

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042423**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.13

(21) Номер заявки
201892561

(22) Дата подачи заявки
2017.05.05

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)

(54) ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ GDF15 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/333,886**

(32) **2016.05.10**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/031197**

(87) **WO 2017/196647 2017.11.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Армстронг Энтони, Коннор Джудит
Энн, Фурман Дженнифер, Хуан Чичи,
Хантер Майкл Дж., Линь-Шмидт
Сефань, Нельсон Серена, Рангвала
Шамина, Малликан Шэннон, Чавес
Хосе Антонио (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) CHEN et al. "Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality," Adv Drug Deliv Rev, 15 October 2015 (15.10.2013), Vol. 65, Iss. 10, Pgs. 1357-1369. entire document
US-B1-6420543
US-A1-20140213511
WO-A1-2015198199
US-A1-20160168213

(57) Описаны гибридные белки, содержащие белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок GDF15. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие гибридные белки, рекомбинантные клетки с ними, композиции, содержащие гибридные белки, и способы применения гибридных белков для лечения или профилактики заболеваний, расстройств или состояний.

B1**042423****042423****B1**

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к гибридным белкам GDF15. В частности, настоящее изобретение относится к гибриднему белку, содержащему белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок GDF15, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим гибридные белки, рекомбинантным клеткам с ними, а также фармацевтическим композициям, содержащим эти гибридные белки. Также предложены способы продуцирования гибридных белков и применения гибридных белков для лечения метаболических расстройств.

Предпосылки создания изобретения

Белок GDF15, член семейства TGF β , - это секретируемый белок, который циркулирует в плазме в виде гомодимера с молекулярной массой 25 кДа. У большинства субъектов уровни белка GDF15 в плазме варьируют в интервале 150-1150 пг/мл (Tsai et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2012, 3: 239-243). Уровни белка GDF15 в плазме возрастают в состоянии травмы, при сердечно-сосудистых и определенных типах онкологических заболеваний. Полагают, что данное возрастание обусловлено цитопротекторным механизмом. Высокие уровни белка GDF15 в плазме связаны с потерей массы тела вследствие анорекции и кахексии при онкологических заболеваниях, а также при почечной и сердечной недостаточности. В одном клиническом исследовании уровни белка GDF15 служили в качестве независимого прогностического фактора резистентности к инсулину у субъектов, страдающих ожирением, но не больных диабетом (Kempf et al., Eur. J. Endo. 2012, 167: 671-678). Исследование на близнецах показало, что различия в уровнях белка GDF15 в парах близнецов коррелировали с различиями в индексах массы тела (ИМТ) в соответствующих парах, подтверждая, что GDF15 служит долгосрочным регулятором энергетического гомеостаза (Tsai et al., PLoS One. 2015, 10 (7):e0133362).

Белок GDF15 был подробно изучен как биомаркер нескольких сердечно-сосудистых и других видов заболеваний; кроме того, была описана защитная роль GDF15 при гипертрофии миокарда и ишемическом поражении (Collinson, Curr. Opin. Cardiol. 2014, 29: 366-371; Kempf et al., Nat. Med. 2011, 17: 581-589; Xu et al., Circ Res. 2006, 98: 342-50). Было показано, что белок GDF15 играет важную роль в защите от повреждений почечных канальцев и интерстициальных тканей в моделях диабета 1 и 2-го типов у мышей (Mazagova et al., Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2013; 305: F1249-F1264). Предполагается, что белок GDF15 обеспечивает защитное действие против гибели сенсорных и моторных нейронов в процессе старения и улучшает восстановление после повреждения периферических нервов (Strelau et al., J. Neurosci. 2009, 29: 13640-13648; Mensching et al., Cell Tissue Res. 2012, 350: 225-238). Фактически было показано, что трансгенные мыши с белком GDF15 имеют большую продолжительность жизни, чем контрольные из одного помета с ними, и это может указывать на то, что эта молекула служит фактором долговременного выживания (Wang et al., Aging. 2014, 6: 690-700).

В многочисленных работах продемонстрировано улучшение переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину в моделях мышей после введения белка GDF15. Две независимых линии трансгенных мышей со сверхэкспрессией GDF15 имели пониженную массу тела и массу жировой ткани, а также улучшенную переносимость глюкозы (Johnen et al., Nat. Med. 2007, 13: 1333-1340; Macia et al., PLoS One. 2012, 7: e34868; Chrysovergis et al., Int. J. Obesity. 2014, 38: 1555-1564). Сообщалось об увеличении полного расхода энергии и окислительного метаболизма у трансгенных мышей с белком GDF15 (Chrysovergis et al., 2014, Id.). Это сопровождалось возрастанием экспрессии термогенных генов в бурой жировой ткани и возрастанием экспрессии липолитических генов в белой жировой ткани. Мыши, у которых не хватало гена GDF15, имели увеличенную массу тела и массу жировой ткани (Tsai et al., PLoS One. 2013, 8 (2): e55174). Было показано, что содержащий Fc гибридный белок с GDF15 вызывает уменьшение массы тела, а также улучшение переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину на модели яванских макаков, страдающих ожирением, после еженедельного введения в период шести недель (WO 2013/113008).

Предполагается, что влияние белка GDF15 на массу тела достигается за счет сокращения потребления пищи и увеличения расхода энергии. GDF15 может улучшать регуляцию гликемии посредством зависимых и не зависимых от массы тела механизмов.

На основании этих вместе взятых наблюдений можно предполагать, что увеличение уровней GDF15 может оказаться полезным при терапии метаболических заболеваний. Таким образом, в данной области существует потребность в композициях на основе GDF15, которые можно применять для лечения или профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение удовлетворяет данную потребность, предлагая гибридные белки GDF15, которые демонстрируют повышенную растворимость/стабильность и проявляют признаки, указывающие на возможность их применения для лечения или профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний. Такие признаки включают, например, уменьшение массы тела, улучшение переносимости глюкозы, улучшение чувствительности к инсулину у субъекта, которому вводят гибридный белок в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к гибриднему белку, содержащему: (a) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (c) белок GDF15, причем гибридный белок со-

ставлен от N-конца до C-конца в порядке (a)-(b)-(c).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления белок GDF15 содержит зрелый белок GDF15 или его функциональный вариант. В более конкретных вариантах осуществления белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 6-11. В других конкретных вариантах осуществления белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, такую как аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-11.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. В других конкретных вариантах осуществления белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой гибкий линкер. В конкретных вариантах осуществления гибкий линкер содержит последовательность (GGGS)_n, где n составляет от 2 до 20, предпочтительно от 4 до 10. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения линкер гибридного белка представляет собой структурированный линкер. В конкретных вариантах осуществления структурированный линкер содержит последовательность (AP)_n или (EAAAK)_n, где n составляет от 2 до 20, предпочтительно от 4 до 10.

В вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70. В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок настоящего изобретения.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования гибридного белка настоящего изобретения. При этом способ включает в себя этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок, и (2) выделяют гибридный белок, продуцируемый клеткой-хозяином.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию настоящего изобретения.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния, причем способ включает введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции настоящего изобретения. В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно или внутривенно.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения способ лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, содержит введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70, и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вари-

антов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения, будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми чертежами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На чертежах показано следующее.

На фиг. 1А и 1В показана кристаллическая структура GDF15, в которой дисульфидные мостики между первым и вторым остатками цистеина (C1-C2) образуют петлю на N-конце этого белка.

