТЕН-лекарственное вещество, например комбинации ХТЕН/фолат, ХТЕН/лекарственное вещество, фолат/лекарственное вещество и/или ХТЕН/ХТЕН. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата фолат-ХТЕН-лекарственное вещество, покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки собранные в различные временные точки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата фолат-ХТЕН-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу), либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небитинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-ХТЕН-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавля известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектропии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавля известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление ХТЕН к фолату и лекарственному веществу, соответствующее приготовлению конъюгата, сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства по сравнению с нацеленными пептидами и лекарственными веществами, не связанными с ХТЕН. Это, в свою очередь, приведет к менее частым и более удобным схемам дозирования для таких конъюгатов.

Пример 75. *In vivo* анализ эффективности и токсичности конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество.

Конъюгат LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество предназначен для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к рецепторам LHRH опухолевым клеткам. Поэтому *in vivo* фармакологическую активность конструкций LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие рецепторы LHRH, трансплантированные бестимусным мышам. Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозирования для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Вкратце, эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирования определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на LHRH

веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (см. раздел выше). Стандартные параметры МПД такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съезживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение отслеживают ежедневно. Наибольшая доза соединения LHRH-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД. Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом LHRH-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД; другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В примере 69 описаны примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Таким образом, подходящее количество позитивных к рецепторам LHRH клеток из соответствующей человеческой опухолевой линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как  $0,5 \times L \times W^2$ , где L = значение для большей оси в мм, а W = значение для оси, перпендикулярной L, в мм. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, свободное контрольное лекарственное вещество и конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и проводят клинические исследования патологии и гистопатологии основных органов. Применение нацеленных цитотоксинов является одной из наиболее перспективных стратегий избирательного уничтожения опухолевых клеток. Предполагается, что результаты подтвердят то, что конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество будет иметь хороший терапевтический индекс, что демонстрирует высокая эффективность, и низкую общую токсичность. В противоположность этому, ожидается, что ненацеленное на LHRH свободное лекарственное вещество при одинаковых дозах будет не только менее эффективно, но и намного более токсично. Ожидается, что контрольный растворитель приведет к неконтролируемому росту опухоли и будет высокотоксичным.

Пример 76. *In vivo* анализ эффективности и токсичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество предназначены для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к фолатным рецепторам опухолевым клеткам. *In vivo* фармакологическую активность конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие фолатные рецепторы, трансплантированные бестимусным мышам. Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений фолат-XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Так как в нормальном корме для грызунов содержится высокая концентрация фолиевой кислоты (6 мг/кг корма), мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирования определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на фолат веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (см. раздел выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съезживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение тщательно отслеживают ежедневно. Наибольшая доза соединения фолат-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД. Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом фолат-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД, другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В примере 69 описаны примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Для снижения содержания фолата позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке, мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении исследования. Таким образом, подходящее количество позитивных к фолатным рецепторам клеток из соответствующей линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчиты-



вают как  $0,5 \times L \times W^2$ , где  $L$  = значение для большей оси в мм, а  $W$  = значение для оси, перпендикулярной  $L$ , в мм. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, контрольное лекарственное вещество и конъюгат фолат-ХТЕН-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и проводят клинические исследования патологии и гистопатологии основных органов. Применение нацеленных цитотоксинов является одной из наиболее перспективных стратегий избирательного уничтожения опухолевых клеток. Предполагается, нацеленный химиотерапевтический конъюгат фолат-ХТЕН-лекарственное вещество будет более эффективным и менее токсичным, чем одно свободное цитотоксичное лекарственное вещество, для позитивных к фолатным рецепторам опухолей.

Пример 76. Клинические применения конъюгатов LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество.

Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. Brentuxимаб ведотин (Адцентрис), одобренный для применения при лимфоме Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфоме, является ведущим примером эффективной токсин-нацеленной терапии. LHRH представляет собой пептид, который функционирует в репродуктивных органах. Так как его рецепторы сконцентрированы преимущественно на определенных опухолях и не экспрессируются в большинстве нормальных тканей, рецептор LHRH является идеальной мишенью для избирательного разрушения злокачественных опухолей. Действительно, ~52% образцов рака молочной железы, ~80% образцов рака яичников и эндометрия и ~85% образцов рака простаты являются мишенями вследствие наличия рецепторов LHRH. Следует отметить, что LHRH-зависимая терапия была бы в особенности целесообразной для тройных негативных опухолей молочной железы, которые не характеризуются сверхэкспрессией рецепторов эстрогена или прогестерона или HER2 и, следовательно, не подходят для лечения многими доступными нацеленными лекарственными веществами. У пациентов с поздними стадиями рака эндометрия, яичников или простаты часто наблюдается исключительно неблагоприятный исход, так как данные опухоли могут иметь тенденцию к повторному появлению и/или быть устойчивыми к современным способам лечения. В подтверждение этого клинические исследования с AEZS-108, нацеленным доксорубициновым аналогом LHRH, показали, что каждый из указанных типов рака восприимчив в LHRH-основанной терапии. Слияние ХТЕН, несущего  $\geq 1$  копии LHRH, с ХТЕН, несущим  $\geq 3$  молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенный терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях ниже МПД, уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

Клиническую оценку композиции LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от распространенных раков молочной железы, эндометрия, яичников и простаты или мочевого пузыря. Клинические исследования разработаны так, чтобы подтвердить эффективность и преимущества конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество для человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в Фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетики, чтобы определить максимальную переносимую дозу (МПД) и охарактеризовать ограничивающую дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах с метастатическими или неоперабельными раками и пациентах, для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся. Для увеличения эффективности лечения критерием отбора является позитивный статус в отношении рецепторов LHRH; определяемый при помощи иммуногистохимии образцов первичных опухолей или метастазов и/или при помощи LHRH-нацеленного молекулярного визуализирующего вещества. Схемой исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров. Это позволит определить МПД, а также пороговую и максимальную концентрации для дозирования и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в фазе II и фазе III. Также это определит потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях. Клинические исследования на людях в фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (стадия 3 или 4) или повторным раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря. В данном исследовании оценивают эффективность и безопасность конъюгата LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно вводят клинический кандидатный конъюгат LHRH-ХТЕН-лекарственное вещество в дозировке и согласно лечебной схеме, предопределенными в фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают

контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость.

Исследования эффективности и безопасности в фазе III построены таким образом, чтобы повторить или модифицировать исследования фазы II для пациентов с позитивным к рецепторам LHRN распространенным (устойчивым, повторным) раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря в зависимости от клинических наблюдений во время фазы II. Дополнительно могут быть внесены изменения, состоящие в оптимизации критериев отбора для пациентов, дополнительной стратификации пациентов (например, в зависимости от уровня экспрессии рецепторов LHRN), изменении дозировки, схемы лечения, статуса стандартных химиотерапевтических веществ и т.д. Первичной конечной точкой является отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST, среди пациентов, позитивных к рецепторам LHRN. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Также учитывают случаи побочных эффектов, серьезных побочных эффектов и смертей.

Предполагается, что кандидатный конъюгат LHRN-XTEN-лекарственное вещество продемонстрирует противораковую активность без кардиотоксичности даже в случае групп пациентов, прошедших предварительное интенсивное лечение.

Пример 76. Клинические применения конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. Брентуксимаб ведотин (Адцентрис), одобренный для применения при лимфоме Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфоме, является ведущим примером эффективной токсин-нацеленной терапии. Фолат, также известный как фолиевая кислота, витамин B<sub>9</sub>, является жизненно важным питательным веществом, необходимым для всех живых клеток для нуклеотидного биосинтеза, и функционирует как кофактор в некоторых биологических процессах. Особенно важным он является в содействии быстрому клеточному делению и росту. Таким образом, фолатный рецептор является точкой фокусировки для разработки терапии для лечения быстро развивающихся злокачественных опухолей; в частности, рака яичников и немелкоклеточной карциномы легких. Для некоторых опухолей яичников существует большая вероятность повторения после первичного успешного хирургического вмешательства или химиотерапии препаратами платины, при этом повторная опухоль может быть устойчивой к доступным видам терапии. Хотя экспрессия фолатных рецепторов в нормальных яичниках является весьма незначительной, при ~90% эпителиальных раков яичников наблюдается сверхэкспрессия фолатных рецепторов, то же самое наблюдается для многих аденокарцином легких, тем самым открывая возможность для нацеленной терапии. В подтверждение этого, клинические исследования ЕС-145, нацеленного алкалоида барвинка, являющегося аналогом фолата, показали, что устойчивый к препаратам платины рак яичников и немелкоклеточная карцинома легких восприимчивы к фолат-основанной терапии. Слияние XTEN, несущего  $\geq 1$  копии фолата, с XTEN, несущим  $\geq 3$  молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенные терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях значительно ниже максимальной переносимой дозы (МПД), уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

Клиническую оценку композиции фолат-XTEN-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей, или для пациентов, страдающих от рака яичников, устойчивого к лечению препаратами платины, или немелкоклеточной карциномы легких, которым не помогло применение другой химиотерапии. Клинические исследования, разработаны так, чтобы можно было подтвердить эффективность и преимущества конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество для человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетики, чтобы определить МПД и охарактеризовать ограничивающую дозу токсичности, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах, которые имеют повторные или не поддающиеся лечению распространенные опухоли, и для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся. Для увеличения эффективности лечения критерием отбора является позитивный статус в отношении фолатных рецепторов, определяемый при помощи иммуногистохимии образцов первичных опухолей или метастазов и/или при помощи фолат-нацеленного молекулярного визуализирующего вещества. Схемой исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров. Это позволит определить МПД, а также установить пороговую и максимальную концентрации для дозирования и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в





	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSEATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTESASRSHHHHHHHH
AC792	KKQEQQEKKAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGSTSTAESPG PGSTSTAESPGGCTSESPSGTAPGTSSTAESPGGTSSTAESPGGTSSTEPESGASAP GTSSTCSPGEAPGTPSPGESSTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTAPETSPPGESCTAPG STASRSHHHHHHHH
AC793	KKQEQQEKKAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGCSAGSGTASSSPGSSPTSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPTSGATG PGSSTCSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGASPGTSSGPGTGPAGTACSS PGSSASRSHHHHHHHH
AC798	KKQEQQEKKAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEATSGSETPGTSESATPESGP GTESASKSHHHHHHHH
AC809	KNPEQAEQAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASRSHHHHHHHH
AC810	KNPEQAEQAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASRSHHHHHHHH
AC831	KKQEQQEKKAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGSTSTAESPG PGSTSTAESPGPGTSESPSGTAPGTSSTAESPGGTSSTAESPGGTSSTEPSEGSAP GTSSESPSGTAPGTPSPGESSTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTAPG STSESPSGTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTAPGTSSESPSGTAPG TSESPSGTAPGTSSTEPESASPGTSESPSGTAPGTSSTEPESASPGTSTSTAESPGGCT SSTAESPGGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTEPESASPGT PESGASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTAESPGGCTSTP ESGASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSESPSGTAPGTSSTEPESASPGTS PSGTAPGTSSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTEPESASPGTS SSTAPGTSSTAESPGGTSSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTAESPGGCTSTEPES SASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTEPESASPGTSTEPES TAPGTSSESPSGTAPGTSSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTAESPGGTSSTEPES APGTSSTAESPGGTSSTAESPGGTSSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAP PGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAPGTSSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESAS GTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTAP GTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASPGTSTEPESASRSHHH HHHHH
AC832	KKQEQQEKKAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGSPAGSPTST PGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPTSGATGSPGSSPASTGTG PGASPGTSSGPGTGPAGTASSSPGSSPTSGATGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSGTS PGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSPTSGATGSPGTPGSGTASSPGASPGTSSGTS PGSSTPSGATGSPGSSPASTGTGPGSSPASTGTGPGSSPTSGATGSPGSSPTSGATG PGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPG PGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPG PGTGPAGTASSSPGSSPTSGATGSPGSSPTSGATGSPGSSPTSGATGSPGSSPASTGTG PGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGTS PGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASSSPGSSPTSGATGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPTSGATGSPGSSPTSGATGSPGSSPASTGTG PGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPTSGATGSPGSSPASTGTG PGSSPASTGTGPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPTSGATGSPGSSPASTGTG PGASPGTSSGSPGSSPASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPTSGATGSPGSSPTSGATG PGASSASRSHHHHHHHH
AC819	KKQEQQEKKAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGCSAGSPTSTE EGTSESACPEGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTCTPESEGSAPGTSTEPSCGSA PGTSESATPECPGSEPATSGSETPGSEATSGSETPGSPAGSCTSTEEGTSESATPESC PGTESASRSHHHHHHHH
AC820	KNPEQAEQAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGCGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTCTPESESATPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASRSHHHHHHHH
AC821	KNPEQAEQAEQREETRPRPRPRRPRRPRRPRRPRRPRRPRRSASRASGSPGCGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTCTPESESATPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASRSHHHHHHHH

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция для увеличения конечного периода полувыведения первого нагрузочного вещества, содержащая первое нагрузочное вещество и расширенный рекомбинантный полипептид (ХТЕН) с одним или более чем одним остатком цистеина, где указанный ХТЕН включает последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичности последовательности к последовательности, выбранной из группы, состоящей из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190 и Seg 191, отобразенной в табл. 3, и где ХТЕН содержит последовательность ТАЕААGCGТАЕАА.
2. Композиция по п.1, где ХТЕН конъюгирован с одной или более чем одной молекулой первого кросс-линкера, где первый кросс-линкер представляет собой кросс-линкер, отображенный в табл. 13, алкиновый компонент, отображенный в табл. 15, или азидный компонент, отображенный в табл. 15.
3. Композиция по п.2, где молекула первого кросс-линкера конъюгирована с ХТЕН по
  - a) α-аминогруппе N-концевого аминокислотного остатка ХТЕН; или
  - b) тиоловой группе остатка цистеина ХТЕН.
4. Композиция по п.2, где первый кросс-линкер выбран из группы, состоящей из N-малеинимида, йодацетилового агента, пиридилдисульфидного агента, 3-пропаргилоксипропановой кислоты, (окси-

этил)<sub>n</sub>-ацетилена, где n равно 1-10, дибензилциклооктина (ДБЦО), циклооктина (ЦОТ), 3-азидпропионовой кислоты, 6-азидгексановой кислоты и (оксиэтил)<sub>n</sub>-азида, где n равно 1-10.

5. Композиция по п.3, где молекула первого кросс-линкера конъюгирована с тиоловой группой остатка цистеина XTEN, и где XTEN конъюгирован с молекулой второго кросс-линкера по α-аминогруппе N-концевой аминокислоты XTEN, где второй кросс-линкер представляет собой кросс-линкер, отображенный в табл. 13, алкиновый компонент табл. 15 или азидный компонент табл. 15.

6. Композиция по п.2, где одна или более чем одна молекула первого кросс-линкера конъюгирована с каждым остатком цистеина XTEN.

7. Композиция по п.2, где первое нагрузочное вещество конъюгировано с молекулой первого кросс-линкера через один атом первого нагрузочного вещества, где указанный один атом выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы.

8. Композиция по п.7, где первое нагрузочное вещество выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ табл. 11, 12, 18 и 21.

9. Композиция по п.7, дополнительно содержащая второе нагрузочное вещество, конъюгированное с молекулой второго кросс-линкера, где второе нагрузочное вещество связано с N-концом XTEN через второй кросс-линкер, и где второй кросс-линкер представляет собой алкиновый компонент или азидный компонент, отображенный в табл. 15.

10. Композиция по п.9, где второе нагрузочное вещество выбрано из группы, состоящей из LHRH, D-Lys-(6)-LHRH, Asn-Gly-Arg (NGR) пептида, фолата, γ-фолата, α-фолата; птероата-gly, цикленгитида, RGD-4C, iRGD, ангиопеп-2, соматостатина, октреотида, пасиреотида, ланреотида, вапреотида, JF-07-69, F3 пептида, RGR, LyP-1, CGNKRTRGC (SEQ ID NO: 589), TAASGVRSMH (SEQ ID NO: 590), LTLRWVGLMS (SEQ ID NO: 591), вазоактивного интестинального пептида, холецистокинина, гастрин, гастрин-отделяемого пептида, нейротензина, α-меланоцит-стимулирующего гормона, окситоцина, LyP-2, CNRRTKAGC (SEQ ID NO: 592), LSD, CLSDGKRKC (SEQ ID NO: 593), REA, CREAGRKAC (SEQ ID NO: 594), AGR, CAGRRSAYC (SEQ ID NO: 595), RSR, CRSRKG (SEQ ID NO: 596), KAA, CKAANKK (SEQ ID NO: 597), CSRPRRSEC (SEQ ID NO: 598), KRK, CGKRK (SEQ ID NO: 599), CDTRL (SEQ ID NO: 600), CGTKRKC (SEQ ID NO: 601), TRAIL, DARPINS, центринов, Bt96, антитела к Ley-подобному антигену, трастузумаба, пертузумаба, антитела к HER2, цетуксимаба, антитела к EGFR, антитела к нектину-4, huC242, антитела к CanAg, антитела к CD138, MDX-1342, MOR-208, HuB4, антитела к CD19, эпратузумаба, бектумамаба, инотузумаба, моксетумамаба, RFB4, антитела к CD22, лумиликсимаба, антитела к CD23, даклизумаба, антитела к CD25, Xmab2513, cAC10, MDX-060, антитела к CD30, гемтузумаба, HuM195, huMy9-6, антитела к CD33, даратумумаба, антитела к CD38, SGN-40, HCD122, антитела к CD40, huN901, антитела к CD56, MDX-1411, антитела к CD70, милатузумаба, антитела к CD74, антитела к CD79b, галиксимаба, антитела к CD80, лапетузумаба, hCOL-1 антитела к CEA, антитела к Кристо, CE-355621, DN30, MetMAb, антитела к антагонисту cMET, адекватумумаба, эдреколомаба, катумаксомаба, антитела к EpCAM, 1C1, антитела к EphA2, глембатумумаба, антитела к GPNMB, антитела к интегрину, антитела к MUC-1, MDX-070, MLN591, антитела к PSMA, антитела к TGFα, антитела к TIM1, M9346A, фарлетузумаба, антитела к фолатному рецептору, антитела к рецептору IL-13 и бомбезина.

11. Композиция по п.2, где XTEN конъюгирован с молекулой первого кросс-линкера по тиоловой группе остатка цистеина XTEN.

12. Композиция по п.2, где XTEN конъюгирован с множеством молекул первого кросс-линкера, и где множество молекул первого кросс-линкера конъюгированы с каждым остатком цистеина XTEN.

13. Композиция по п.11 или 12, где первое нагрузочное вещество конъюгировано с молекулой первого кросс-линкера через один атом первого нагрузочного вещества, где указанный один атом выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы.

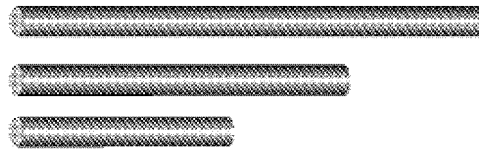
14. Композиция по п.13, где первое нагрузочное вещество выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отображенных в табл. 11, 12, 18 и 21.

15. Композиция по п.13, дополнительно содержащая второе нагрузочное вещество, конъюгированное с молекулой второго кросс-линкера, где второе нагрузочное вещество связано с N-концом XTEN через второй кросс-линкер, и где второй кросс-линкер представляет собой алкиновый компонент или азидный компонент, отображенный в табл. 15.

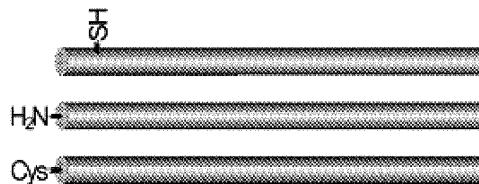
16. Композиция по п.15, где второе нагрузочное вещество выбрано из группы, состоящей из LHRH, D-Lys-(6)-LHRH, Asn-Gly-Arg (NGR) пептида, фолата, γ-фолата, α-фолата; птероата-gly, цикленгитида, RGD-4C, iRGD, ангиопеп-2, соматостатина, октреотида, пасиреотида, ланреотида, вапреотида, JF-07-69, F3 пептида, RGR, LyP-1, CGNKRTRGC (SEQ ID NO: 589), TAASGVRSMH (SEQ ID NO: 590), LTLRWVGLMS (SEQ ID NO: 591), вазоактивного интестинального пептида, холецистокинина, гастрин, гастрин-отделяемого пептида, нейротензина, α-меланоцит-стимулирующего гормона, окситоцина, LyP-2, CNRRTKAGC (SEQ ID NO: 592), LSD, CLSDGKRKC (SEQ ID NO: 593), REA, CREAGRKAC (SEQ ID NO: 594), AGR, CAGRRSAYC (SEQ ID NO: 595), RSR, CRSRKG (SEQ ID NO: 596), KAA, CKAANKK (SEQ ID NO: 597), CSRPRRSEC (SEQ ID NO: 598), KRK, CGKRK (SEQ ID NO: 599), CDTRL (SEQ ID NO: 600), CGTKRKC (SEQ ID NO: 601), TRAIL, DARPINS, центринов, Bt96, антитела к Ley-подобному

антигену, трастузумаба, пертузумаба, антитела к HER2, цетуксимаба, антитела к EGFR, антитела к нектину-4, huC242, антитела к CanAg, антитела к CD138, MDX-1342, MOR-208, HuB4, антитела к CD19, эпратузумаба, бектумамаба, инотузумаба, моксетумамаба, RFB4, антитела к CD22, лумиликсимаба, антитела к CD23, даклизумаба, антитела к CD25, Xmap2513, сAC10, MDX-060, антитела к CD30, гемтузумаба, HuM195, huMy9-6, антитела к CD33, даратумумаба, антитела к CD38, SGN-40, HCD122, антитела к CD40, huN901, антитела к CD56, MDX-1411, антитела к CD70, милатузумаба, антитела к CD74, антитела к CD79b, галиксимаба, антитела к CD80, лапетузумаба, hCOL-1 антитела к CEA, антитела к Кристо, CE-355621, DN30, MetMAb, антитела к антагонисту сMET, адекватумумаба, эдрекломаба, катумаксамаба, антитела к ЕрCAM, 1C1, антитела к ЕрhA2, глембатумумаба, антитела к GPNMB, антитела к интегрину, антитела к MUC-1, MDX-070, MLN591, антитела к PSMA, антитела к TGFa, антитела к TIM1, M9346A, фарлетузумаба, антитела к фолатному рецептору, антитела к рецептору IL-13 и бомбезина.

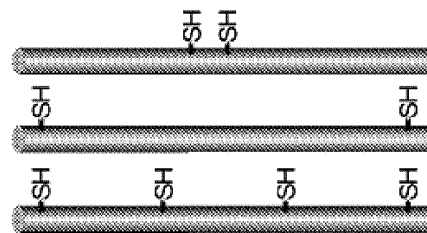
17. Композиция по любому из пп.1-16, которая содержит мультимерный XTEN с разветвленным видом конфигурации.