На фиг. 2 показано влияние подкожного введения гибридных белков в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, например, гибридных белков FP1 (SEQ ID NO: 60) и 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 с гексагистиридиновой меткой (6xHis), присоединенной на N-конце), на потребление пищи мышами линии C57BL/6; показано суммарное потребление пищи за 24 ч после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)), $\pm$ SEM (стандартная погрешность средней величины); N = по 8 животных в группе во всех группах, за исключением группы с N=9, получавшей FP1, 16 нмоль/кг. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 3 показано влияние подкожного введения FP1 и 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 с гексагистиридиновой меткой (6xHis), присоединенной на N-конце), на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули; показано суммарное потребление пищи за 48 ч после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (PBS) $\pm$ SEM; N = по 8 животных в группе. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 4 показано изменение массы тела у мышей с алиментарным ожирением (DIO) во время введения FP1. Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (день 0); N = по 8 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 5А и 5В показаны уровни глюкозы в крови мышей DIO, измеренные в пероральном тесте на переносимость глюкозы (OGTT), проведенном через 14 дней, в которые дозу FP1 вводили каждые 3 дня (q3d), причем уровни выражены в виде площади под кривой (AUC). N = по 8 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 6 показаны уровни глюкозы в крови мышей DIO, измеренные после еды, во время введения FP1. N = по 8 животных в группе. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 7 показана оценка резистентности к инсулину на основе гомеостатической модели (HOMA-IR) у мышей DIO после 4 часов голодания, проведенная через 14 дней, в которые вводили FP1. N = по 8 животных в группе. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 8 показано изменение массы тела у мышей ob/ob во время введения FP1 каждые 3 дня (q3d). Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (день 0); N = по 9 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 9 показаны уровни глюкозы в крови мышей ob/ob во время введения FP1. Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (день 0); N = по 9 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 10 показана зависимость от времени средней ($\pm$ стандартное отклонение, CO) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после внутривенного (в/в) и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг мышам линии C57BL/6.

На фиг. 11 показана зависимость от времени средней ($\pm$ CO) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после в/в и п/к введения 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули.

На фиг. 12 показана зависимость от времени средней ($\pm$ CO) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после в/в и п/к введения 1 мг/кг яванским макакам, в соответствии с определениями

иммунологическим методом.

На фиг. 13 показана зависимость от времени концентрации FP1 (нг/мл) в виде интактного димера в сыворотке после однократного в/в введения яванским макакам, в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата (IA)/жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХМС).

На фиг. 14 показана зависимость от времени концентрации FP1 (нг/мл) в виде интактного димера в сыворотке после однократного п/к введения яванским макакам, в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

На фиг. 15 показана концентрация FP1, представленная в процентах (%) от исходной концентрации, через 0, 4, 24 и 48 ч после инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (Sub), в соответствии с определениями иммунологическим методом.

На фиг. 16 показана средняя концентрация FP1 в виде интактного димера, представленная в процентах (%) от концентрации в момент времени 0, через 0, 4, 24 и 48 ч после инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (Sub), в соответствии с определениями интактного вещества методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

На фиг. 17 показано быстрое потребление пищи перед и после однократного введения тощим мышам-самцам линии C57BL6N белка GDF15 с различными вариантами N-концевой делеции (SEQ ID NO: 92, 111 и 112), по сравнению с диким типом гибрида без делеции (SEQ ID 26 с меткой 6x His, присоединенной на N-конце). N = по 8 животных в группе; * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 18 показано влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи мышами линии C57BL/6; в частности, показано суммарное потребление пищи за 24 ч после введения. Цифры, показанные внутри виде столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS (среднее $\pm$ SEM); N = по 8 животных в группе во всех группах, за исключением группы с N=6, получавшей 6xHis-FP1. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Даннетта для множественных сравнений.

На фиг. 19 показано суммарное потребление пищи, измеренное у крыс линии Спрег-Доули за 24 ч после введения однократной дозы FP2. Цифры, показанные внутри виде столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS (среднее $\pm$ SEM); N = по 8 животных в группе. ** $p < 0,01$; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 20 показано процентное изменение массы тела мышей DIO во время введения FP2 по схеме q3d. Стрелки указывают время подкожных инъекций FP2; N = по 6 животных в группе; * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 21А и 21В показана площадь под кривой (AUC) для уровней концентрации глюкозы в крови, измеренных в тесте OGTT через 14 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений, N = по 8 животных в группе.

На фиг. 22А показаны уровни инсулина в плазме, измеренные в тесте OGTT через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, носитель в контроле, по сравнению с группами, получавшими FP2 (0,3 нмоль/кг); FP2 (10 нмоль/кг); и розиглитазон. # $p < 0,05$, по сравнению с группой, получавшей розиглитазон (10 мг/кг), с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

На фиг. 22В показана AUC для уровней инсулина в плазме, измеренных в тесте OGTT через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$, по сравнению с группой, получавшей розиглитазон.

На фиг. 23 показаны уровни глюкозы в крови, измеренные после еды, через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, N = по 8 животных в группе.

На фиг. 24 показана оценка НОМА-IR у мышей DIO после 5 ч голодания, проведенная через 14 дней, в которые вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N = по 8 животных в группе.

На фиг. 25 показаны концентрации FP2 в сыворотке после внутривенного (в/в) введения 2 мг/кг и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг мышам линии C57BL/6. Значения представляют собой среднее $\pm$ CO (N=5 проб на каждый момент времени).

На фиг. 26 показаны концентрации FP2 в сыворотке после внутривенного (в/в) введения 2 мг/кг и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули. N=5 проб на каждый момент времени.

На фиг. 27 показана концентрация FP2 в плазме у яванских макак, в соответствии с определениями

иммунологическим методом. Значения представляют собой среднее $\pm$ CO при N=3, за исключением N=2 при в/в введении, на день 22 (через 528 ч).

в/в - внутривенно, п/к - подкожно.

На фиг. 28 показана концентрация FP2 в виде интактного димера в плазме у яванских макаков, в соответствии с определениями методом ЖХМС. Значения представляют собой среднее $\pm$ SEM при N=3, за исключением N=2 при подкожном (п/к) введении через 168 ч, N=1 при п/к введении через 120 и 432 ч, и N=1 при внутривенном (в/в) введении через 168 и 432 ч.

На фиг. 29 показана стабильность *ex vivo* FP2 в человеческой плазме (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 ч, в соответствии с определениями иммунологическим методом.

На фиг. 30 показана стабильность *ex vivo* FP2 в человеческой плазме (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 ч, в соответствии с определениями методом ЖХМС.

На фиг. 31 показаны кривые зависимости от концентрации для FP2 и гетеродимера HSA-GDF15:GDF15, полученные с помощью анализа pAKT в клетках SK-N-AS, экспрессирующих рекомбинантный человеческий рецептор GFRAL (N=3).

На фиг. 32 показано суточное потребление пищи (г) яванскими макаками перед и после введения однократной дозы FP1.

* $p < 0,05$, для группы с дозой FP1 10 мг/кг, по сравнению с носителем в контроле.

На фиг. 33 показано изменение массы тела яванских макаков в процентах перед и после введения однократной дозы FP1. * $p < 0,05$, для группы с дозой FP1 10 мг/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$, для дозы 3 мг/кг, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N = по 8 животных в группе.

На фиг. 34 показано суточное потребление пищи (г) яванскими макаками перед и после введения однократной дозы FP2.