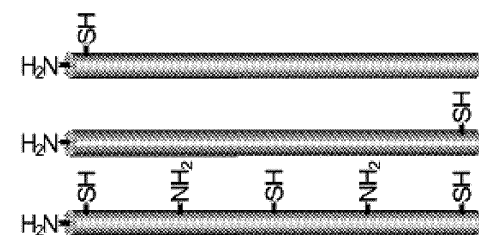
Фиг. 1А



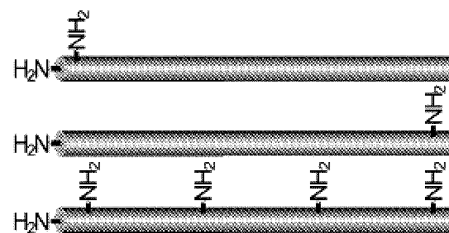
Фиг. 1В



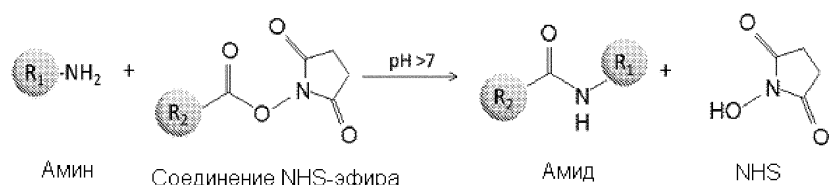
Фиг. 1С



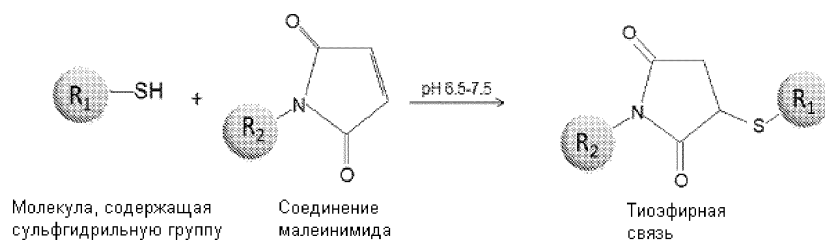
Фиг. 1D



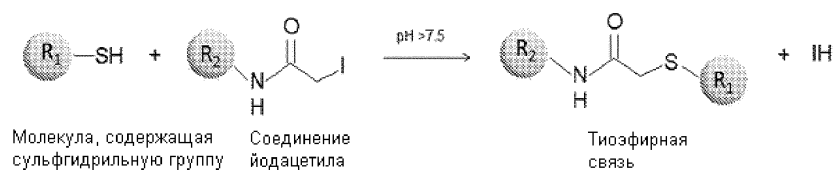
Фиг. 1Е



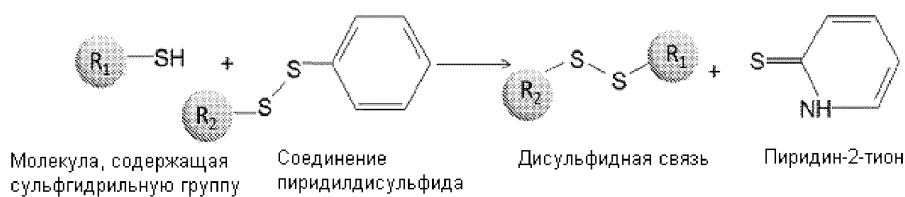
Фиг. 2



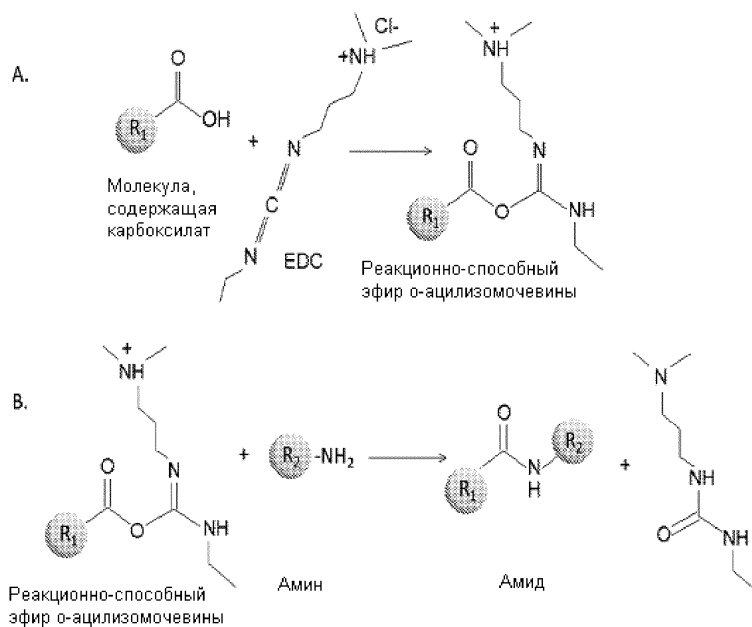
Фиг. 3



Фиг. 4

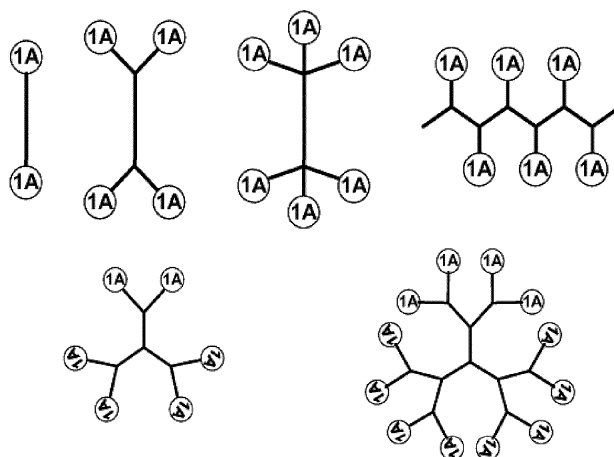


Фиг. 5

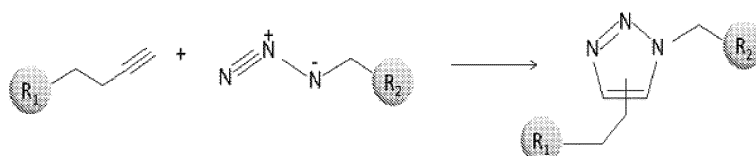


Фиг. 6

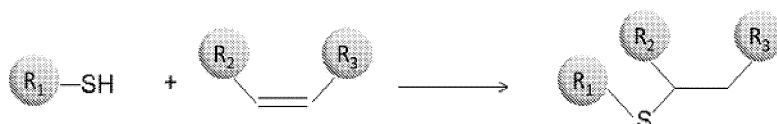




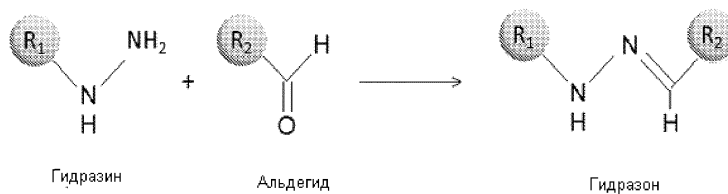
Фиг. 7



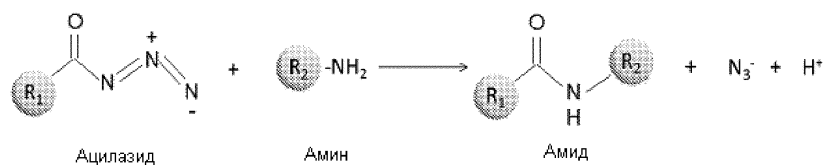
Фиг. 8



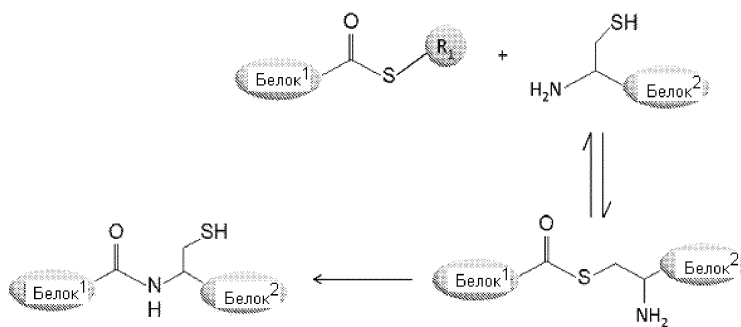
Фиг. 9



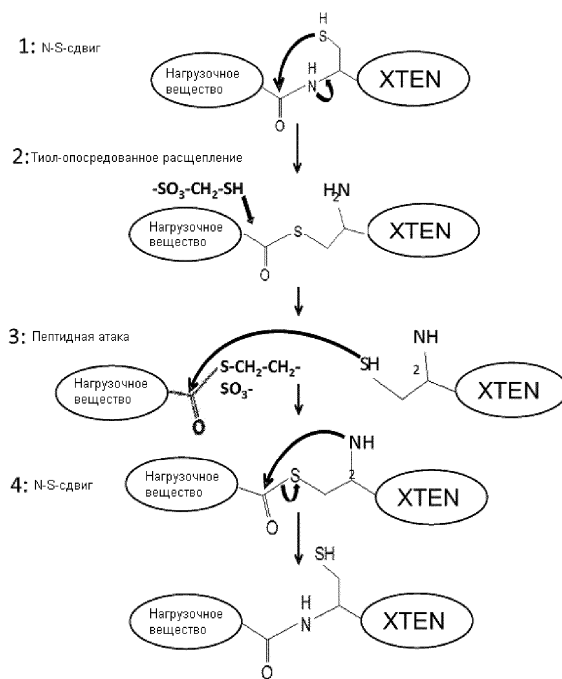
Фиг. 10



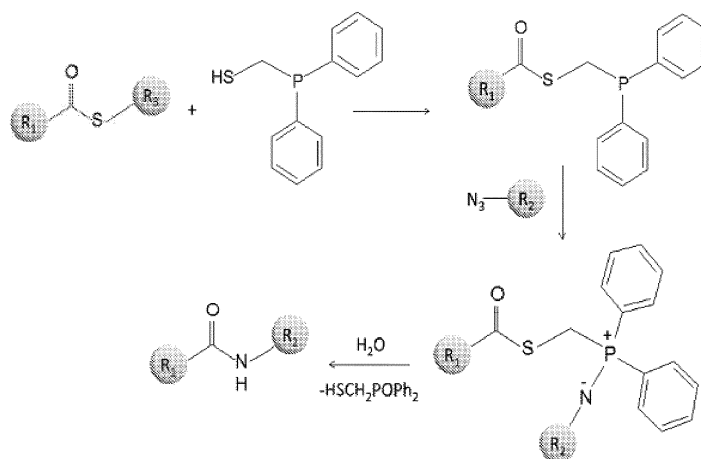
Фиг. 11



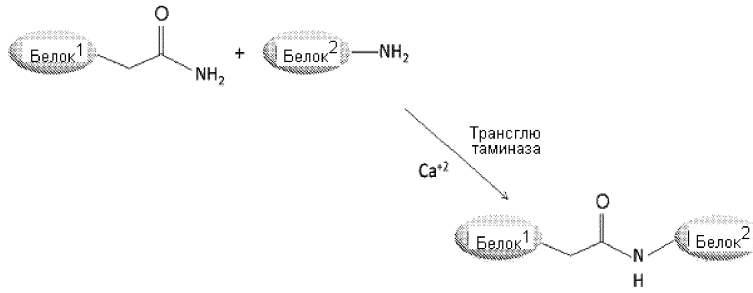
Фиг. 12



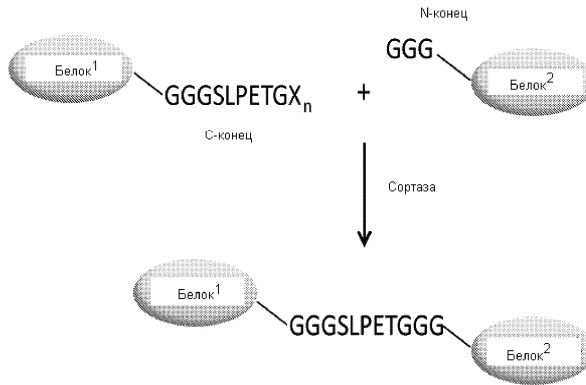
Фиг. 13



Фиг. 14

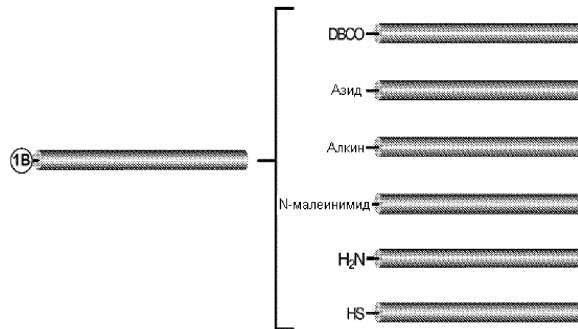


Фиг. 15

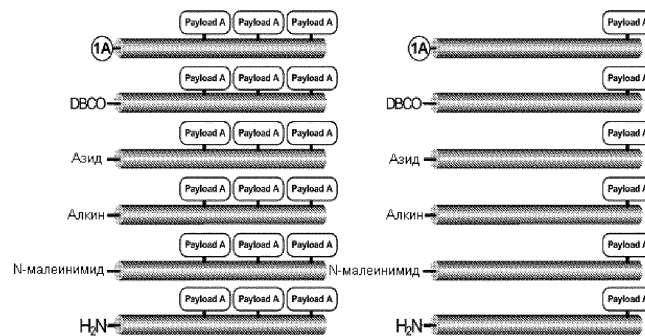


Фиг. 16

A

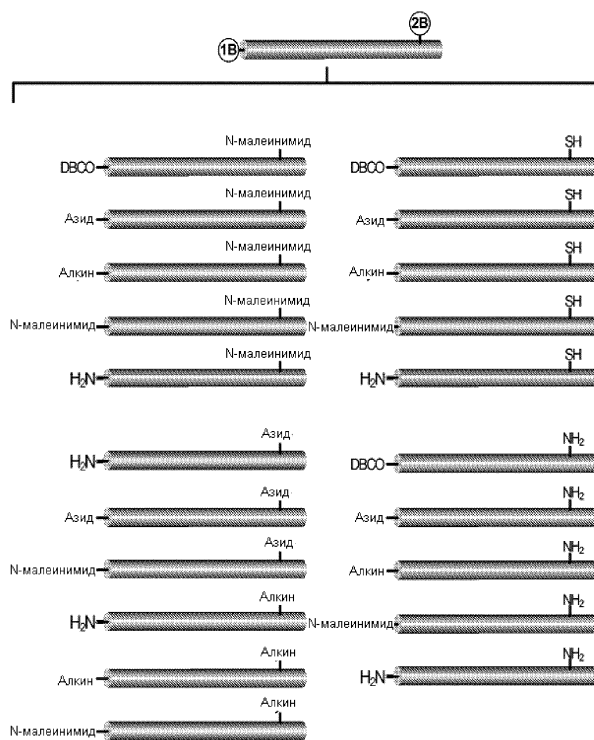


B

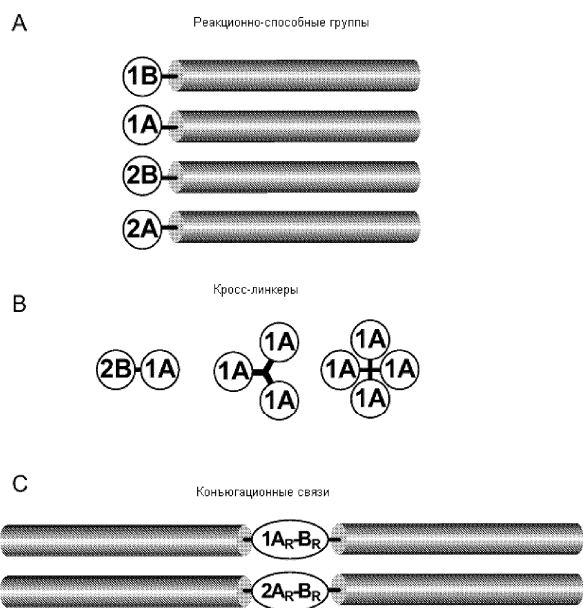


\*Payload A – Нагружающее вещество A

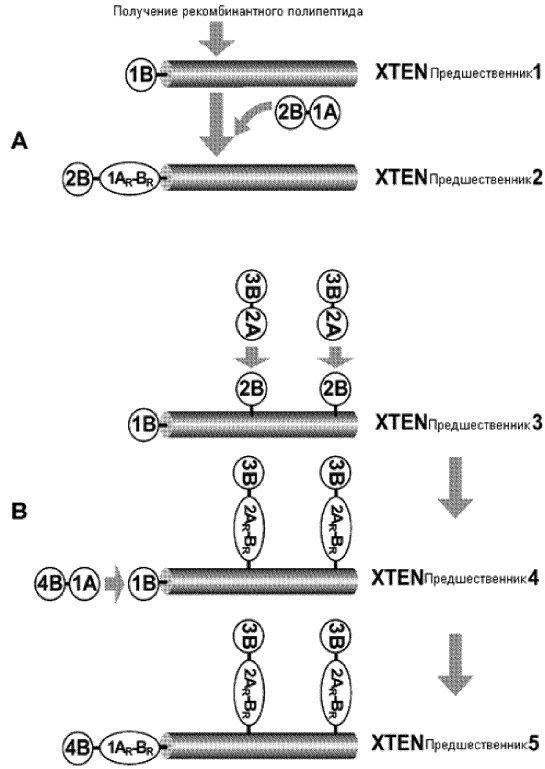
Фиг. 17



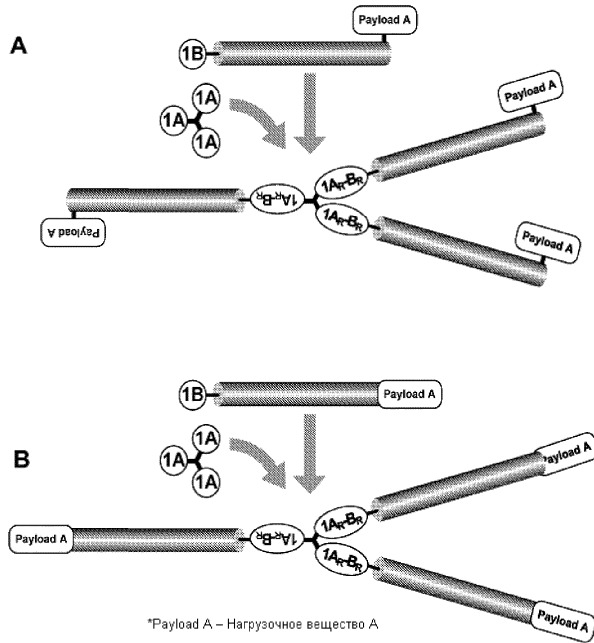
Фиг. 18



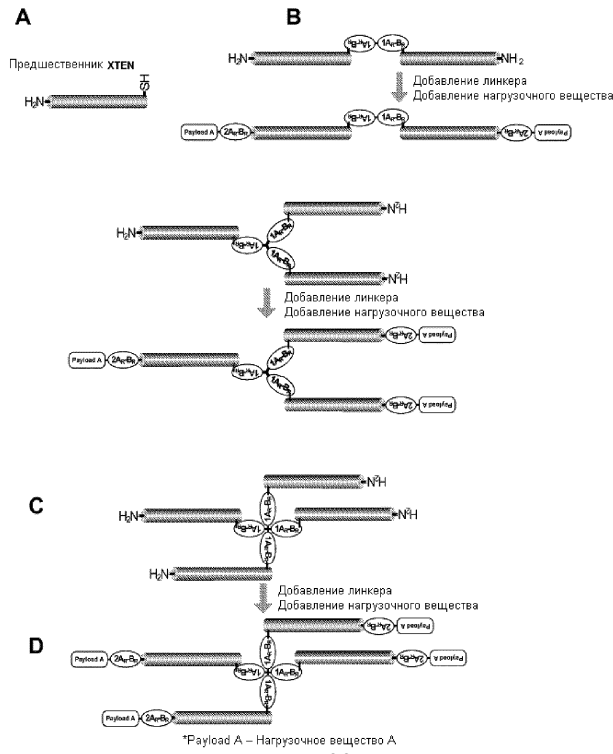
Фиг. 19



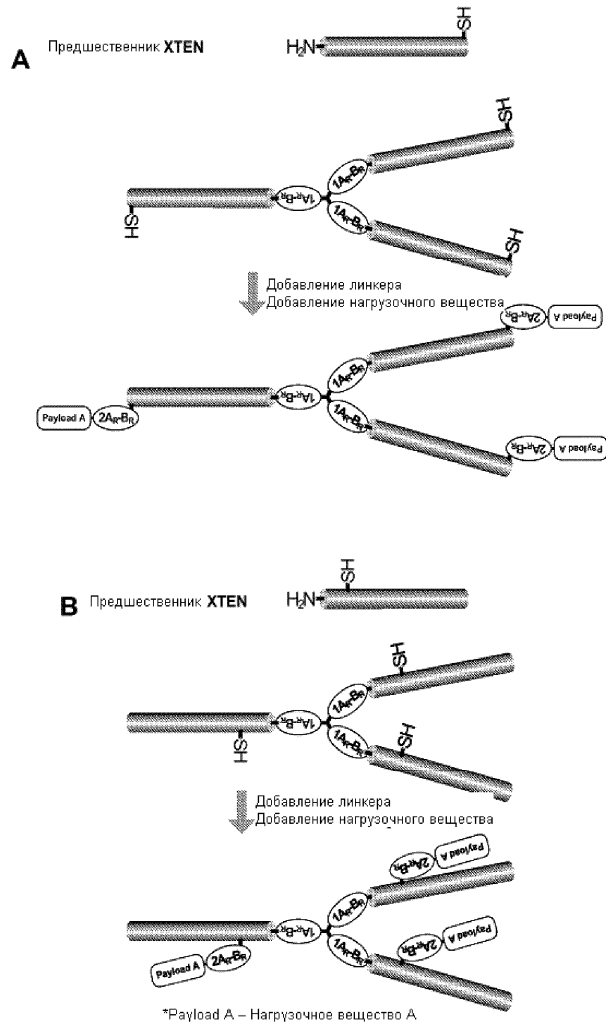
Фиг. 20



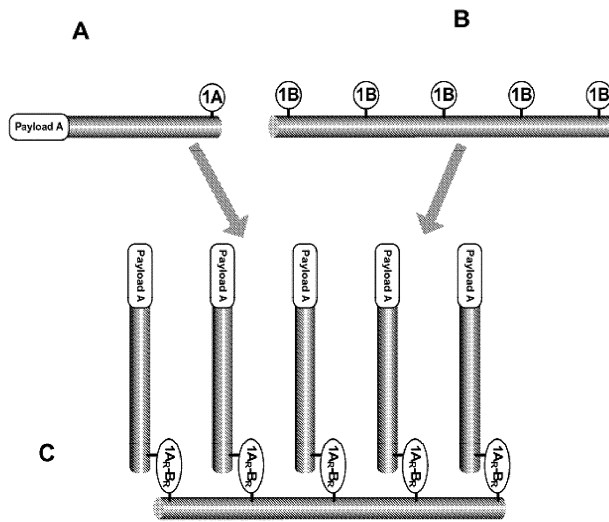
Фиг. 21



Фиг. 22

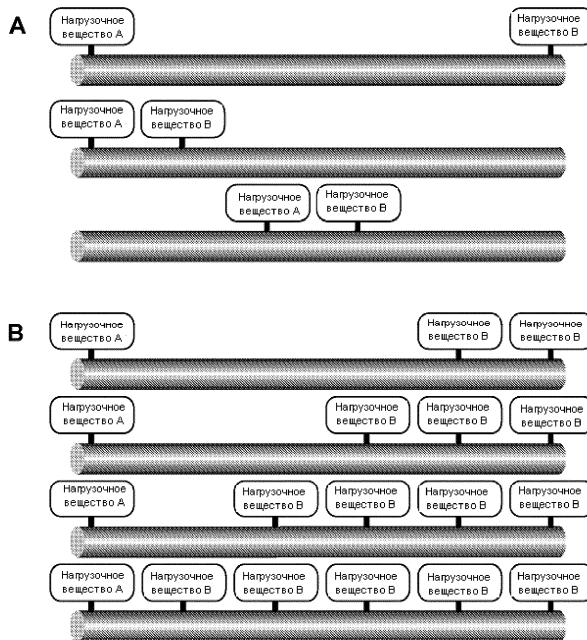


Фиг. 23

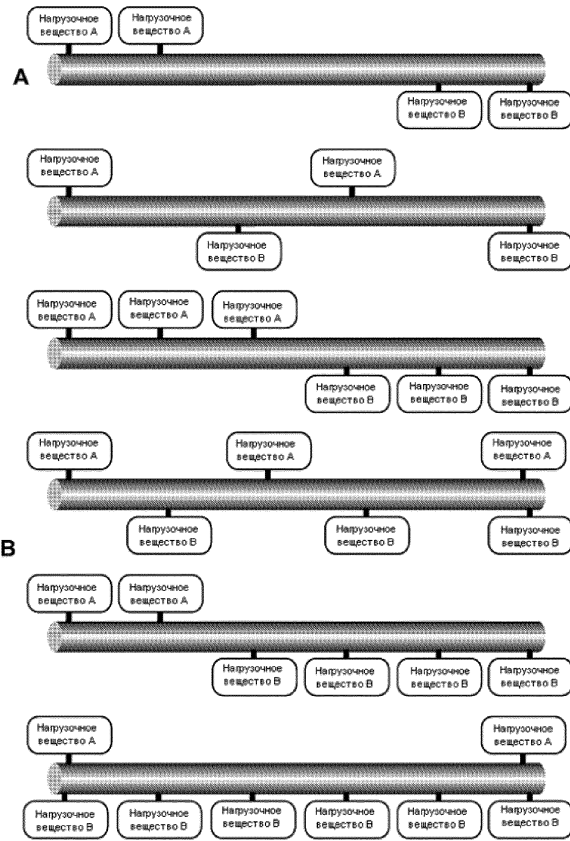


\*Payload A – Нагрузочное вещество А

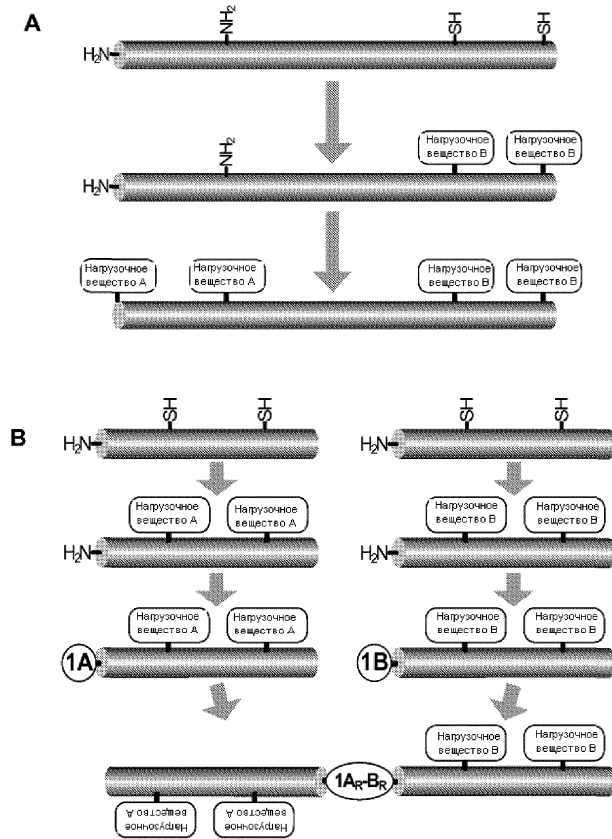
Фиг. 24



Фиг. 25

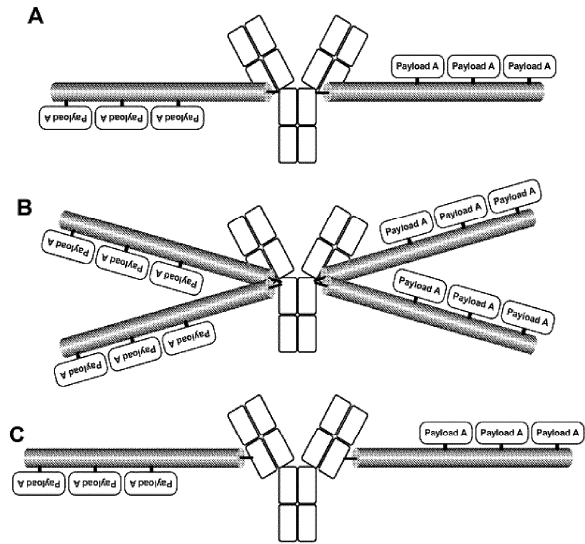


Фиг. 26



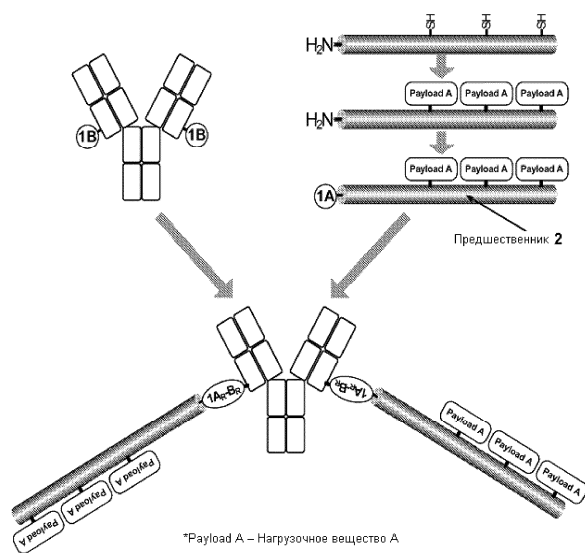
Фиг. 27





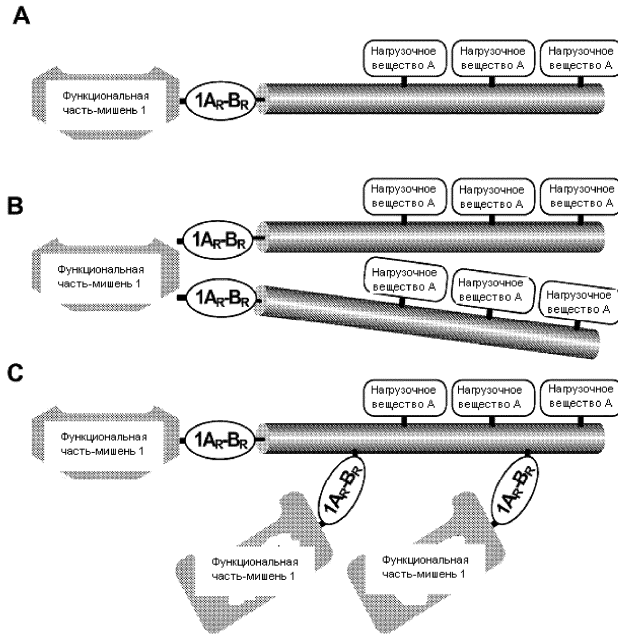
\*Payload A – Нагрузочное вещество А

Фиг. 28

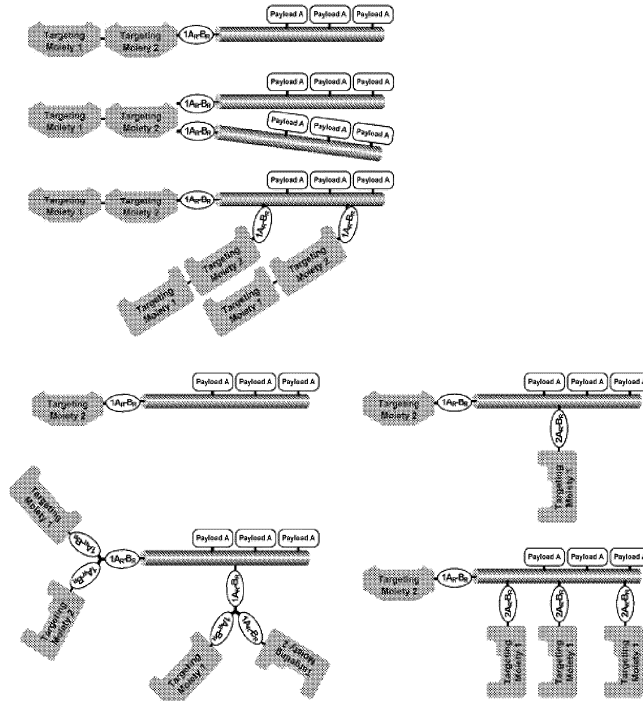


\*Payload A – Нагрузочное вещество А

Фиг. 29



Фиг. 30

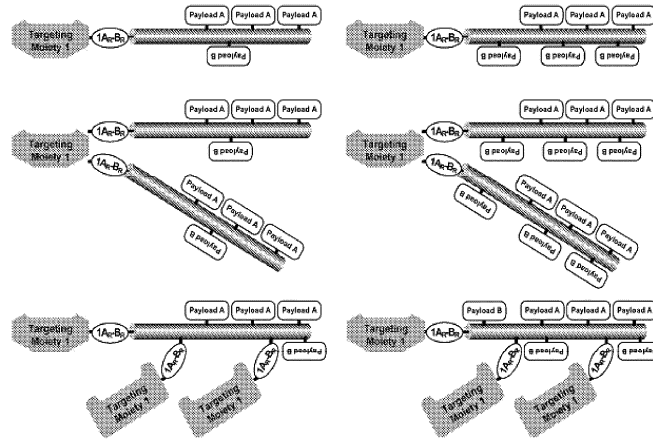


\*Targeting moiety 1 – Функциональная часть-мишень 1

\*\*Targeting moiety 2 – Функциональная часть-мишень 2

\*\*\*Payload A – Нагрузочное вещество

Фиг. 31

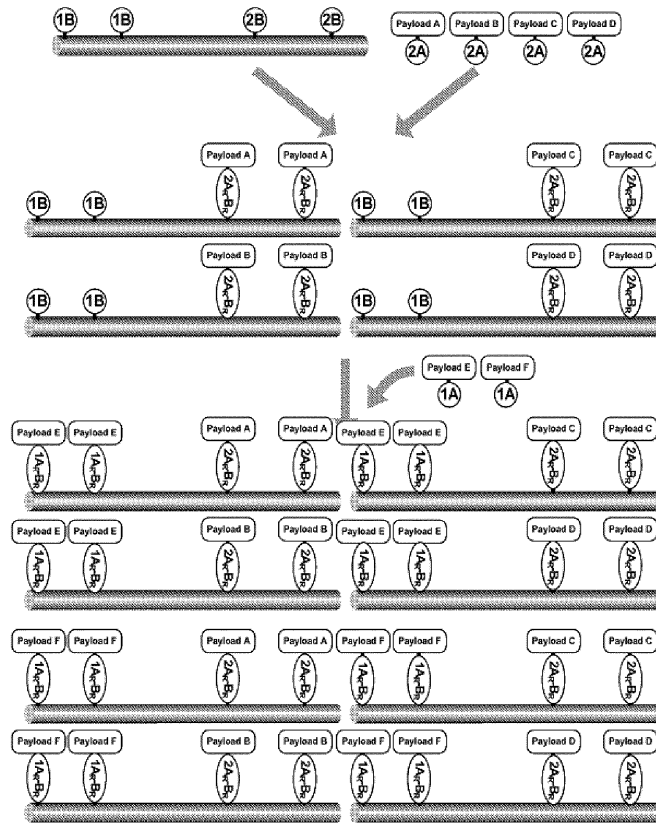


\*Targeting moiety 1 – Функциональная часть-мишень 1

\*\*Payload A – Нагрузочное вещество А

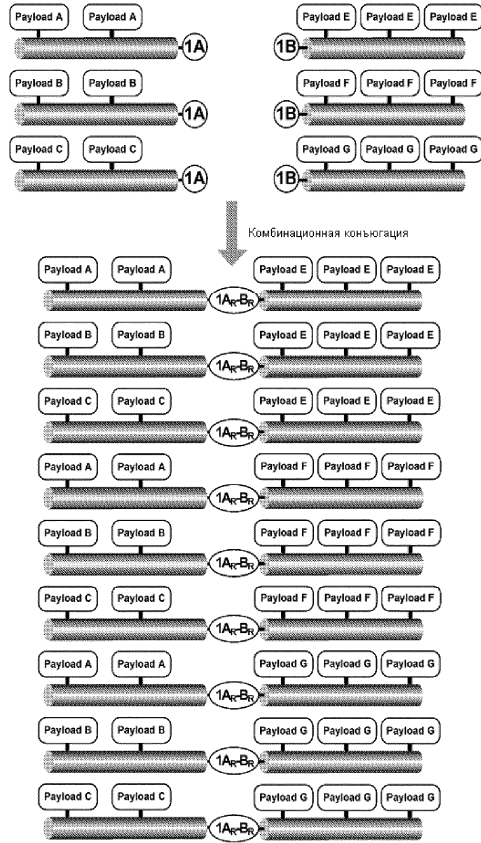
\*\*\*Payload B – Нагрузочное вещество В