* $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N = по 8 животных в группе.

На фиг. 35 показано изменение массы тела яванских макаков в процентах перед и после введения однократной дозы FP2. * $p < 0,05$, для группы с дозой FP2 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле, # $p < 0,05$, для дозы FP2 3 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле, & $p < 0,05$, для дозы FP2 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N = по 8 животных в группе.

Подробное описание изобретения

В разделе "Предпосылки создания изобретения" и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т.п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они полностью излагались в настоящем документе. Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Настоящее изобретение относится к гибриднему белку, содержащему (а) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (с) белок GDF15, причем гибридный белок составлен от N-конца до C-конца в порядке (a)-(b)-(с).

Оказалось, что гибридный белок в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, содержащий белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок GDF15, продлевает период полужизни белка GDF15, причем гибридные белки настоящего изобретения показывают метаболические эффекты, которые демонстрируют пригодность их применения в качестве терапевтических средств для лечения и профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний. Подобные эффекты включают, без ограничения, снижение массы тела, улучшение переносимости глюкозы и улучшение чувствительности к инсулину у животных, которым вводили гибридные белки.

Используемый в настоящем документе термин "гибридный белок" относится к белку, имеющему две или более частей, ковалентно связанных вместе, при этом каждая из частей происходит от разных белков.

Гибридные белки в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения могут включать любой белок GDF15. Используемый в настоящем документе термин "белок GDF15" относится к любому природному белку дикого типа из семейства ростового фактора дифференцировки 15 или любому его функциональному варианту. Белок GDF15 может происходить от любого млекопитающего, такого как человек или другое приемлемое млекопитающее, такое как мышь, кролик, крыса, свинья, собака или примат. В конкретных вариантах осуществления белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант. В предпочтительных вариантах осуществления белок GDF15 представляет собой зрелый белок GDF15 или его функциональный вариант.

Используемый в настоящем документе термин "зрелый белок GDF15" относится к части пре-про-белка GDF15, которая отделяется от полноразмерного белка после внутриклеточного расщепления по сайту расщепления RXXR, подобному сайту расщепления фурина. Зрелые белки GDF15 секретируются как гомодимеры, связанные через дисульфидные мостики. В одном варианте осуществления настоящего изобретения зрелый белок GDF15, кратко именуемый GDF15 (197-308) (SEQ ID NO: 6), содержит аминокислоты 197-308 из полноразмерного человеческого белка GDF15.

Используемый в настоящем документе термин "функциональный вариант" относится к варианту родительского белка, имеющему существенную или значительную степень идентичности с родительским белком и сохраняющему по меньшей мере одну из биологических активностей родительского белка. Функциональный вариант родительского белка можно приготавливать способом, известным в данной области, в контексте настоящего описания. Функциональный вариант может включать одну или более модификаций аминокислотной последовательности родительского белка. Модификации могут изменять физико-химические свойства полипептида, например, улучшать термостабильность полипептида, изменять специфичность субстрата, изменять оптимум pH и т.п. Модификации также могут изменять биологические активности родительского белка при условии, что они не уничтожают или не подавляют все биологические активности родительского белка.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения функциональный вариант родительского белка содержит замену, предпочтительно консервативную замену аминокислот родительского белка, которая не оказывает значительного влияния на биологическую активность родительского белка. Консервативные замены включают, без ограничения, замены аминокислот в пределах группы основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), кислых аминокислот (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота), полярных аминокислот (глутамин и аспарагин), гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин и валин), ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан и тирозин) и малых аминокислот (глицин, аланин, серин, треонин и метионин). Необычные или искусственные аминокислоты (такие, как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомасляная кислота, изовалин и альфа-метилсерин) также можно применять для замены стандартных аминокислотных остатков в родительском белке.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения функциональный вариант родительского белка содержит делецию и/или вставку из одной или более аминокислот в родительском белке. Например, функциональный вариант зрелого белка GDF15 может включать делецию и/или вставку из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот в зрелом белке GDF15, предпочтительно делецию от 1 до 30 аминокислот на N-конце зрелого белка GDF15.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения функциональный вариант родительского белка содержит замену, предпочтительно консервативную замену аминокислот, и делецию и/или вставку, предпочтительно малую делецию и/или вставку аминокислот, в родительском белке.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения гибридный белок изобретения содержит белок GDF15, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности зрелого белка GDF15, такой как GDF15 (197-308) (SEQ ID NO: 6); или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности зрелого белка GDF15, усеченной на N-конце, такой как GDF15 (200-308) (SEQ ID NO: 7), GDF15 (201-308) (SEQ ID NO: 8), GDF15 (202-308) (SEQ ID NO: 9), GDF15 (203-308) (SEQ ID NO: 10) или GDF15 (211-308) (SEQ ID NO: 11). Белок GDF15 может иметь по меньшей мере одну из замен, вставок и делеций в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11, при условии, что он сохраняет по меньшей мере одну из биологических активностей белка GDF15, таких как его влияние на потребление пищи, уровни глюкозы в крови, резистентность к инсулину, массу тела и т.п.

В конкретных вариантах осуществления гибридный белок настоящего изобретения содержит белок GDF15, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, включая, без ограничения, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11.

В гибридных белках в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно применять любой приемлемый белок, продлевающий период полужизни. Используемый в настоящем документе термин "белок, продлевающий период полужизни" может обозначать любой белок или его фрагмент, о котором известно, что он продлевает период полужизни белков, с которыми его соединяют.

Примеры таких белков, продлевающих период полужизни, включают, без ограничения, человеческий сывороточный альбумин (HSA), домен константной области (Fc) иммуноглобулина (Ig) или трансферрин (Tf). В вариантах осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит HSA или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит HSA или его функциональный вариант, в котором остаток цистеина в положении 34 молекулы HSA заменен серином или аланином.

В конкретных вариантах осуществления гибридный белок настоящего изобретения содержит белок, продлевающий период полужизни, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

В гибридных белках в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно применять любой приемлемый линкер. Используемый в настоящем документе термин "линкер" относится к связывающему компоненту, содержащему пептидный линкер. Предпочтительно, чтобы линкер помогал обеспечивать правильную укладку, минимизировать стерические препятствия и не нарушал существенно образом структуру каждого функционального компонента в пределах гибридного белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептидный линкер содержит 2-120 аминокислот. Например, пептидный линкер содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 или 120 аминокислот.

В вариантах осуществления настоящего изобретения линкер повышает гибкость компонентов гибридного белка. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения линкер может представлять собой гибкий линкер, содержащий последовательность (GGGS)_n, включая, без ограничения, GS-(GGGS)_n или AS-(GGGS)_n-GT, где n составляет от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения линкер структурирован. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения линкер может представлять собой структурированный линкер, содержащий последовательность (AP)_n или (EAAAK)_n, включая, без ограничения, AS-(AP)_n-GT или AS-(EAAAK)_n-GT, где n составляет от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В других вариантах осуществления настоящего изобретения линкер содержит последовательности (GGGA)_n, (PGGS)_n, (AGGS)_n или GGS-(EGKSSGSGSESKST)_n-GGS, где n составляет от 2 до 20.

В вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 и 64-75. В более конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-56, 55-56, 59-60 и 70. В дополнительных более конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 26. Гибридный белок может также включать малое удлинение (удлинения) на аминном или карбоксильном конце белка, такое как метка, упрощающая очистку, например, полигистидиновая метка, антигенный эпитоп или связывающий домен.

Описанный в настоящем документе гибридный белок можно характеризовать или оценивать по биологическим активностям GDF15, включая, без ограничения, влияние на потребление пищи, пероральные тесты на переносимость глюкозы, измерения уровней глюкозы в крови, анализ на резистентность к инсулину, изменения массы тела, фармакокинетический анализ, токсикокинетический анализ, иммунологические методы и масс-спектрометрический анализ уровня и стабильности полноразмерных гибридных белков, а также анализ стабильности *ex vivo* в плазме человеческой крови.

В настоящем изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок настоящего изобретения. В вариантах осуществления настоящего изобретения выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 и 64-75. В более конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-56, 59-60 и 70. В дополнительных более конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 76-91.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок, может представлять собой экспрессионный вектор. Экспрессионные векторы включают, без ограничения, векторы для экспрессии рекомбинантных белков и векторы для доставки нуклеиновых кислот в субъекте, для экспрессии в ткани субъекта, например, вирусные векторы. Примеры вирусных векторов, приемлемых для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, аденовирусные векторы, адено-ассоциированные вирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п. Вектор также может представлять собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, без ограничения, плазмиды, искусственные хромосомы бактерий, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т.п. Вектор может включать любые элементы для выполнения обычной функции экспрессионного вектора, например, промотор, связывающий рибосомы элемент, терминатор, усилитель, селективный маркер или точку начала репликации.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок, может иметь оптимизированные кодоны с целью улучшения рекомбинантной экспрессии от желаемой клетки-хозяина, такой как человеческая эмбриональная клетка почек (НЕК) или клетка яичника китайского хомячка (СНО), с помощью известных в данной области способов в контексте настоящего описания.

В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует гибридный белок настоящего изобретения. Клетки-хозяева включают, без ограничения, клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных белков и клетки-хозяева для доставки нуклеиновой кислоты в субъекте для экспрессии в ткани субъекта. Примеры клеток-хозяев, приемлемых для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, клетки НЕК или СНО.

В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования гибридного белка настоящего изобретения. В общем аспекте способ содержит этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок, и (2) выделяют гибридный белок, продуцированный клеткой-хозяином. Гибридный белок можно дополнительно очистить с помощью способов, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления гибридный белок экспрессируют в клетках-хозяевах и выделяют из них с помощью сочетания из одного или более стандартных методов очистки, включая, без ограничения, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ультрафильтрацию и диализ. Предпочтительно, чтобы гибридный белок был полностью очищен от любых протеаз.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении дополнительно предложена композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, могут содержать носитель для доставки, для введения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку с целью экспрессии гибридного белка. Примеры носителей для доставки нуклеиновых кислот включают липосомы, биосовместимые полимеры, включая природные полимеры и синтетические полимеры, липопротеины, полипептиды, полисахариды, липополисахариды, искусственные вирусные оболочки, металлические частицы, бактерии, вирусы, такие как бакуловирусы, аденовирусы и ретровирусы, бактериофаги, космиды, плазмиды, грибковые векторы и другие рекомбинантные носители, обычно используемые в данной области и описанные ранее для экспрессии в разных эукариотических хозяевах.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать один или более из фармацевтически приемлемого эксципиента, буферного раствора, стабилизатора, а также других материалов, известных специалистам в данной области. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, один или более из воды, солевого раствора, буферного раствора, изотонических агентов, таких как сахара, многоатомных спиртов, вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консервантов, а также их сочетания. Такие материалы должны быть нетоксичными и должны не влиять на эффективность активного ингредиента в применяемых дозах и концентрациях. Определенные свойства носителя или другого материала могут зависеть от пути введения, например, внутримышечным, подкожным, пероральным, внутривенным, кожным, интрамукозальным (например, в слизистую кишечника), интраназальным или внутрибрюшинным путем. Например, жидкие фармацевтические композиции по существу включают жидкий носитель, такой как вода, углеводороды, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также можно включать физиологический солевой раствор, раствор глюкозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в виде раствора, при этом их, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, такой как пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, выполненную с возможностью прокалывания иглой для подкожных инъекций.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения фармацевтическая компози-

ция может содержать один или более дополнительных компонентов, таких как другой активный ингредиент.

Настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим фармацевтическую композицию настоящего изобретения. Наборы могут содержать первый контейнер, в котором имеется высушенный гибридный белок настоящего изобретения, и второй контейнер, в котором имеется водный раствор, предназначенный для смешивания с высушенным гибридным белком перед введением субъекту, либо только один контейнер, содержащий жидкую фармацевтическую композицию настоящего изобретения. Набор может содержать блок введения на одну дозу фармацевтической композиции настоящего изобретения или блок введения на множество доз. Набор может также включать один или более предварительно заполненных шприцев (например, шприцев с жидкостью и шприцев с лиофилизатом). Набор может также содержать инструкцию по его применению. Такая инструкция может описывать применение и свойства материалов, предоставленных в наборе, и ее можно составлять в соответствии с конкретным метаболическим расстройством, подлежащим лечению.

Настоящее изобретение также относится к применению описанных в настоящем документе фармацевтических композиций для лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния, такого как диабет 2-го типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемия, диабетическая нефропатия, ишемическое поражение миокарда, застойная сердечная недостаточность или ревматоидный артрит. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения способ лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния содержит введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции настоящего изобретения. Любые из описанных в настоящем документе фармацевтических композиций можно применять в способе настоящего изобретения, включая фармацевтические композиции, содержащие гибридный белок настоящего изобретения, или фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую гибридный белок.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" означает любое животное, конкретно млекопитающее, наиболее конкретно человека, которое будет или было подвергнуто лечению способом в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Используемый в настоящем документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов, кроме человека (NHP), таких как низшие и высшие обезьяны, и т.п., и более конкретно, человека.

"Метаболическое заболевание, расстройство или состояние" означают любое расстройство, связанное с аномальным метаболизмом. Примеры метаболических заболеваний, расстройств или состояний, которые можно лечить в соответствии со способом настоящего изобретения, включают, без ограничения, диабет 2-го типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемию, диабетическую нефропатию, ишемическое поражение миокарда, застойную сердечную недостаточность или ревматоидный артрит.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "лечение" относятся к введению композиции субъекту для достижения желаемого терапевтического или клинического исхода у субъекта. В одном варианте осуществления термины "лечить", "лечение" относятся к введению фармацевтической композиции настоящего изобретения для снижения, ослабления или замедления прогрессии или развития метаболического расстройства, такого как диабет 2-го типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемия, диабетическая нефропатия, ишемическое поражение миокарда, застойная сердечная недостаточность или ревматоидный артрит.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество терапевтически активного соединения, необходимого для получения желаемого биологического или клинического эффекта. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для обеспечения положительных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Терапевтически эффективное количество можно вводить за одну или более процедур введения. Применительно к болезненному состоянию, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для облегчения, стабилизации или задержки развития заболевания. В соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения терапевтически эффективное количество представляет собой количество гибридного белка, необходимое для лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния, такого как диабет 2-го типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемия, диабетическая нефропатия, ишемическое поражение миокарда, застойная сердечная недостаточность или ревматоидный артрит.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно вводить субъекту любым способом, известным специалистам в данной области в контексте настоящего описания, например, с применением внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, интрамукозального (например, в слизистую кишечника), интраназального или внутрибрюшинного пути введения.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтическую композицию настоящего изобретения вводят субъекту путем внутривенной инъекции или подкожной инъекции.