Фиг. 32



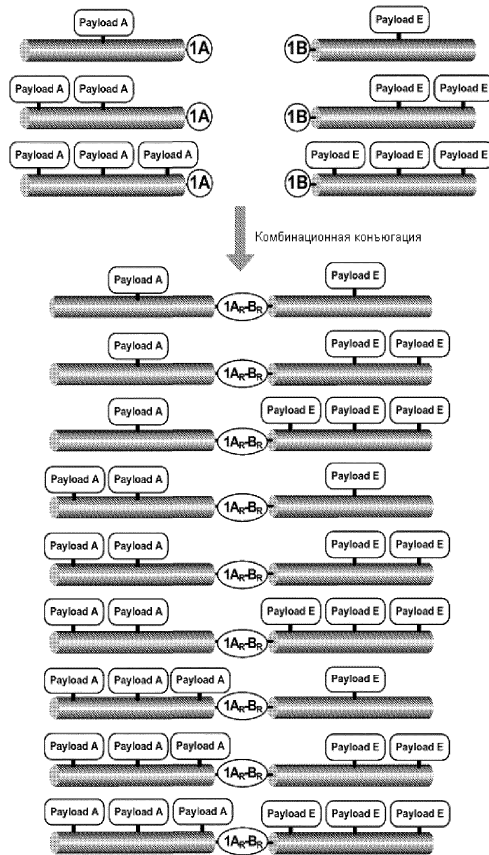
Payload A – Нагрузочное вещество А  
 Payload B – Нагрузочное вещество В  
 Payload C – Нагрузочное вещество С  
 Payload D – Нагрузочное вещество D  
 Payload E – Нагрузочное вещество E  
 Payload F – Нагрузочное вещество F

Фиг. 33



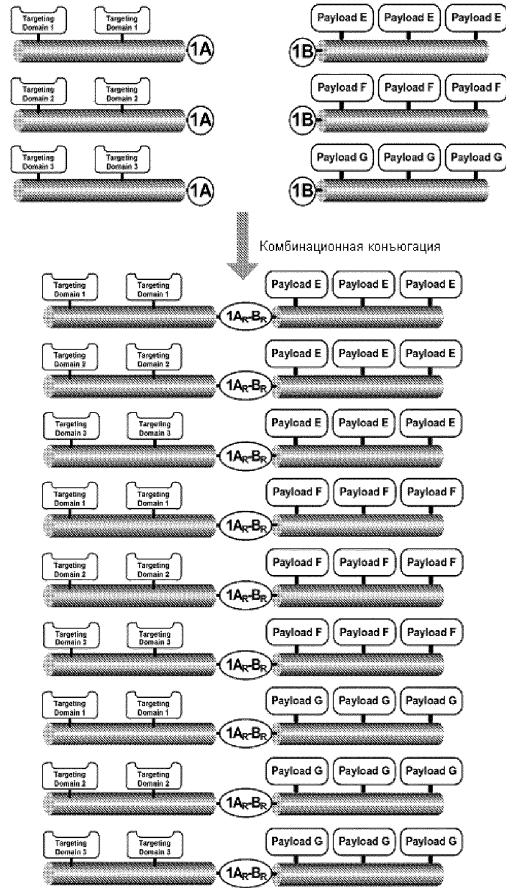
\*Payload A, B, C, D, E, F, G – Грузовое вещество A, B, C, D, E, F, G

Фиг. 34



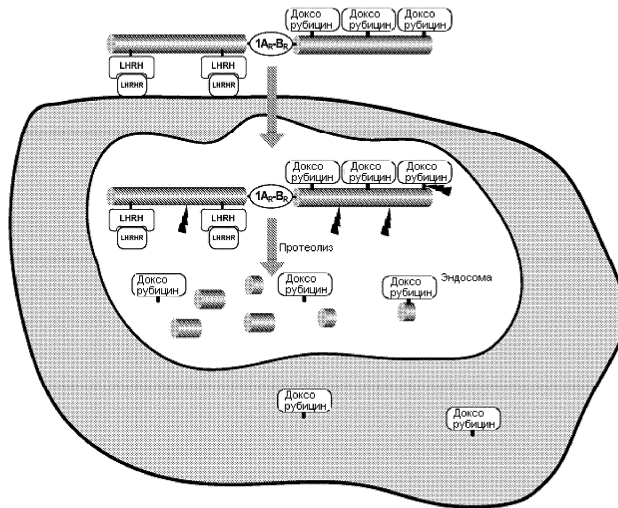
\*Payload A, E – Грузовое вещество A, E

Фиг. 35

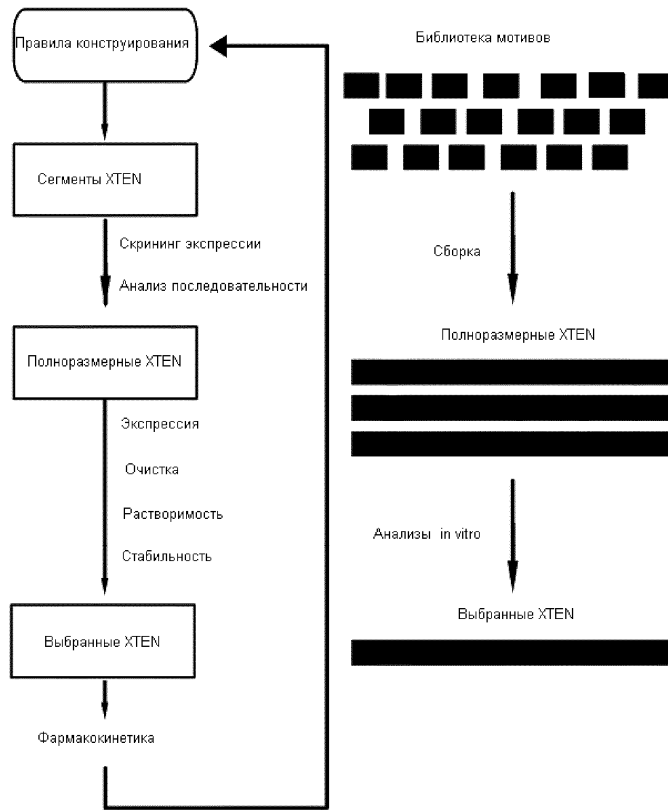


Targeting Domain 1, 2, 3 – Домен мишени 1, 2, 3  
 Payload E, F, G – Нагрузочное вещество E, F, G

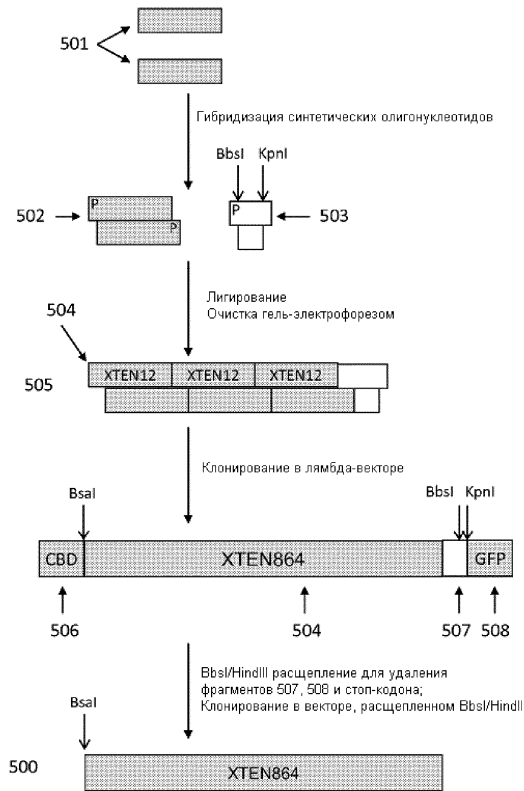
Фиг. 36



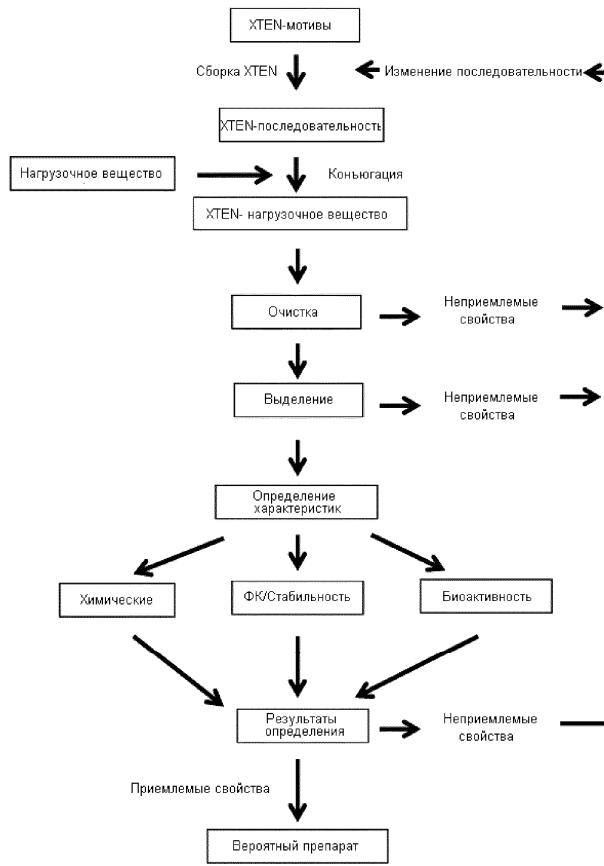
Фиг. 37



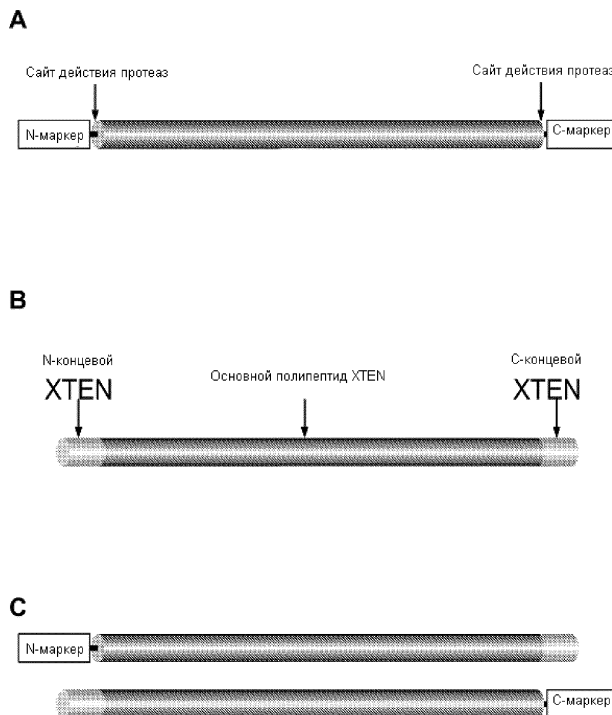
Фиг. 38



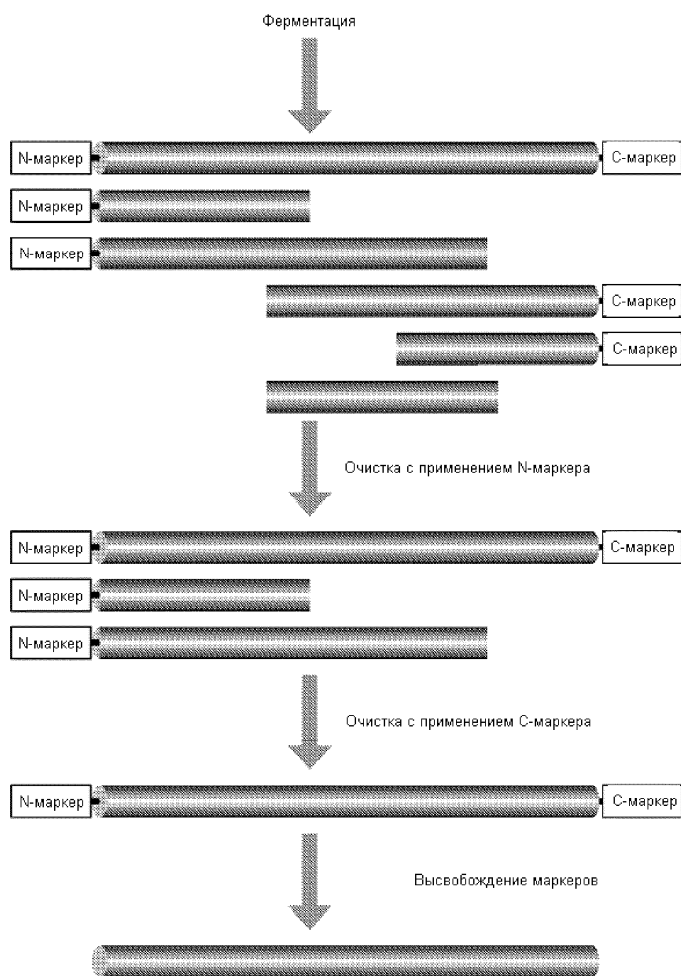
Фиг. 39



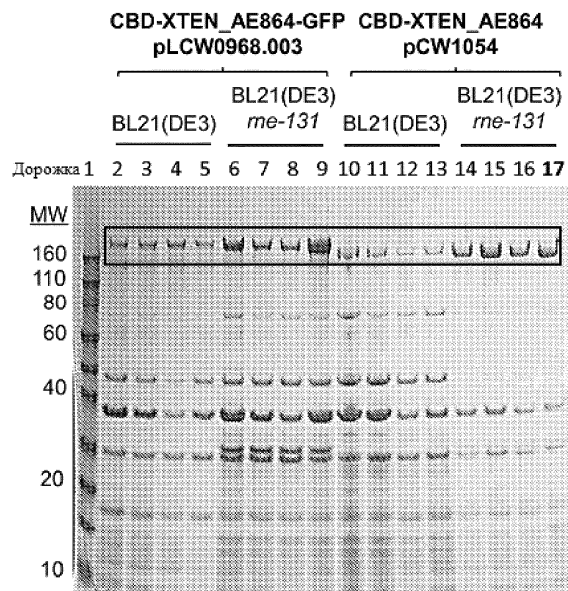
Фиг. 40



Фиг. 41

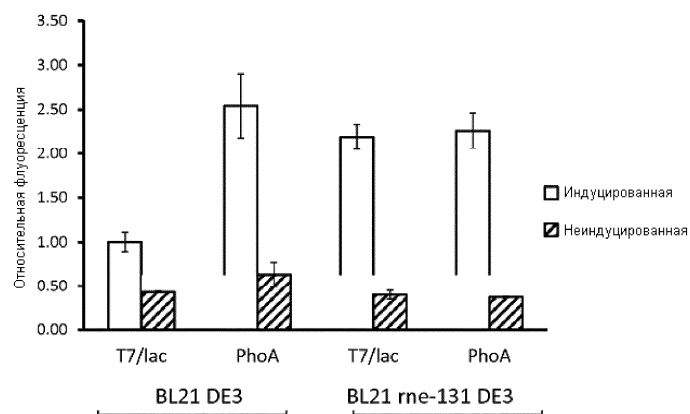


Фиг. 42

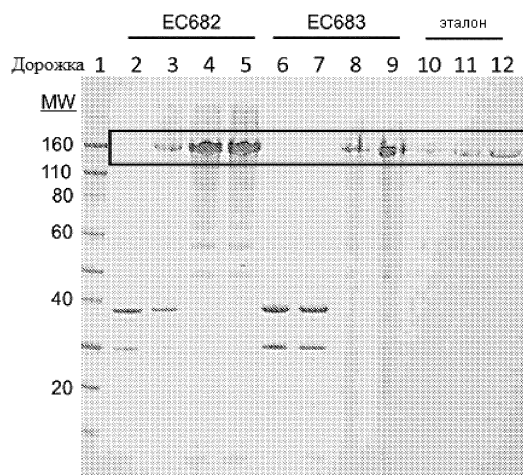


Фиг. 43

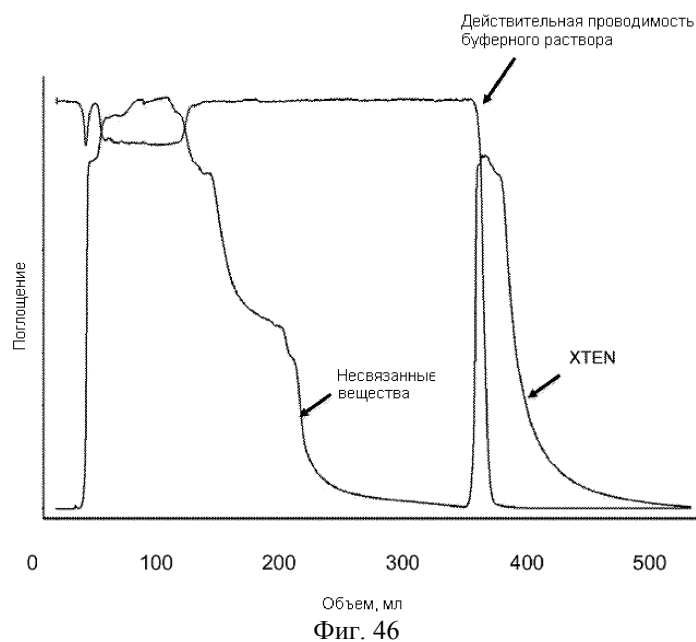




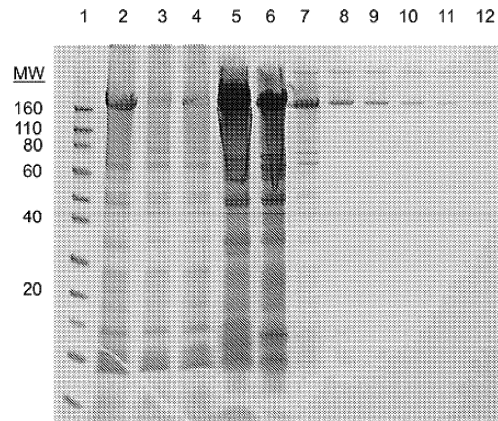
Фиг. 44



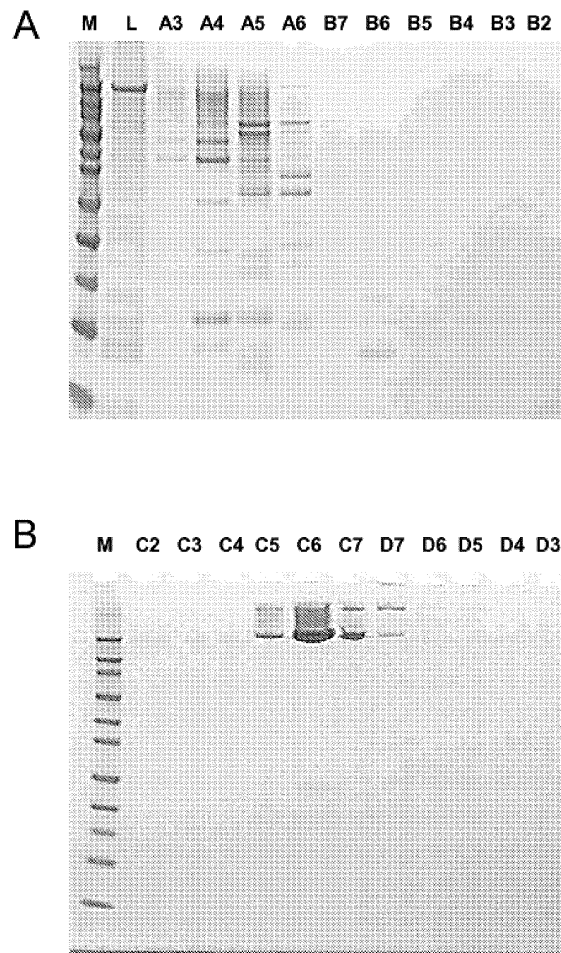
Фиг. 45



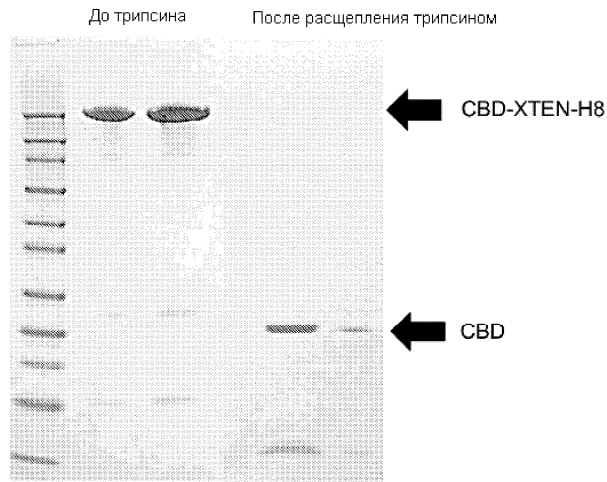
Фиг. 46



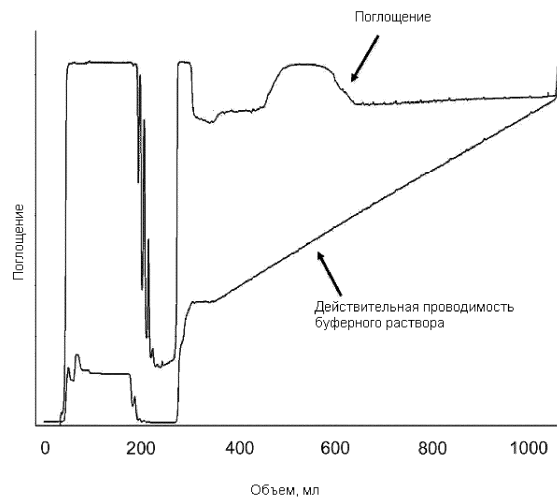
Фиг. 47



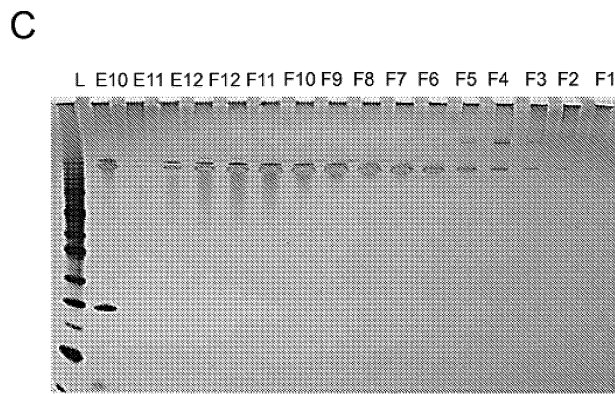
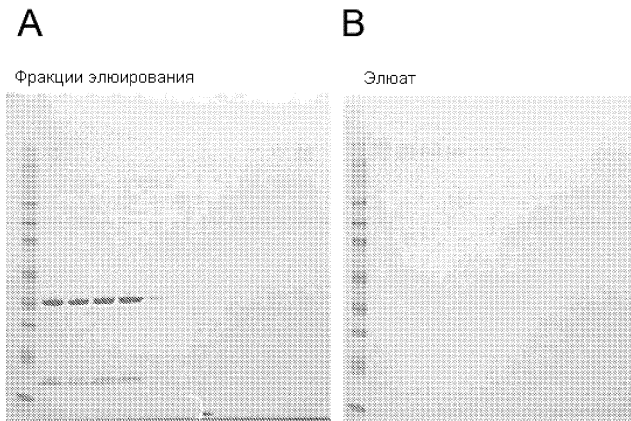
Фиг. 48