Такие параметры, как величина дозы, частота введения и продолжительность введения фармацевтической композиции субъекту в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, не ограничены каким-либо конкретным образом. Оптимальные значения таких параметров могут зависеть от различных факторов, таких как особенности субъекта, подлежащего лечению, конкретное метаболическое заболевание, подлежащее лечению, степень тяжести заболевания, путь введения и т.п., при этом специалист в данной области сможет определить оптимальные значения для таких параметров с целью достижения желаемого терапевтического или клинического исхода. Например, фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или более одного раза в день, например, два раза, три раза, четыре раза и т. п. Обычная доза гибридного белка может варьировать в интервале от около 0,1 мг/кг до около 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, таких как перечислены выше.

Варианты осуществления

Вариант осуществления 1 представляет собой гибридный белок, содержащий: (a) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (c) белок GDF15; причем гибридный белок составлен от N-конца до C-конца в порядке (a)-(b)-(c).

Вариант осуществления 2 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 1, в котором белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант.

Вариант осуществления 3 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 1, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-11.

Вариант осуществления 4 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 1, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления 5 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 4, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-11.

Вариант осуществления 6 представляет собой гибридный белок любого из вариантов осуществления 1-5, в котором белок, продлевающий период полужизни, содержит человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его функциональный вариант.

Вариант осуществления 7 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 6, в котором белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

Вариант осуществления 8 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 7, в котором белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

Вариант осуществления 9 представляет собой гибридный белок любого из вариантов осуществления 1-8, в котором линкер представляет собой гибкий линкер.

Вариант осуществления 10 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 9, в котором линкер содержит последовательность (GGGGS)_n, где n составляет от 2 до 20, например GS-(GGGGS)_{x8} или AS-(GGGGS)_{x8}-GT.

Вариант осуществления 11 представляет собой гибридный белок любого из вариантов осуществления 1-9, в котором линкер представляет собой структурированный линкер.

Вариант осуществления 12 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 11, в котором линкер содержит последовательность (AP)_n или (EAAAK)_n, где n составляет от 2 до 20, например AS-(AP)_n-GT или AS-(EAAAK)_n-GT.

Вариант осуществления 13 представляет собой гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-60 или 64-75.

Вариант осуществления 14 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 13, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-60 и 64-75.

Вариант осуществления 15 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 14, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70.

Вариант осуществления 16 представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок любого одного из вариантов осуществления 1-15.

Вариант осуществления 17 представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 76-91.

Вариант осуществления 18 представляет собой экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты варианта осуществления 16 или 17.

Вариант осуществления 19 представляет собой клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты варианта осуществления 16 или 17.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ продуцирования гибридного белка любого одного из вариантов осуществления 1-15, содержащий этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок; и (2) выделяют гибридный белок, продуцированный клеткой-хозяином.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ варианта осуществления 20, в котором стадия выделения содержит очистку гибридного белка с удалением протеаз.

Вариант осуществления 22 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество гибридного белка любого одного из вариантов осуществления 1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 23 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих гибридный белок любого одного из вариантов осуществления 1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 24 представляет собой набор, содержащий фармацевтическую композицию варианта осуществления 22 или 23.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ лечения или профилактики метаболического расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции любого из вариантов осуществления 22 и 23.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ варианта осуществления 25, в котором метаболическое расстройство выбрано из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ варианта осуществления 25 или 26, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно или внутривенно.

Вариант осуществления 28 представляет собой способ лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом способ включает подкожное или внутривенное введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 29 представляет собой способ лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 30 представляет собой способ любого одного из вариантов осуществления 25-29, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

Вариант осуществления 31 представляет собой гибридный белок любого одного из вариантов осуществления 1-15 для применения при лечении или профилактике метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита.

Примеры

Для дополнительной иллюстрации характера настоящего изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие ниже примеры не ограничивают изобретение, и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Пример 1. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15 - влияние усечений GDF15.

Подобно другим членам семейства TGF β , белок GDF15 синтезируется как пре-про-белок, который образует димер в эндоплазматическом ретикулуме и подвергается фуриновому расщеплению с продуцированием секретируемого зрелого GDF15 (аминокислоты 197-308). Секретируемый зрелый гомодимер GDF15 имеет массу около 25 кДа, и каждый мономер способен образовывать до 4 внутримолекулярных дисульфидных связей с одним межмолекулярным дисульфидом, связывающим компоненты гомодимера.

Кристаллическая структура GDF15 определена в настоящем изобретении и показана на фиг. 1A и 1B. Из кристаллической структуры видно, что С-конец зрелого GDF15 скрыт на границе раздела димеров, в то время как N-конец остается открытым. Этот открытый конец позволяет связывать гибридные белки, такие как белки, продлевающие период полужизни, с N-концом GDF15.

В кристаллической структуре также виден новый узор дисульфидных мостиков между цистеино-

выми остатками GDF15. В то время как TGFβ1 имеет мостики C1-C3 и C2-C7 (т.е. мостики между его первым и третьим цистеиновыми остатками, а также между его вторым и седьмым цистеиновыми остатками), GDF15 имеет мостики C1-C2 и C3-C7 (см. фиг. 1А и 1В). Эти уникальные дисульфидные мостики приводят к замыканию петли, образованной мостиком C1-C2, который расположен на N-конце белка и на удалении от цистеинового узла, который содержит другие дисульфидные связи. Исходя из структуры, можно предположить, что N-конец GDF15 может не быть критическим для образования димера или общего складывания белка, и что GDF15 и присоединенные молекулы на его N-конце могут быть толерантны к делециям на N-конце, которые удаляют остатки C1 и C2, остатки внутри петли C1-C2 и даже остатки на C-конце, связанные с C2.

Пример 2. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15 - влияние линкера.

Были оценены различные линкеры между молекулой HSA и молекулой GDF15. Оценке подвергались как гибкие линкеры, содержащие последовательность (GGGGS)_n, так и структурированные линкеры, содержащие последовательность (AP)_n или (EAAAK)_n, где n составляет 2-20.

Гибридные белки, содержащие различные линкеры, сравнивали по их биофизическим свойствам, их влиянию на эффективность потребления пищи тощими мышами, их фармакокинетическим (ФК) параметрам у мышей, и их стабильности *ex vivo* в человеческой крови. Результаты испытаний вариантов линкеров показаны в табл. 1. Молекула, содержащая SEQ ID NO: 31, которая содержала линкер (EAAAK)₈, по данным ВЭЖХ образовывала агрегаты. Оставшиеся семь вариантов линкеров по табл. 1 не образовывали агрегатов.

Таблица 1
Обобщенные данные анализа вариантов линкеров

SEQ ID NO*	Линкер	Агрегация	Хорошие фармакокинетические (ФК) параметры у мышей (WT)	Стабильность <i>ex vivo</i> в человеческой крови
25	AS (GGGGS) ₂ GT	Нет	Да	Да
5	GS (GGGGS) ₄	Нет	Да	Да
26	AS (GGGGS) ₈ GT	Нет	Да	Да
27	AS (AP) ₅ GT	Нет	Да	Да
28	AS (AP) ₁₀ GT	Нет	Да	Да
29	AS (AP) ₂₀ GT	Нет	Да	Да
30	AS (EAAAK) ₄ GT	Нет	Да	Да
31	AS (EAAAK) ₈ GT	ДА	Не исследован	Не исследован

* На N-конец была присоединена метка 6xHis для целей очистки.