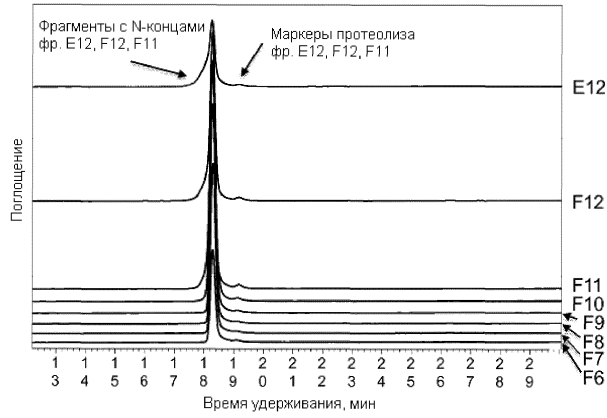
Фиг. 49



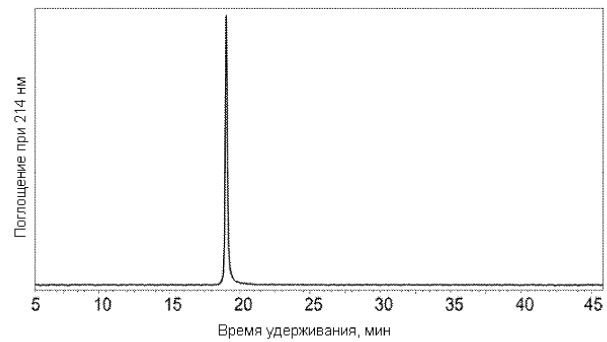
Фиг. 50



Фиг. 51

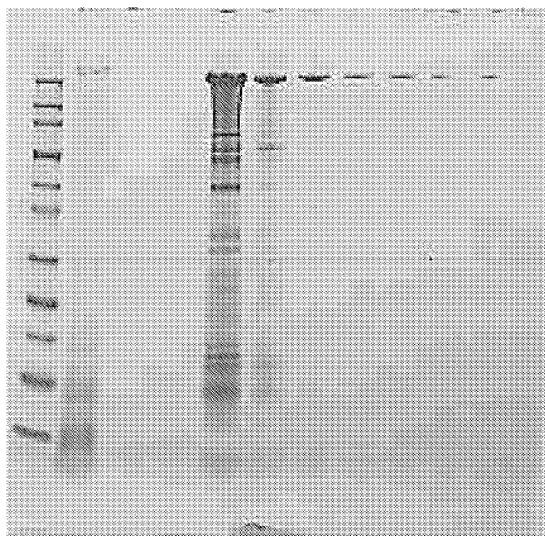


Фиг. 52



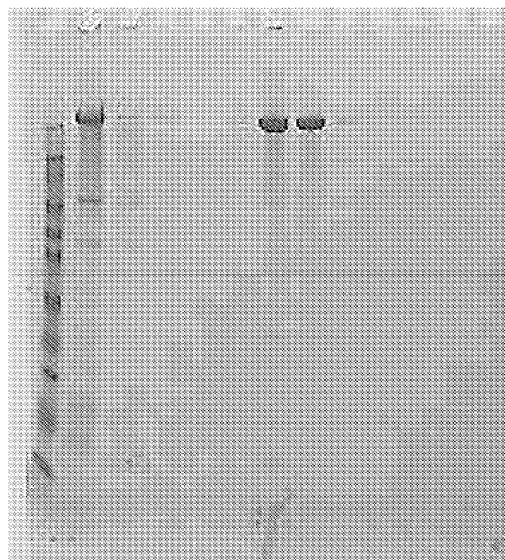
Фиг. 53

M FT W E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9



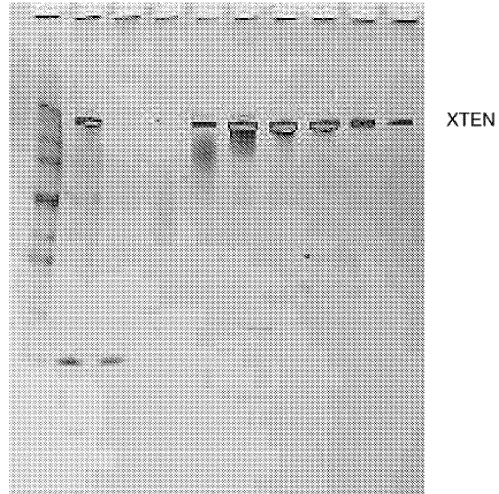
Фиг. 54

M L FT W1 W2 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8

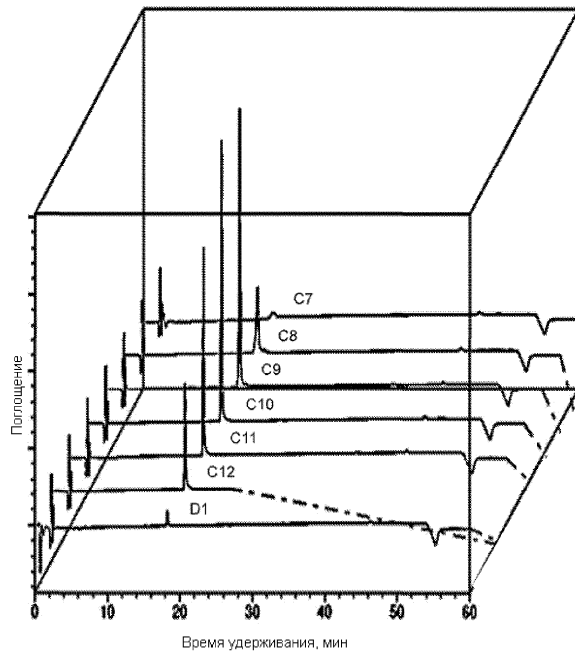


Фиг. 55

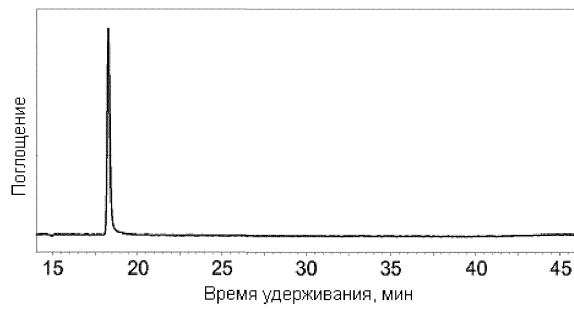
M Нагрузка W C7 C8 C9 C10 C11 C12 D1



Фиг. 56

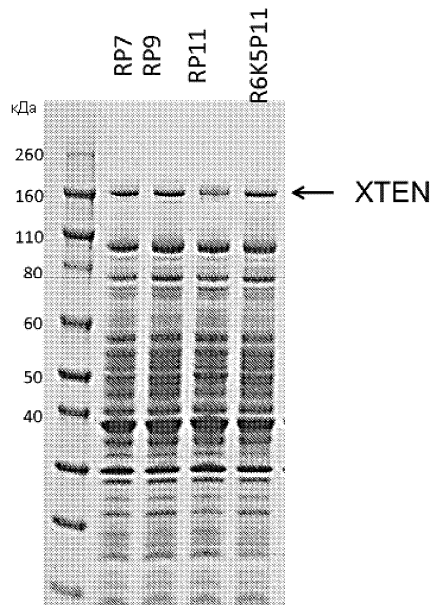


Фиг. 57

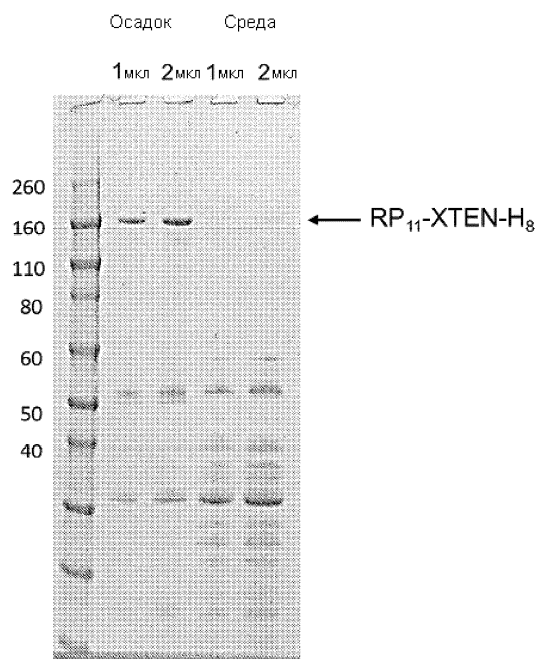


Фиг. 58

N-концевой маркер



Фиг. 59



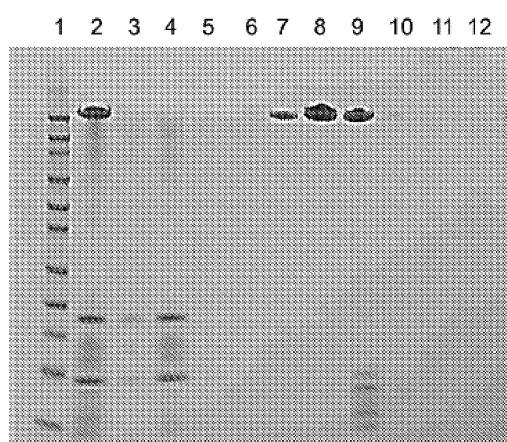
Фиг. 60

Дорожка 1	Стандарты молекулярного веса
Дорожка 2	Нагрузка колонки с носителем MacroCap SP
Дорожка 3	Начальный элюат на выходе из колонки с носителем MacroCap SP
Дорожка 4	Раствор для вытеснения из колонки с носителем MacroCap SP
Дорожка 5	Раствор для промывки носителя MacroCap SP
Дорожка 6	Элюат 1 из носителя MacroCap SP
Дорожка 7	Элюат 2 из носителя MacroCap SP
Дорожка 8	Элюат 3 из носителя MacroCap SP
Дорожка 9	Элюат 4 из носителя MacroCap SP
Дорожка 10	Элюат 5 из носителя MacroCap SP
Дорожка 11	Элюат 6 из носителя MacroCap SP



Фиг. 61

Дорожка 1	Стандарты молекулярного веса
Дорожка 2	Нагрузка ИМАС-колонки
Дорожка 3	Начальный элюат на выходе из ИМАС-колонки
Дорожка 4	Раствор для вытеснения из ИМАС-колонки
Дорожка 5	Раствор для промывки ИМАС-колонки
Дорожка 6	Элюат 1 из ИМАС-колонки
Дорожка 7	Элюат 2 из ИМАС-колонки SP
Дорожка 8	Элюат 3 из ИМАС-колонки SP
Дорожка 9	Элюат 4 из ИМАС-колонки SP
Дорожка 10	Элюат 5 из ИМАС-колонки SP
Дорожка 11	Элюат 6 из ИМАС-колонки SP
Дорожка 12	Элюат 7 из ИМАС-колонки SP



Фиг. 62

A

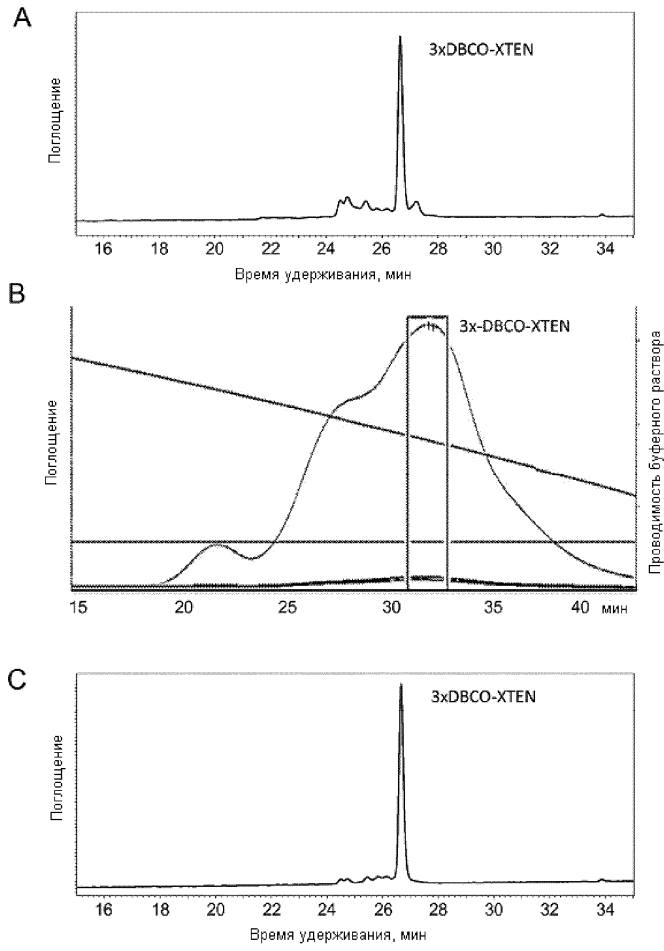


B

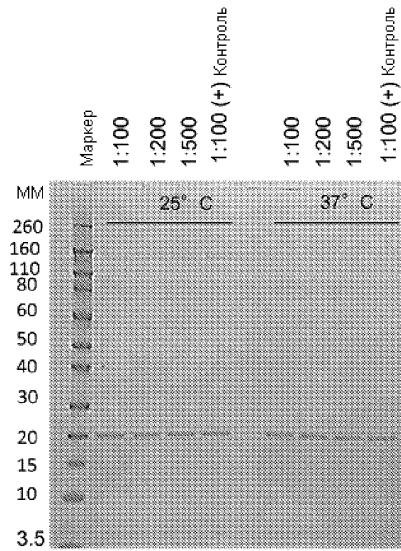


Фиг. 63

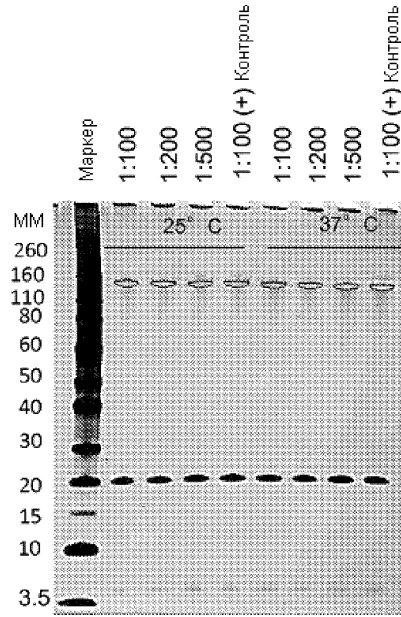




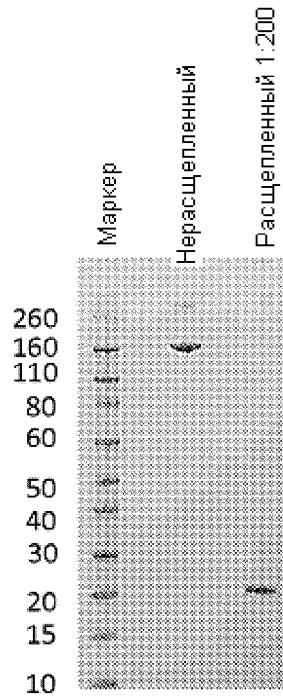
Фиг. 64



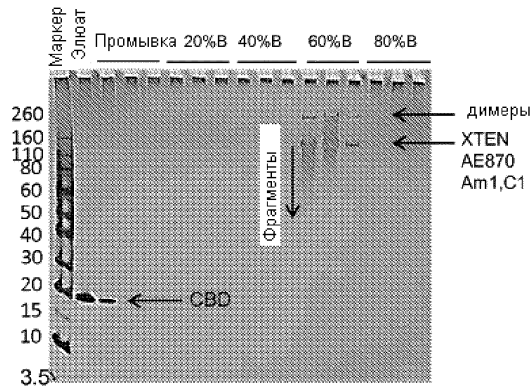
Фиг. 65А



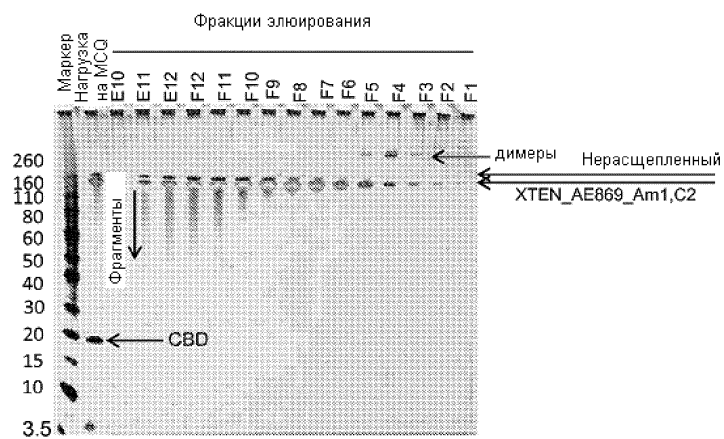
Фиг. 65В



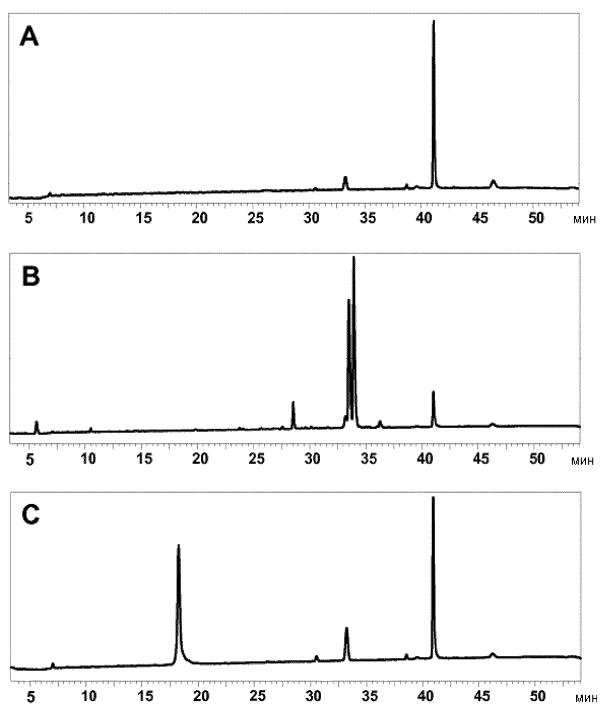
Фиг. 66А



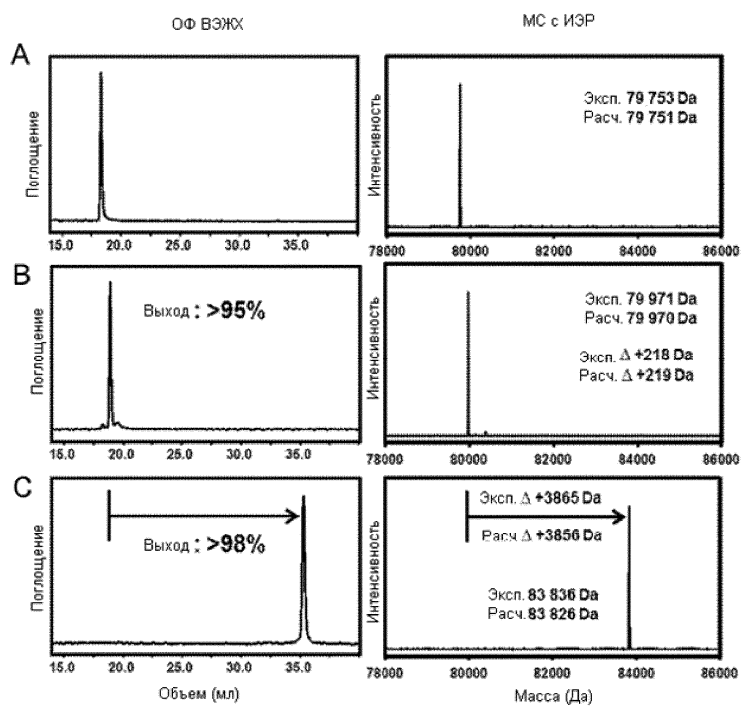
Фиг. 66В



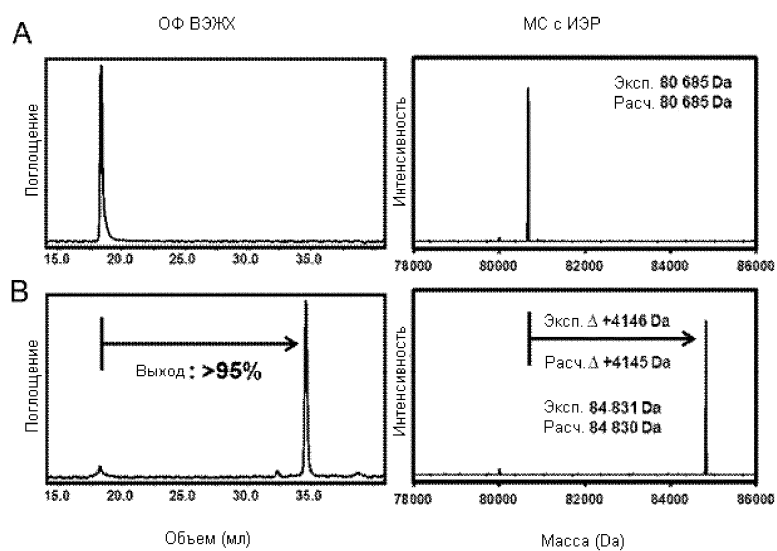
Фиг. 66С



Фиг. 67

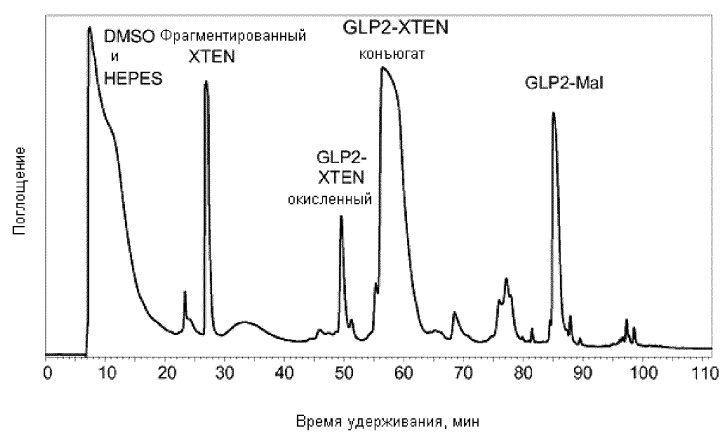


Фиг. 68

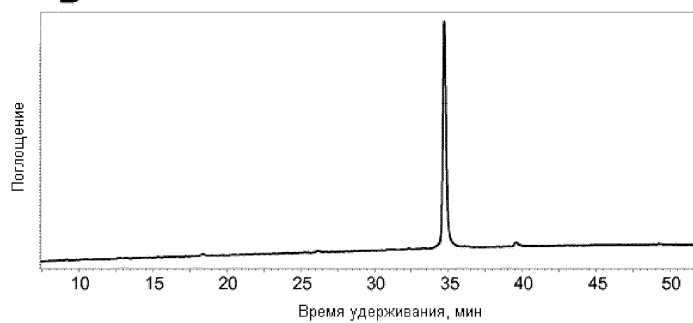


Фиг. 69

A

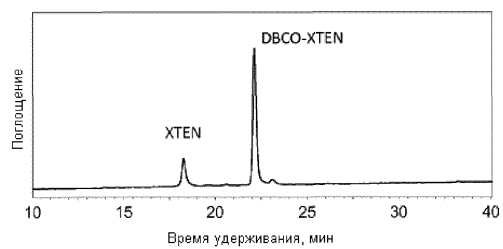


B

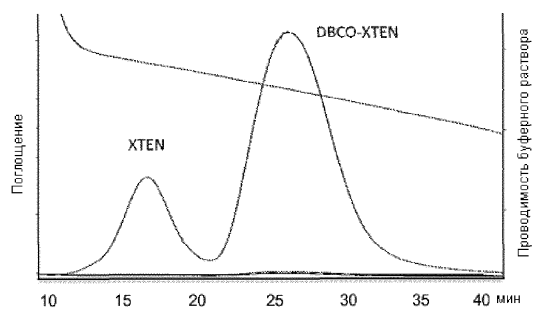


Фиг. 70

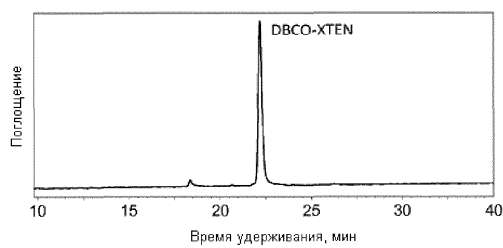
A



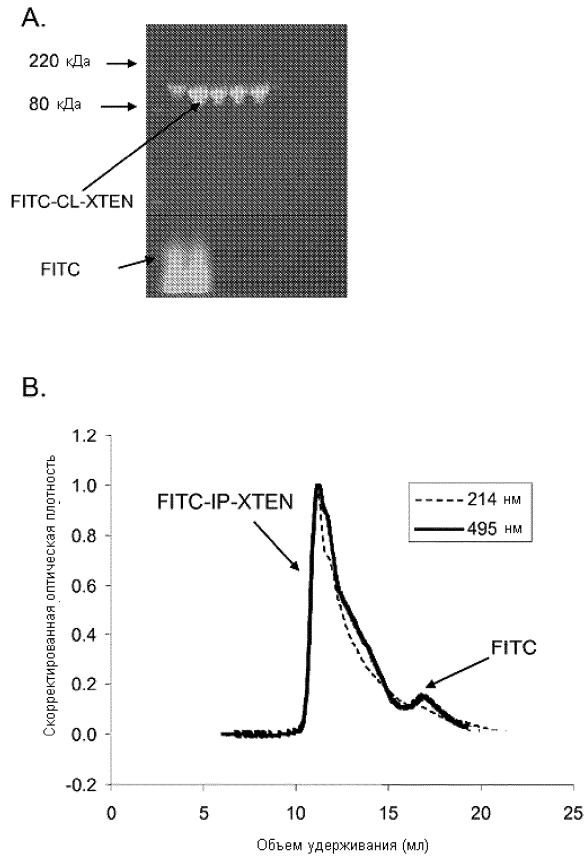
B



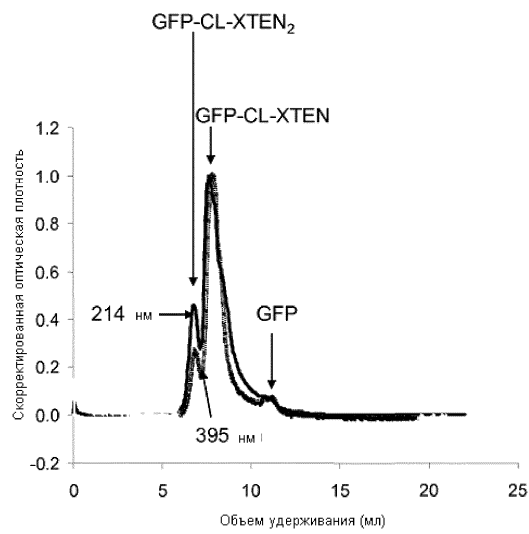
C



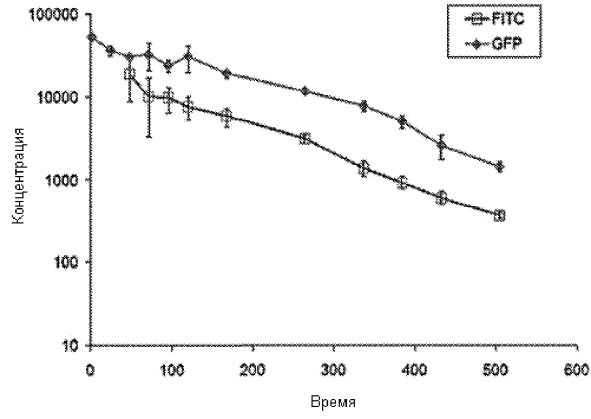
Фиг. 71



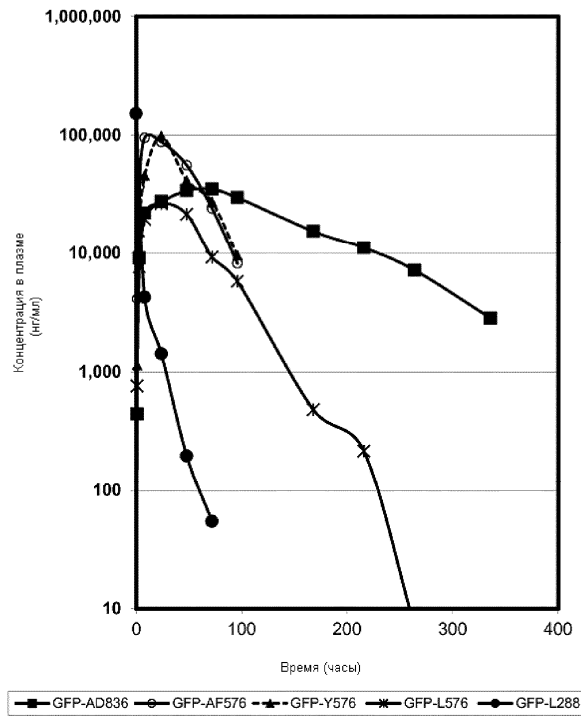
Фиг. 72



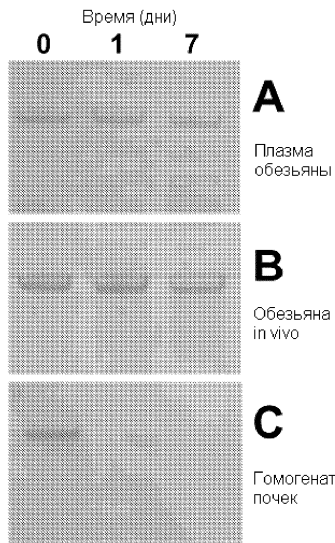
Фиг. 73



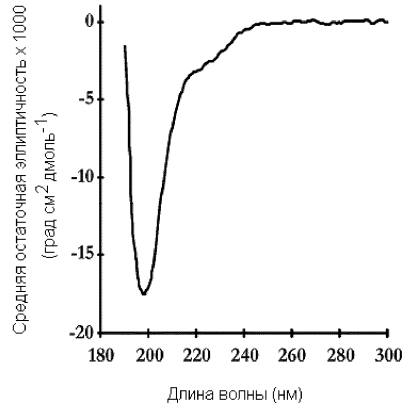
Фиг. 74



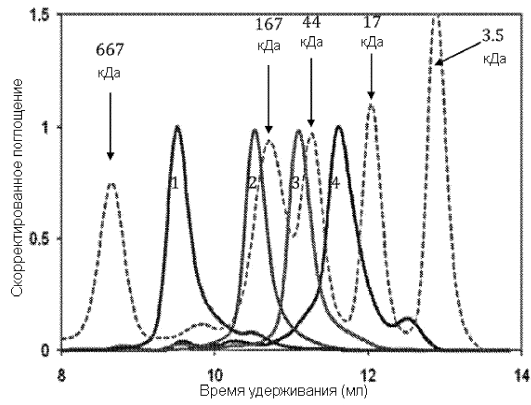
Фиг. 75



Фиг. 76

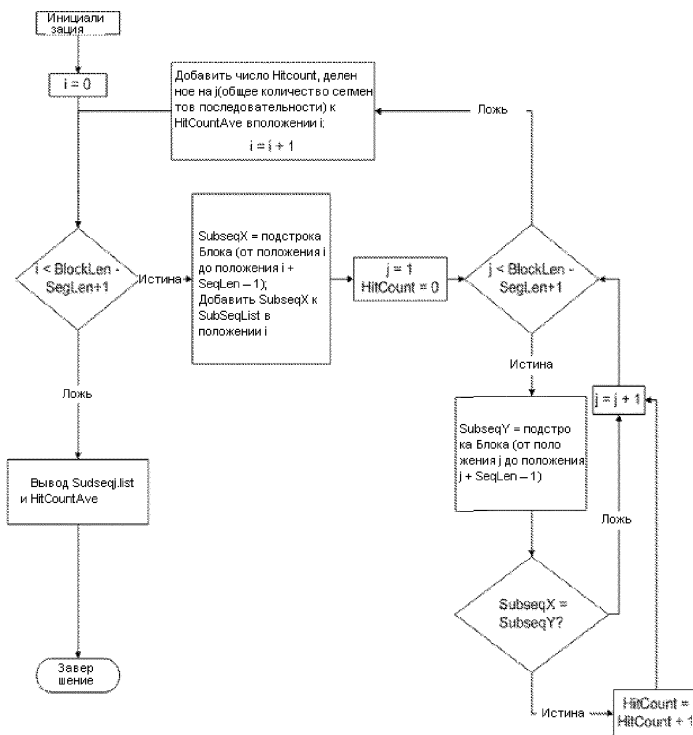


Фиг. 77



1. Глюкагон-У288
2. Глюкагон-У144
3. Глюкагон-У72
4. Глюкагон-У36
- = Стандарты

Фиг. 78



Фиг. 79



037979

XTEN 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11      XTEN Длина: N=11  
 Последовательность A S T G E T G E T G E

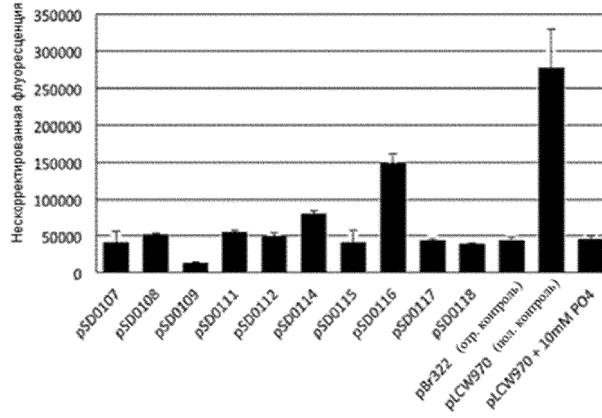


Длина подпоследовательности: S=3

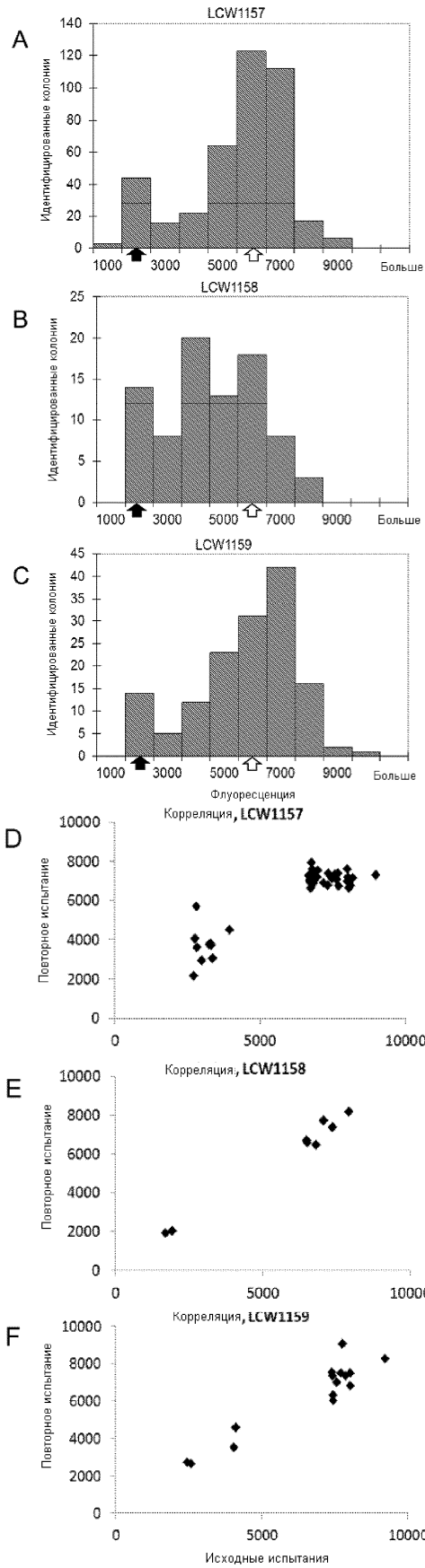
	Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 4	Seg 5	Seg 6	Seg 7	Seg 8	Seg 9
Seg 1	AST	x							
Seg 2	STG		x						
Seg 3	TGE			x		x			
Seg 4	GET				x		x		
Seg 5	ETG					x		x	
Seg 6	TGE		x				x		x
Seg 7	GET			x				x	
Seg 8	ETG				x				x
Seg 9	TGE						x		
	1	1	2	2	2	3	2	2	2