Для этих вариантов также оценивалась стабильность линкеров по исследованиям *in vivo* у мышей, а также по исследованиям стабильности *ex vivo* в пробах человеческой цельной крови и плазмы. В анализе результатов, полученных в этих исследованиях, применяли две формы обнаружения. Оценку интактности линкера проводили методом иммуноанализа с парами антител, анти-GDF15 для захвата и анти-HSA для обнаружения, причем определяли наличие обеих молекул с какой-либо из сторон линкера. Более широкую картину целостности всей молекулы анализировали методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХМС) с использованием различных суррогатных пептидных последовательностей из HSA и GDF15. Иммуноанализ показал стабильный ФК профиль для всех вариантов линкеров и отсутствие потери концентрации в пробах плазмы с добавками для любого из вариантов линкеров по результатам наблюдения в течение 48 ч. Результаты ЖХМС согласовывались с результатами иммуноанализа, подтверждая, что суррогатные пептиды из различных участков молекул HSA и GDF15 были интактными. ФК профиль вариантов линкеров, подвергнутых анализу методом ЖХМС с использованием суррогатных пептидов, показал аналогичные тенденции для различных вариантов линкеров, причем все они на 7-й день имели обнаруживаемые уровни. Все варианты, приведенные в табл. 1, за исключением SEQ ID 31, имели желаемые биофизические свойства и ФК параметры.

Варианты линкеров оценивали по их активности *in vivo* путем проведения исследований употребле-

ния пищи тощими мышами. В табл. 2 показано влияние вариантов линкеров на эффективность гибридного белка в отношении снижения потребления пищи. Показано явное влияние линкера на указанную эффективность. Что касается гибких линкеров (GGGS)_n, увеличение длины линкера от 2 до 4-8 привело к существенному увеличению эффективности гибридного белка. Для более ригидных линкеров (AP)_n эта тенденция была менее очевидной, подтверждая, что решающую роль в эффективности гибридного белка играет степень свободы молекулы GDF15.

Таблица 2

Влияние линкера на эффективность *in vivo* гибридных белков HSA-GDF15 у тощих мышей

SEQ ID NO*	Линкер	Снижение потребления пищи, % (среднее)
25	AS (GGGS) ₂ GT	28,8
5	GS (GGGS) ₄	40,5
26	AS (GGGS) ₈ GT	60,7
27	AS (AP) ₅ GT	48,2
28	AS (AP) ₁₀ GT	66,2
29	AS (AP) ₂₀ GT	55,1
30	AS (EAAAK) ₄ GT	51,9

* На N-конец была присоединена метка 6xHis для целей очистки.

Пример 3. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15 - влияние мутаций HSA.

Были составлены рекомбинантные белки, состоящие из белка, продлевающего период полужизни, человеческого сывороточного альбумина, присоединенного к N-концу GDF15 посредством линкер. Такая конфигурация будет обеспечивать целостность интерфейса димеризации GDF15 и допускать соединение через нативные межцепочечные дисульфидные мостики, приводя к образованию гомодимера GDF15, в котором из каждого плеча GDF15 выдвинут слитый с ним HSA. При таком подходе для создания гомодимера HSA-GDF15 требуется только один ген.

Нативный человеческий сывороточный альбумин содержит 35 цистеиновых (Cys, C) остатков, которые образуют 17 дисульфидных мостиков, при этом остаток Cys-34 является единственным свободным цистеином в молекуле. Было показано, что этот свободный остаток Cys-34 функционирует как акцептор свободных радикалов, улавливая множество активных форм кислорода (ROS) и активных форм азота (RNS). Поэтому свободный остаток Cys заменили так, чтобы минимизировать риск гетерогенности в результате окисления.

Свободный цистеин в положении 34 HSA заменили на серин либо аланин, и анализировали гибридные молекулы GDF15 с мутацией HSA (C34S) или HSA (C34A). Обе молекулы очищали с применением трехэтапного способа очистки: (i) ионообменная хроматография, (ii) гидрофобная хроматография и (iii) эксклюзионная хроматография. Сразу же после создания этих молекул анализ ВЭЖХ показал, что обе молекулы были чистыми и не содержали агрегатов (табл. 3).

Однако через две недели после создания гибридного белка с мутацией HSA (C34A) (содержащего SEQ ID NO: 48), анализ ВЭЖХ показал наличие в нем агрегатов, тогда как гибридный белок с мутацией HSA (C34S) (содержащий SEQ ID NO: 40) и через четыре недели не содержал агрегатов.

Таблица 3

Влияние мутации HSA C34 на агрегацию гибридного белка

SEQ ID NO	Мутация HSA	% агрегации сразу после очистки	% агрегации через 2 недели после очистки
40	C34S	0	0
48	C34A	0	33,29

Пример 4. Предрасположение к расщеплению протеазами в GDF15.

Авторы изобретения наблюдали, что остаток аргинина в положении аминокислоты 198 GDF15 (R198) предрасположен к расщеплению протеазами в гибридных молекулах HSA-GDF15. Такое расщепление приводит к образованию гетерогенной популяции и нежелательно для терапевтических композиций. Это расщепление можно предотвратить с помощью смеси ингибиторов протеаз. Были проведены исследования способов очистки для удаления протеазы. В табл. 4 перечислены два типа колонок для проведения аффинной хроматографии HSA, которые испытывались для очистки гибридных белков HSA-GDF15, с определением методом ВЭЖХ. Сразу после очистки гибридные белки HSA-GDF15, очищенные обоими способами, были на 100% чистыми и интактными. При низких концентрациях (2-5 мг/мл) белки, очищенные обоими способами, оставались интактными в течение всего периода испытания 4 недели. Однако при высоких концентрациях (40-50 мг/мл) только смола с антителами к HSA (CaptureSelect) очищала от протеазы белки, которые затем оставались интактными в течение всего периода испытания 4

недели. Смола с лигандами HSA (Albupure) очищала белки, которые вначале были интактными, но затем во время хранения в высоких концентрациях подвергались расщеплению. Добавление смеси ингибиторов протеаз (PI) и ЭДТА полностью подавляло расщепление партии гибридного белка HSA-GDF15 в высокой концентрации, очищенной с помощью смолы Albupure. Таким образом, способ очистки играет решающую роль в создании стабильной терапевтической композиции. Соответствующая деградация не наблюдалась *in vivo* или *ex vivo*, подтверждая, что после очистки терапевтической композиции от протеазы расщепление гибридных белков не является проблемой *in vivo*. Таким образом, способы очистки, позволяющие эффективно удалять возможные молекулы протеазы во время приготовления, например применение смолы CaptureSelect, играют ключевую роль в успешном производстве терапевтических препаратов GDF15, которые являются гомогенными, интактными и стабильными.

Таблица 4

Расщепление гибридных белков HSA-GDF15 протеазами можно предотвратить с помощью способов очистки проб

Условия			% расщепления в популяции HSA-GDF15 (SEQ ID NO: 60)				
Концентрация	Смола	+ PI/ЭДТА	НЕДЕЛЯ 0	НЕДЕЛЯ 1	НЕДЕЛЯ 2	НЕДЕЛЯ 3	НЕДЕЛЯ 4
Низкая	Capture Select	Нет	0	0	0	0	0
Низкая	Albupure	Нет	0	0	0	0	0
Высокая	Capture Select	Нет	0	0	0	0	0
Высокая	Albupure	Нет	0	3,04	9,47	11,57	13,89
Высокая	Capture Select	Да	0	0	0	0	0
Высокая	Albupure	Да	0	0	0	0	0

Пример 5. Варианты GDF15 с N-концевыми делециями.

Кристаллическая структура GDF15, показанная на фиг. 1A и 1B, позволяет предположить, что N-конец GDF15, затронутый в вариантах делеции, не является критическим для образования димера или общего складывания белка. Это также позволяет предположить, что такие N-концевые делеции не повлияют на взаимодействие с возможными рецепторами. Гибридные белки HSA-GDF15, содержащие различные делеции N-конца GDF15, были испытаны на активность *in vivo*.

Были запланированы варианты N-концевых делеций GDF15, которые удаляли сайт расщепления протеазами в GDF15 (R198). Непосредственно за остатком R198, у остатков N199-G200 имеется потенциальный сайт дезамидирования, а дезамидирование субстрата тоже нежелательно в терапевтических композициях. N-концевые делеции GDF15 могут одновременно удалить и сайт протеолитического расщепления, и сайты дезамидирования. Полученные в результате варианты делеций GDF15, которые были встроены в гибридные белки с HSA, включали GDF15 (201-308; SEQ ID NO: 8), GDF15 (202-308; SEQ ID NO: 9) и GDF15 (211-308; SEQ ID NO: 11). Исследования *in vivo* у мышей показали, что варианты GDF15 с N-концевыми делециями по-прежнему активно влияют на снижение потребления пищи (фиг. 17). Экспериментальные данные подтвердили, что такие варианты GDF15 с N-концевыми делециями правильно экспрессируются, образуют надлежащие димеры и активны *in vivo*.

Пример 6. Неактивные мутанты GDF15.

В табл. 5 перечислены двенадцать мутантов GDF15, которые были созданы для подавления активности GDF15 *in vivo* и определения функционального эпитопа GDF15. Эти мутанты включают пять точечных мутантов, два двойных мутанта и пять тройных мутантов. Гибридные белки HSA-GDF15, содержащие эти мутации, были характеризованы по их биофизическим свойствам и активности (табл. 5). Из 12 мутантов один не экспрессировался, а четыре со временем образовывали агрегаты, указывая на то, что эти мутации нарушают складывание белков и их биофизические свойства. Четыре из оставшихся семи мутантов содержали точечную мутацию GDF15, и эти мутанты испытывали на мышах на предмет снижения потребления пищи по сравнению с диким типом. Три из этих точечных мутантов (I89R, I89W и W32A) утратили активность *in vivo*, а один мутант (Q60W) остался таким же активным, как дикий тип. Эти результаты показывают, что мутация I89R, I89W или W32A прерывает взаимодействие рецептора/корцептора с GDF15, подтверждая, что функциональные эпитопы GDF15 находятся возле остатков I89 и W32. Мутации пронумерованы на основе зрелого GDF15, вставленного в гибридный белок, т.е. "1" относится к 1-й аминокислоте зрелого GDF15 (SEQ ID NO: 6), а "89" относится к 89-й аминокислоте зрелого белка GDF15.

Таблица 5
Обобщенные данные биофизических свойств и активности гибридных белков, содержащих мутанты GDF15

SEQ ID NO	Мутации в GDF15	Биофизические свойства	Активность
5	Дикий тип	Хорошо экспрессируется, стабильный	Активность дикого типа
64	I89R	Хорошо экспрессируется, стабильный	Полная потеря активности
65	I89W	Хорошо экспрессируется, стабильный	Полная потеря активности
66	L34A, S35A, R37A	Хорошо экспрессируется, стабильный	
67	V87A, I89A, L98A	Хорошо экспрессируется, нестабильный	
68	L34A, S35A, I89A	Хорошо экспрессируется, стабильный	
69	V87A, I89A	Хорошо экспрессируется, стабильный	
70	Q60W	Хорошо экспрессируется, стабильный	Такой же активный, как дикий тип
71	W32A	Хорошо экспрессируется, стабильный	Полная потеря активности
72	W29A	Хорошо экспрессируется, нестабильный	
73	Q60A, S64A, R67A	Хорошо экспрессируется, нестабильный	
74	W29A, Q60A, I61A	Не экспрессируется	
75	W29A, W32A	Хорошо экспрессируется, нестабильный	

* На N-конец была присоединена метка 6x His для целей очистки.

Пример 7. Экспрессия и способы очистки.

Экспрессия.

Для экспрессии 20 мл и больше, экспрессию проводили в клетках НЕК Expi293™, выращенных в среде экспрессии Expi293™. Клетки выращивали при температуре 37°C, при встряхивании со скоростью 125 об/мин, в среде с 8% CO₂. Клетки трансфицировали с плотностью 2,5×10⁶ клеток/мл, с использованием набора экспрессии Expi293™. На каждый литр трансфицированных клеток, 1 мг тотальной ДНК разводили в 25 мл Opti-MEM, и 2,6 мл реагента Expi293™ разводили в 25 мл Opti-MEM, и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Разведенную ДНК и разведенный реагент Expi293 объединяли и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем комплекс ДНК добавляли к клеткам. Клетки помещали на ночь во встряхиватель-инкубатор. На следующий день после трансфекции, 5 мл реагента Enhancer 1 из набора разводили в 50 мл реагента Enhancer 2 из набора, и весь объем из двух реагентов Enhancer добавляли к клеткам. Трансфицированные клетки помещали обратно в инкубатор на 4 дня до их отбора. Клетки концентрировали центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин, а затем фильтровали через фильтр с ячейкой 0,2 мкм перед этапом очистки.

Экспрессию также проводили в клетках CHO. Плазмиду подвергали очистке и анализу. Перед трансфекцией 1 аликвоту в 200 мкг плазмидной ДНК, содержащей кодирующую область HSA-GDF15, линеаризовали путем расщепления рестрикционным ферментом Acl I. Расщепление данной рестрикционной эндонуклеазой обеспечивает удаление гена резистентности к ампициллину. Две линеаризованные аликвоты по 15 мкг ДНК трансфицировали в двух порциях по 1×10⁷ клеток CHO (обозначены как пулы трансфекции А и В) с помощью электроманипулятора клеток BTX ECM 830 Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus, г. Холлистон, штат Массачусетс, США). Клетки подвергали 3-кратной электропорации под напряжением 250 вольт с длительностью импульсов 15 миллисекунд и интервалами между импульсами 5 секунд, в кювете с шириной зазора 4 мм. Трансфицированные клетки переносили во встряхи-

ваемую колбу, содержащую MACH-1+L-глутамин, и инкубировали в течение 1 суток. Пул трансфекции А и пул трансфекции В центрифугировали, ресуспендировали в среде MACH-1+MSX и переносили во встряхиваемые колбы для инкубации в течение 6 суток. Трансфицированные клетки, продуцирующие HSA-гибридный белок, из пула трансфекции А и пула трансфекции В объединяли и высевали в метилцеллюлозу на 8-й день после электропорации.

Очистка.