Число подпоследовательностей = 1.89

Фиг. 80

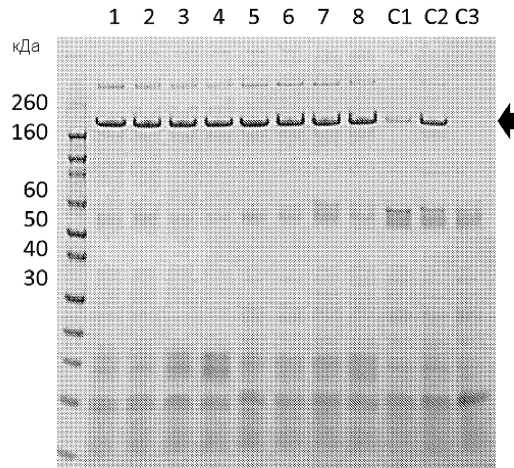


Фиг. 81

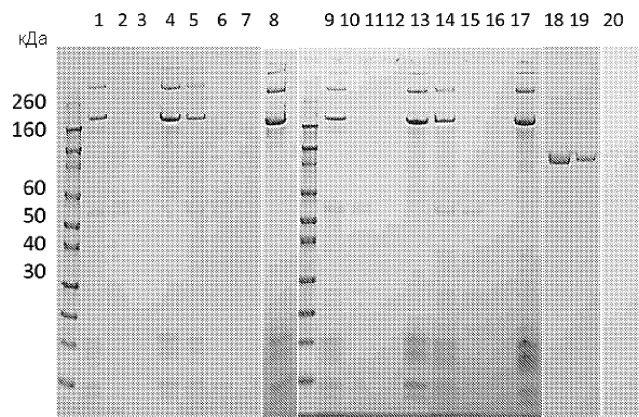


Фиг. 82A, B, C, D, E, F

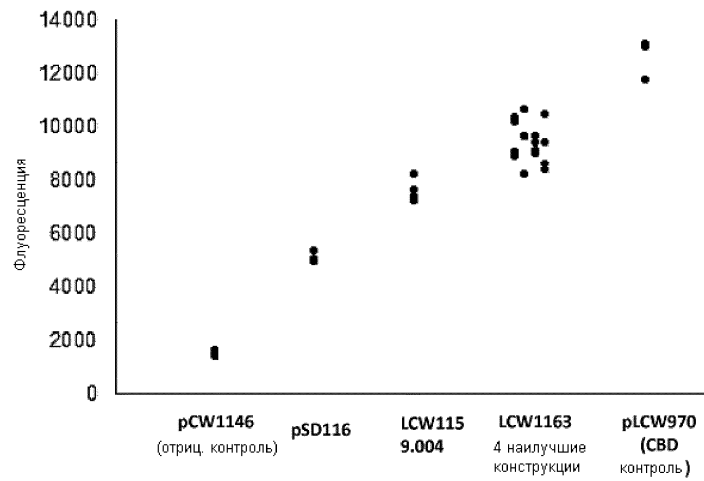
037979



Фиг. 83

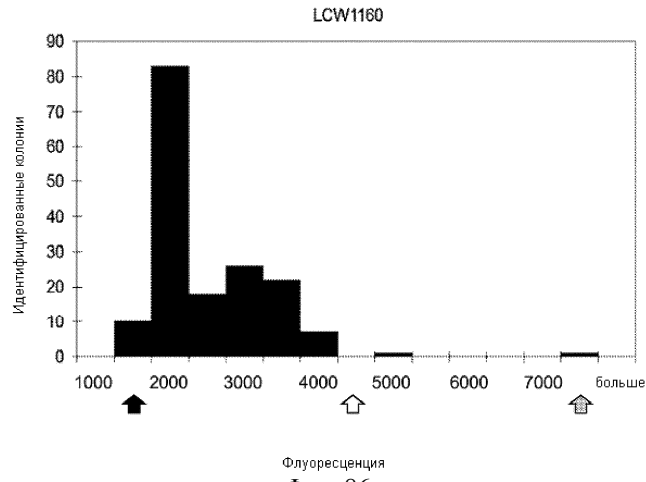


Фиг. 84

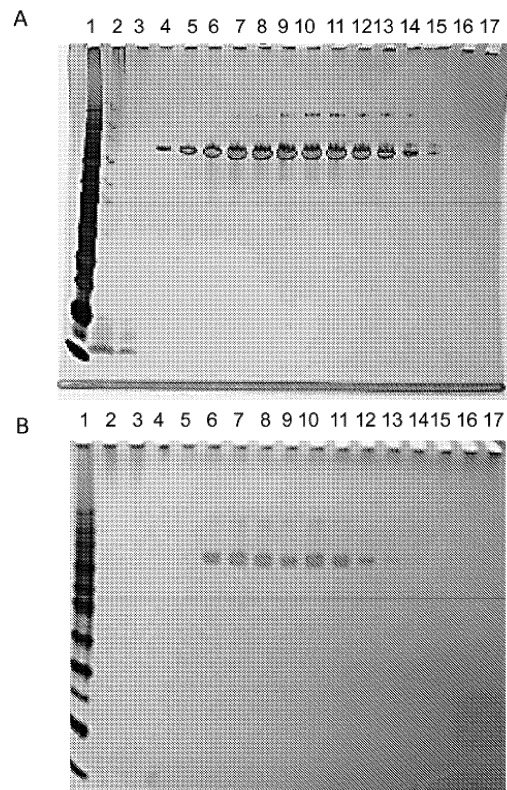


Фиг. 85

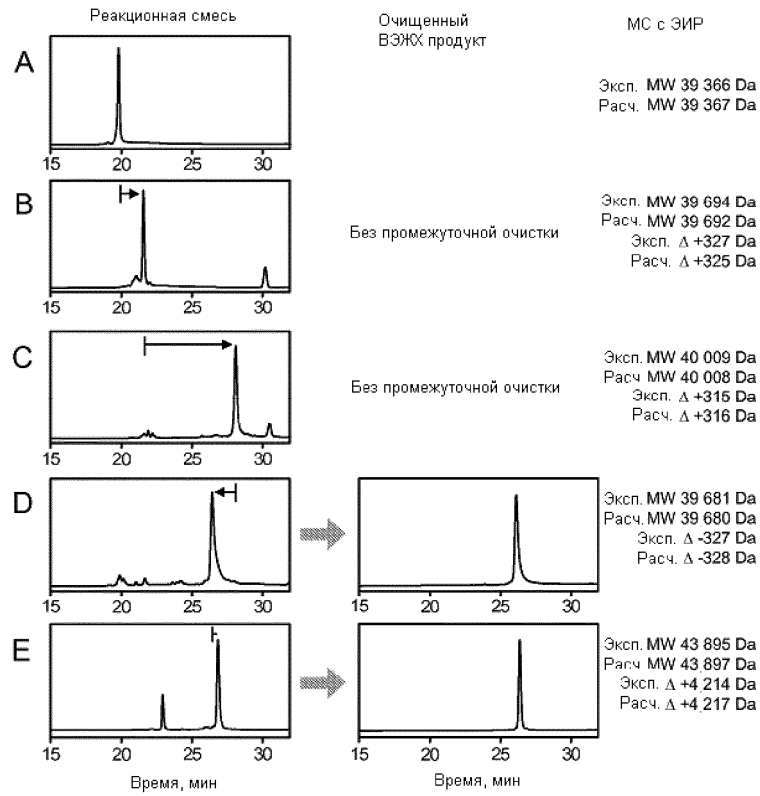
037979



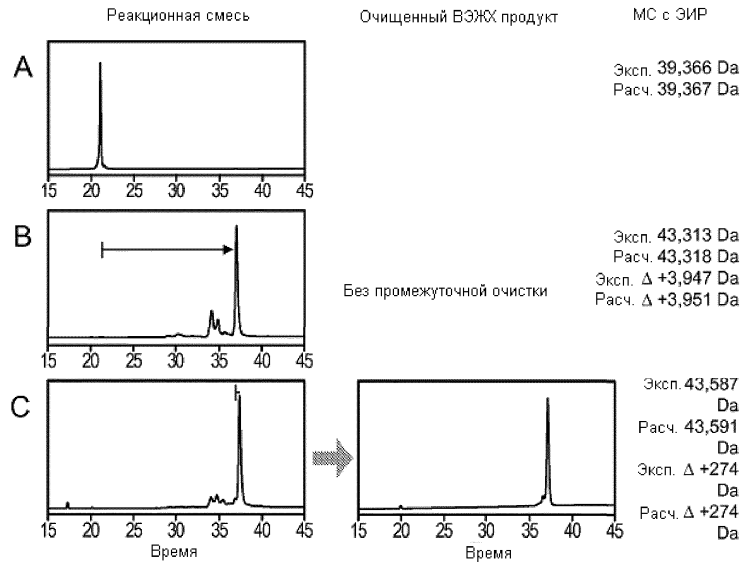
Фиг. 86



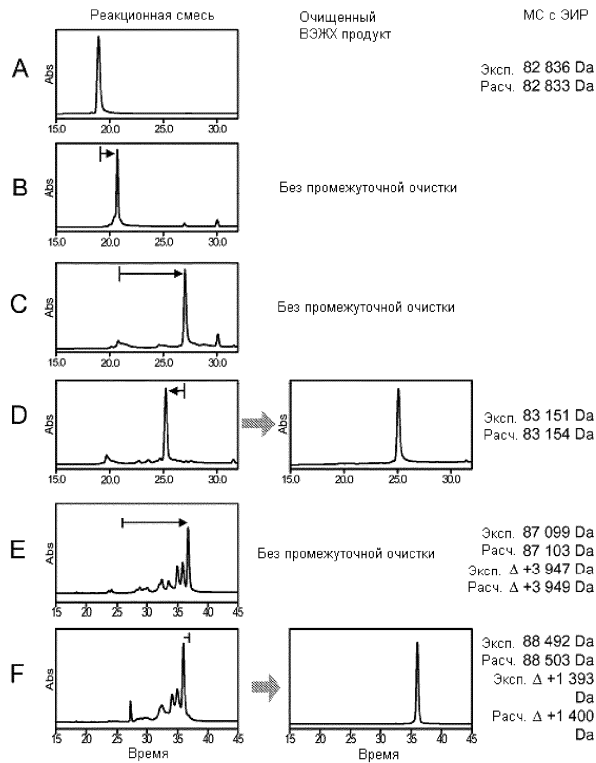
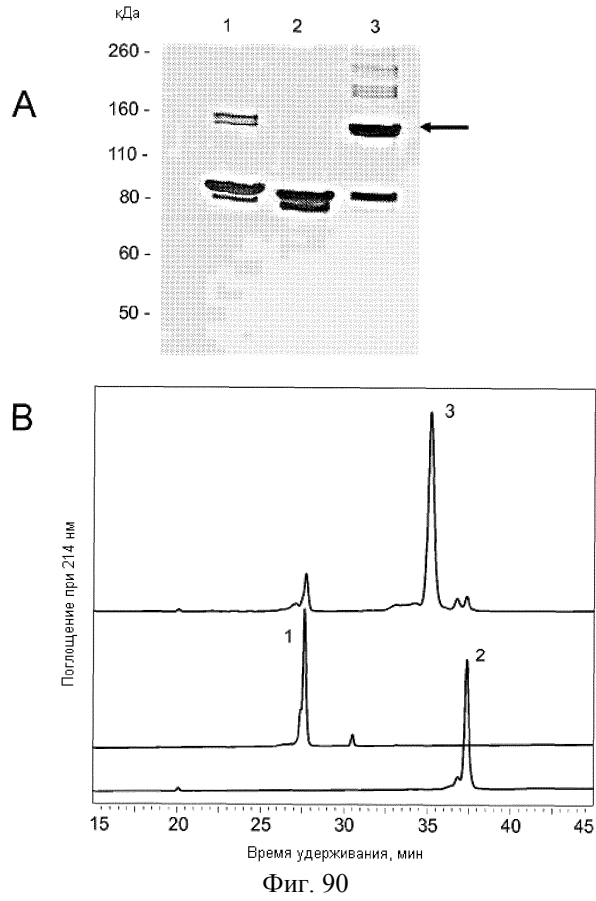
Фиг. 87

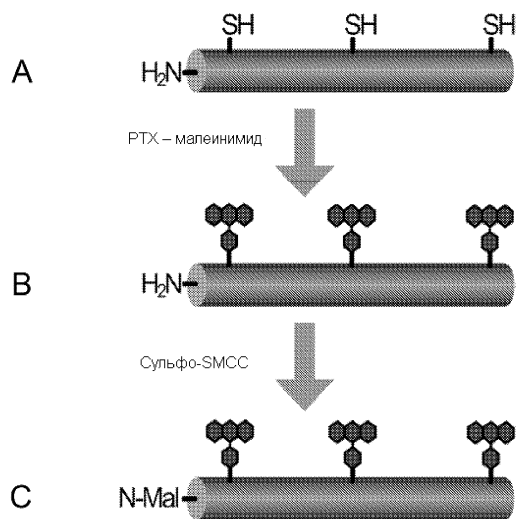


Фиг. 88

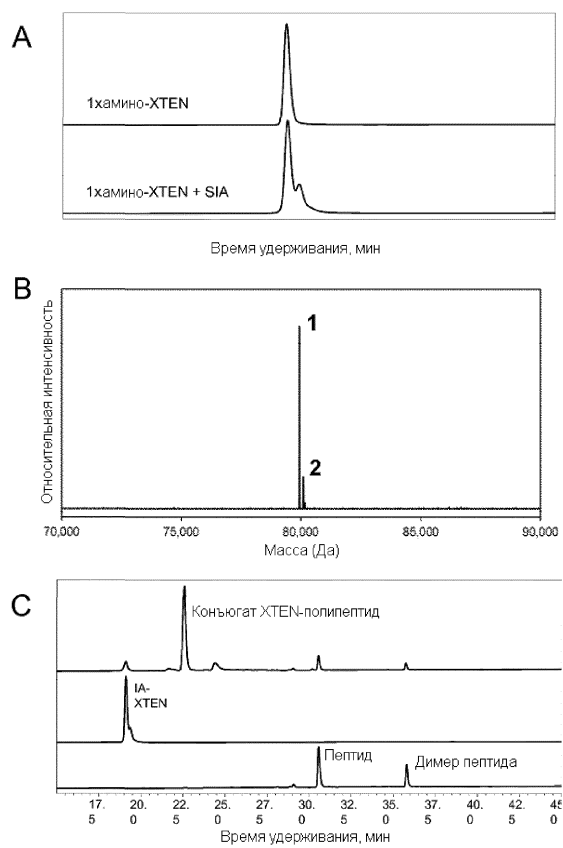


Фиг. 89

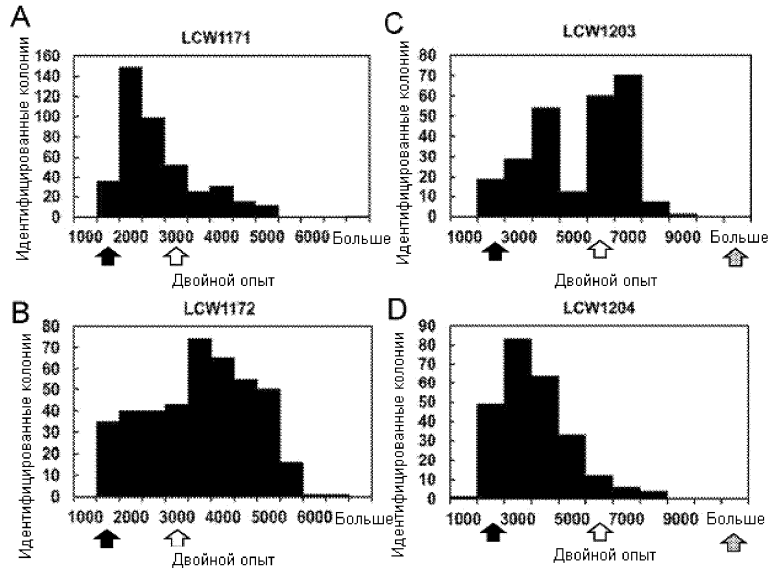




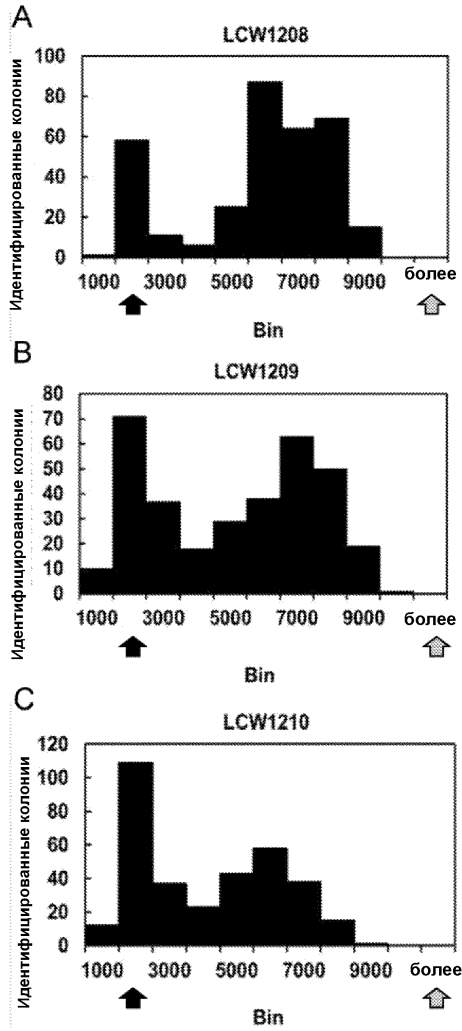
Фиг. 92



Фиг. 93



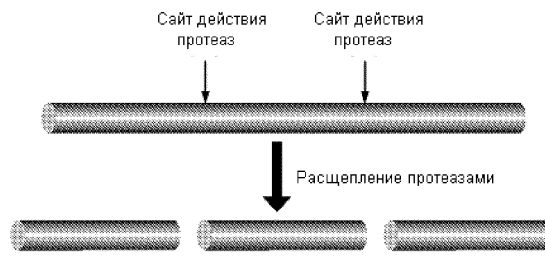
Фиг. 94



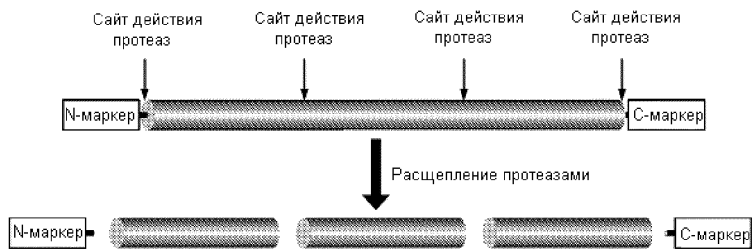
Фиг. 95



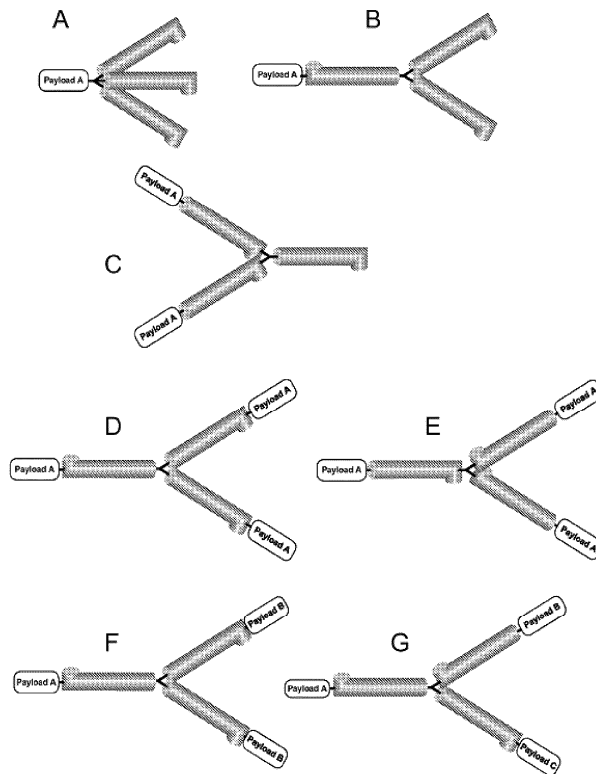
A



B

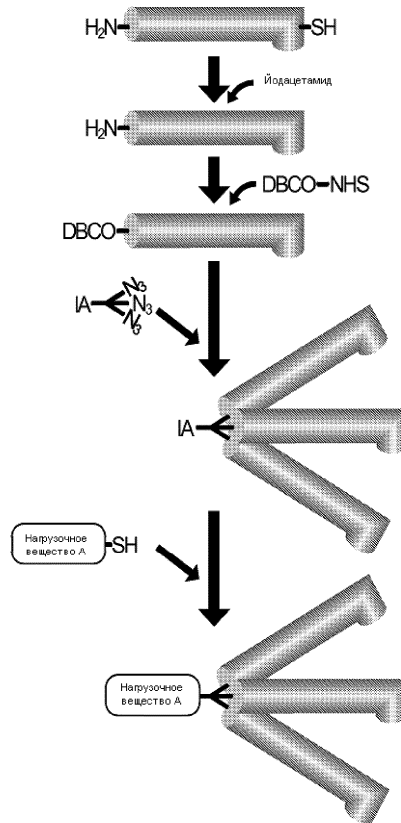


Фиг. 96

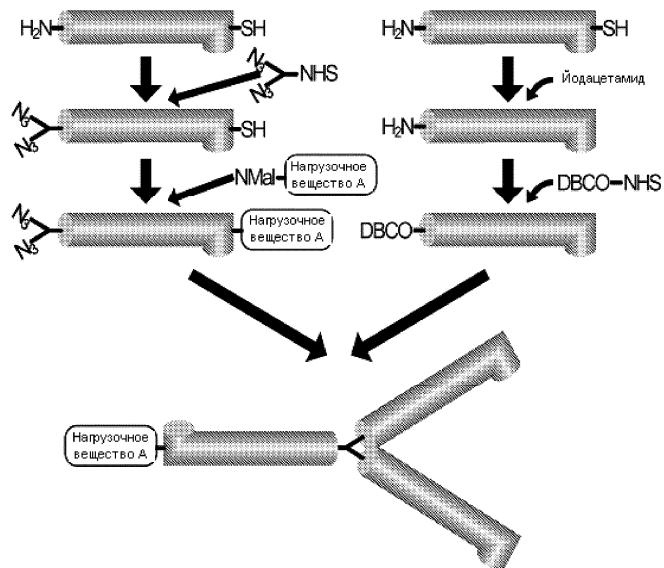


\*Payload A, B – Нагрузочное вещество A, B

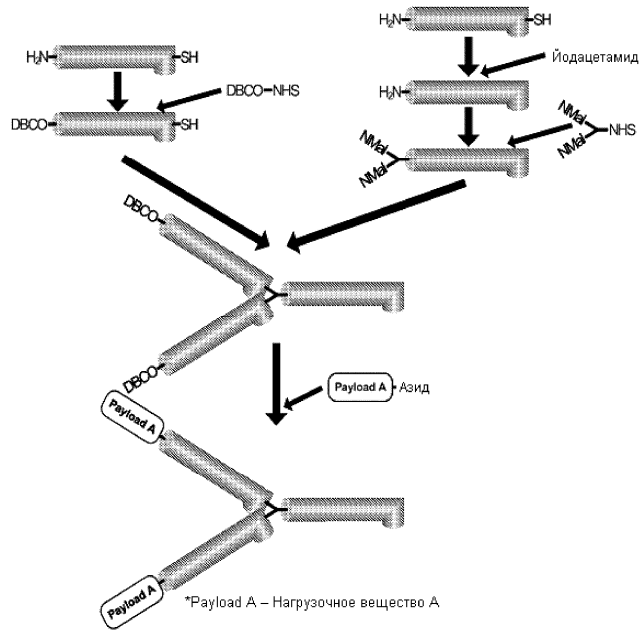
Фиг. 97



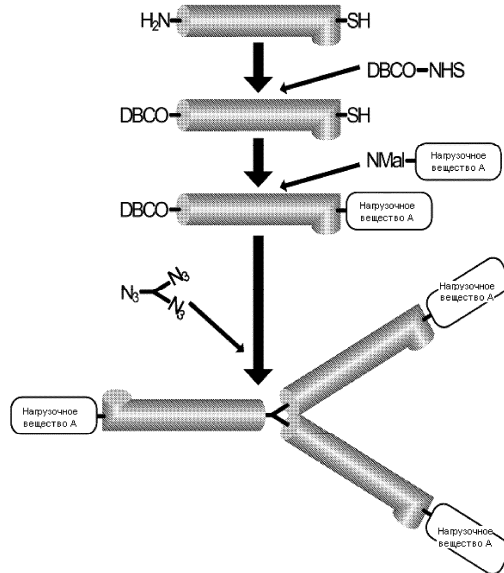
Фиг. 98



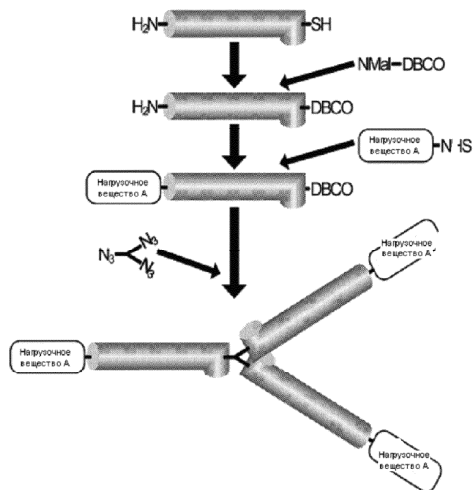
Фиг. 99



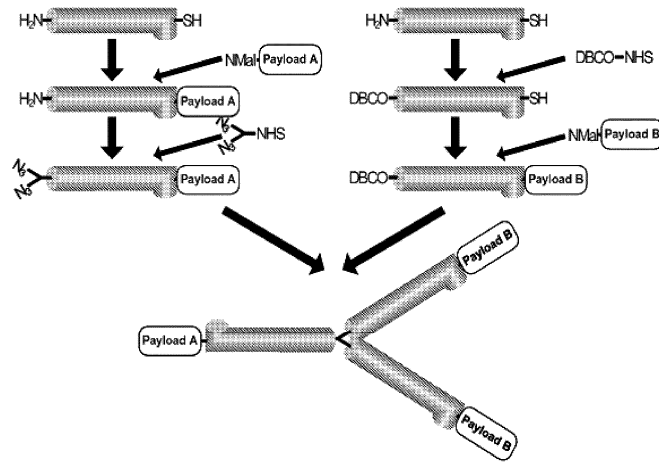
Фиг. 100



Фиг. 101

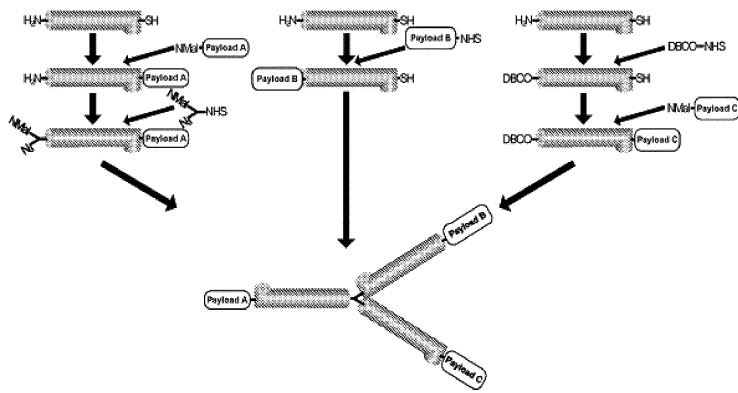


Фиг. 102



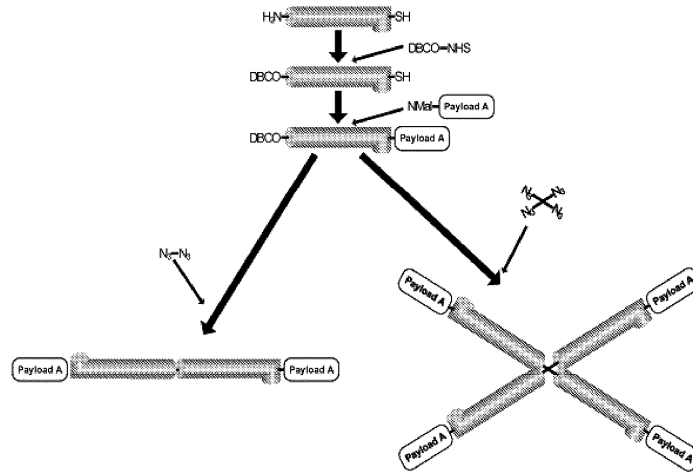
\*Payload A, B – Нагрузочное вещество A, B

Фиг. 103



\*Payload A, B, C – Нагрузочное вещество A, B, C

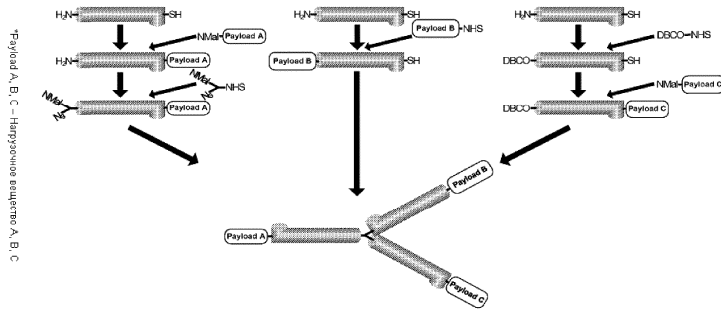
Фиг. 104



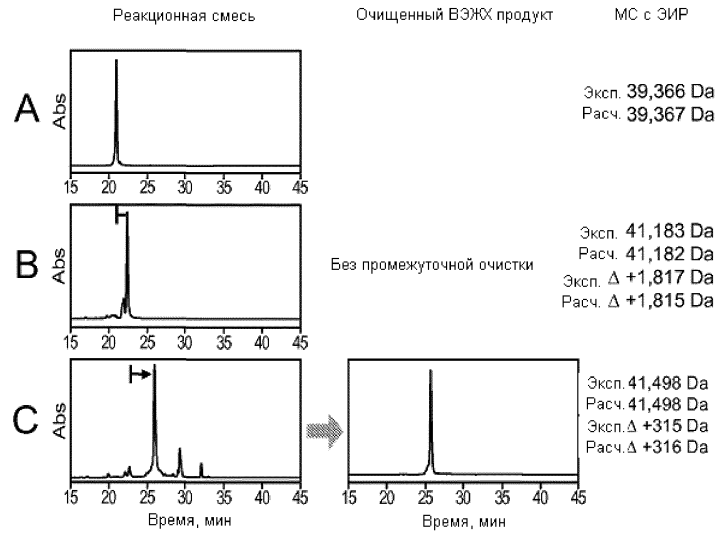
\*Payload A – Нагрузочное вещество A

Фиг. 105

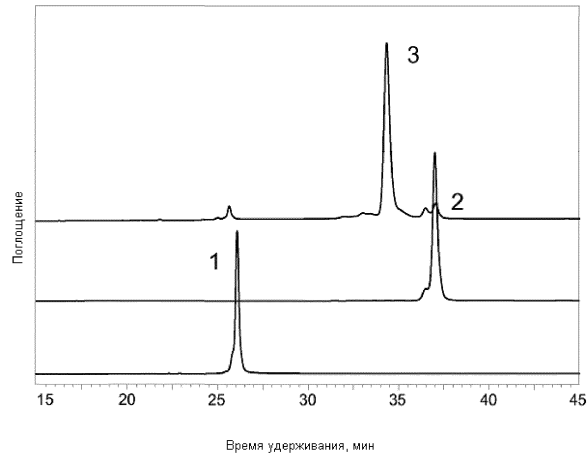
037979



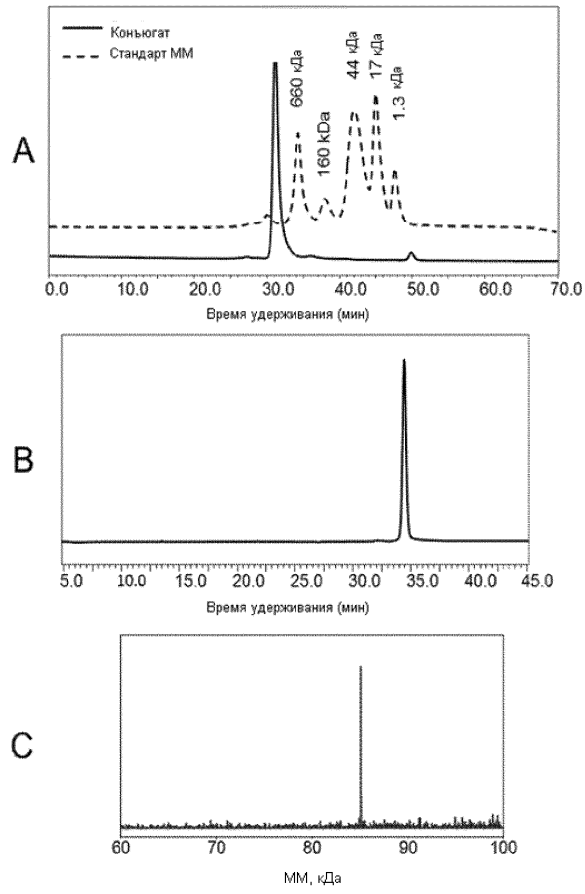
Фиг. 106



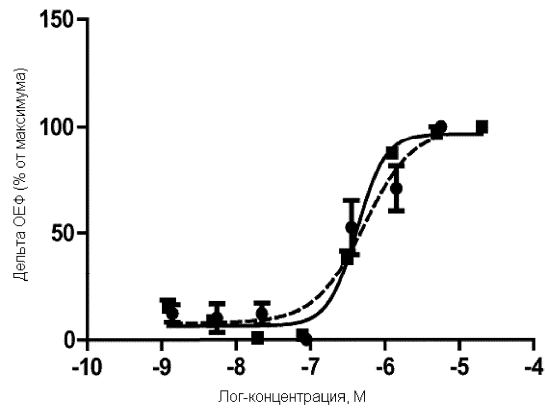
Фиг. 107



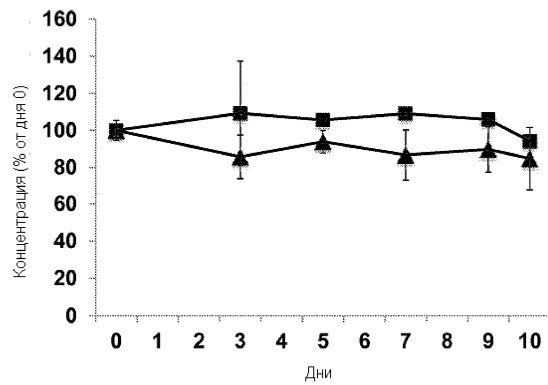
Фиг. 108



Фиг. 109

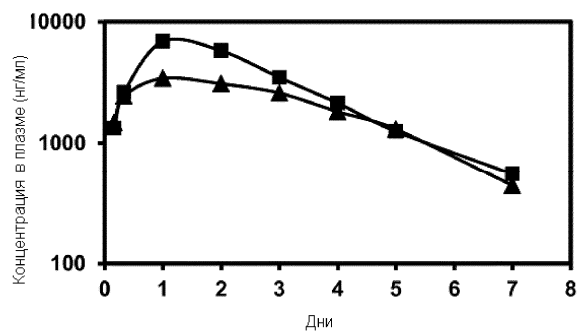


Фиг. 110

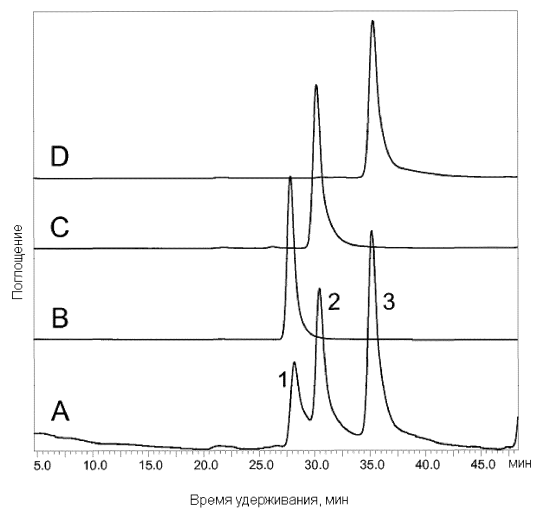


Фиг. 111

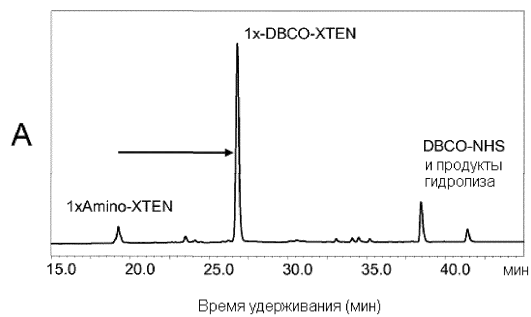
037979



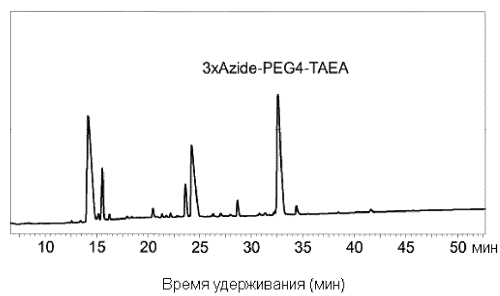
Фиг. 112



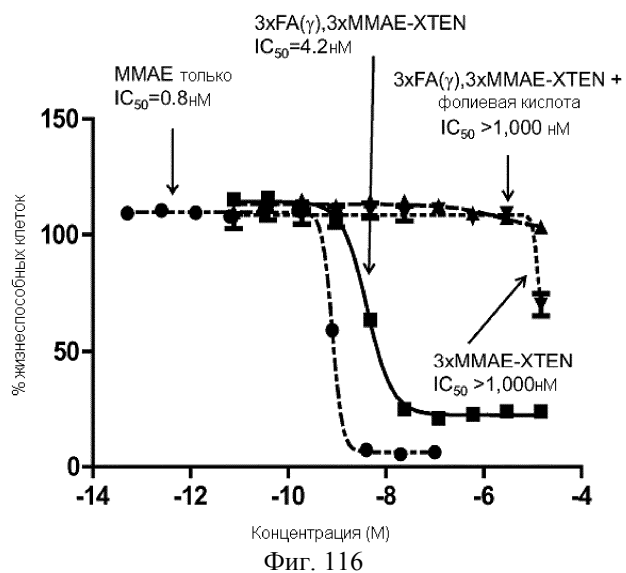
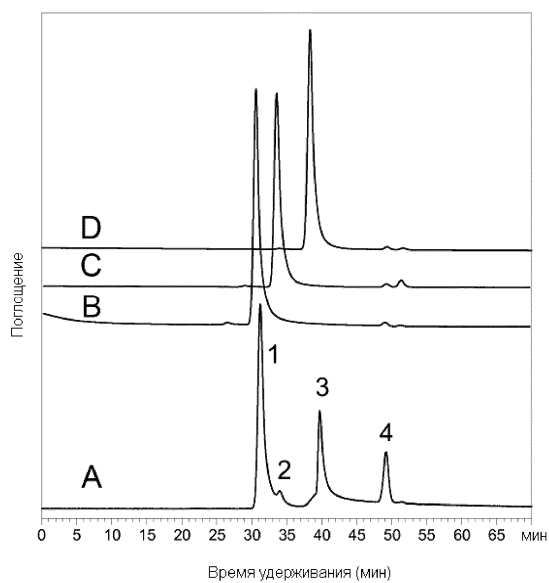
Фиг. 113



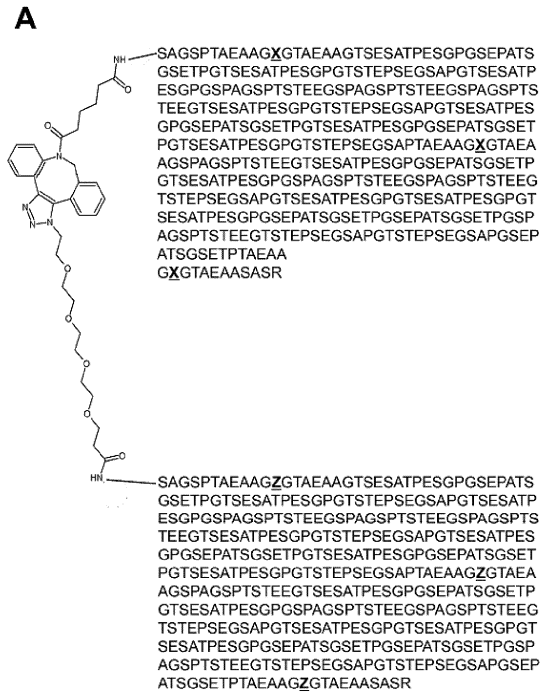
B



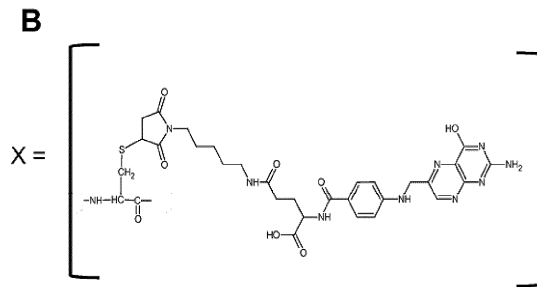
Фиг. 114



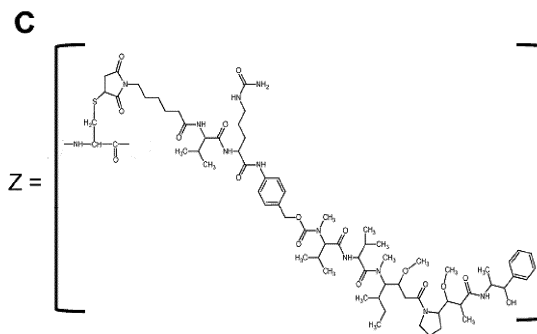




Фиг. 117А



Остаток X = остаток Цис, модифицированный Фолат-γ-Мал



Остаток Z = остаток Цис, модифицированный МС-Вал-Цит-РАВ-ММАЕ

Фиг. 117В, С