Проводили двухэтапную очистку с применением смолы CaptureSelect и эксклюзионной хроматографии. Супернатанты над клетками от временно трансфицированных клеток Expi293™ загружали в предварительно уравновешенную (PBS, pH 7,2) колонку со смолой CaptureSelect для связывания HSA (Матрица аффинности к человеческому альбумину CaptureSelect от компании ThermoFisher Scientific) при приблизительной емкости 10 мг белка на 1 мл смолы. После загрузки несвязанные белки удаляли путем промывания колонки PBS с pH 7,2 в количестве 10 объемов колонки (CV). HSA-GDF15, который был связан в колонке, элюировали 10 объемами CV раствора 2 М MgCl₂ в 20 мМ трис, pH 7,0. Соответствующие пикам фракции отбирали, фильтровали (0,2 мкм) и диализировали против PBS с pH 7,2 при температуре 4°C. После диализа белок повторно фильтровали (0,2 мкм) и концентрировали до подходящего объема перед загрузкой на колонку 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Фракции белка, элюированные из колонки эксклюзионной хроматографии (SEC) с высокой степенью чистоты (по определению методом SDS-PAGE), объединяли. Концентрацию белка определяли по поглощению света 280 нм на спектрофотометре BioTek Synergy HTTM. Качество очищенных белков оценивали методом SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC, система Dionex HPLC). Уровни эндотоксина измеряли методом LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

Также проводили двухэтапную очистку с применением смолы AlbuPure и эксклюзионной хроматографии. Гибридные белки HSA-GDF15 очищали при комнатной температуре с применением смолы AlbuPure (ProMetic BioSciences Ltd), в которой использован иммобилизованный синтетический триазиновый лиганд для селективного связывания HSA. К смоле AlbuPure добавляли супернатанты с экспрессией. Затем смолу промывали, сначала 4 объемами CV PBS с pH 7,2, а затем 4 объемами CV буферного раствора 50 мМ трис с pH 8,0, 150 мМ NaCl. HSA-GDF15, который был связан в колонке, элюировали 4 объемами CV PBS с pH 7,2, содержащего 100 мМ октаноата натрия. Фракции, содержащие белок, концентрировали до объема 10 мл с помощью концентратора-центрифуги с отсечением по молекулярной массе 30 000 кДа (Amicon), а затем пропускали через колонку 26/60 Superdex S200pg (GE), уравновешенную PBS с pH 7,2. Фракции после эксклюзионной хроматографии, содержащие гомодимер HSA-GDF15, идентифицировали методом SDS-PAGE и объединяли для анализа. Степень чистоты белка оценивали методом SDS-PAGE и SE-HPLC.

Примеры 8-14 и 19 включают характеристику примера гибридного белка настоящего изобретения, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. Этот гибридный белок представляет собой полностью рекомбинантный белок, который существует в виде гомодимерного гибрида HSA и зрелого человеческого GDF15, соединенных линкером, содержащим 42 аминокислоты и состоящим из глициновых и сериновых остатков, GS-(GGGGS)₈. Расчетная молекулярная масса этого гибридного белка составляет 162 696 дальтон, а единственный нативный свободный цистеин в положении 34 HSA был заменен серином. Далее в примерах этот конкретный гибридный белок HSA-GDF15 для простоты будет именоваться просто "FP1". Вариант FP1 с меткой 6x His (6xHis-FP1, SEQ ID NO: 26), содержащий линкер AS-(GGGGS)₈-GT, использовали для сравнения в некоторых из приведенных ниже примеров.

Пример 8. Влияние FP1 на потребление пищи мышами линии C57BL/6.

Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать зависимое от дозы воздействие FP1 на ингибирование потребления пищи мышами линии C57BL/6.

Самцы мышей линии C57BL/6 в течение минимум 72 ч проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ. Затем мышам на основании потребления пищи в предыдущие 24 ч разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композицию, содержащую FP1, путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 ч после инъекций. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6xHis-FP1.

Результаты (фиг. 2 и табл. 6) представлены как среднее значение суммарного потребления пищи для заданного промежутка времени. Результаты показали, что подкожное введение FP1 мышам линии C57BL/6 существенно ингибировало потребление пищи по сравнению с животными, получавшими носитель, при всех дозах и во все моменты времени в ходе испытания. Введение 6xHis-FP1 вызывало снижение потребления пищи при дозе 8 нмоль/кг.

Таблица 6

Влияние подкожного введения FP1 на потребление пищи мышами линии C57BL/6; показано суммарное потребление пищи за 12, 24 и 48 часов после введения

Суммарное потребление пищи (г)			
Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,1	8,4 ± 0,3
FP1, 1 нмоль/кг	2,9 ± 0,1*	3,4 ± 0,2**	7,0 ± 0,3**
FP1, 4 нмоль/кг	2,3 ± 0,2****	3,1 ± 0,1****	6,6 ± 0,3****
FP1, 8 нмоль/кг	2,1 ± 0,2****	3,2 ± 0,1***	6,4 ± 0,2****
FP1, 16 нмоль/кг	1,7 ± 0,2****	2,7 ± 0,2****	6,2 ± 0,3****
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	1,8 ± 0,2****	2,6 ± 0,2****	6,0 ± 0,2****

Данные представлены как среднее ±SEM.

* p<0,05, по сравнению с PBS; ** p<0,01, по сравнению с PBS; *** p<0,001, по сравнению с PBS; **** p<0,0001, по сравнению с PBS.

Однофакторный дисперсионный анализ и критерий Тьюки для множественных сравнений; n=8 на группу.

Пример 9. Влияние FP1 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули.

Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать зависимость от дозы воздействия FP1 на ингибирование потребления пищи у крыс линии Спрег-Доули.

Самцы крыс линии Спрег-Доули в течение минимум 72 ч проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ. Затем крыс на основании потребления пищи в предыдущие 24 ч разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композицию, содержащую гибридный белок, путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 ч после инъекций. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6xHis-FP1.

Результаты представлены на фиг. 3 и в табл. 7. Подкожное введение FP1 в дозах 2,5 нмоль/кг и 10 нмоль/кг ингибировало потребление пищи по сравнению с животными, получавшими носитель. Ингибирование достигало статистической значимости только при самой высокой испытанной дозе (10 нмоль/кг) через 24 и 48 ч после введения. Введение FP1 вызывало снижение потребления пищи при дозе 8 нмоль/кг, и этот эффект был значимым через 24 и 48 ч.

Таблица 7

Влияние подкожного введения FP1 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули; показано суммарное потребление пищи за 12, 24 и 48 ч после введения

Суммарное потребление пищи (г)			
Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	20,6 ± 1,3	25,3 ± 1,3	49,1 ± 2,1
FP1, 0,1 нмоль/кг	23,3 ± 1,4	26,9 ± 0,8	52,8 ± 1,3
FP1, 0,5 нмоль/кг	22,6 ± 1,7	25,1 ± 1,0	48,3 ± 1,8
FP1, 2,5 нмоль/кг	20,0 ± 1,4	22,0 ± 1,0	44,6 ± 1,4
FP1, 10 нмоль/кг	18,7 ± 0,9	19,9 ± 1,0*	39,9 ± 2,3*
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	17,0 ± 1,5	18,8 ± 1,4**	38,4 ± 2,5**

Данные представлены как среднее ±SEM.

* p<0,05, по сравнению с PBS; ** p<0,01, по сравнению с PBS.

Однофакторный дисперсионный анализ и критерий Тьюки для множественных сравнений; n=8 на группу.

Пример 10. Влияние FP1 на гомеостаз глюкозы и массу тела у мышей с алиментарным ожирением (DIO).

Цель настоящего эксперимента состояла в оценке влияния FP1 на потребление пищи, массу тела и гомеостаз глюкозы в течение двух недель введения у мышей DIO линии C57BL/6.

Самцов мышей DIO взвешивали и подкожно вводили им дозы FP1 2 мл/кг каждые три дня (q3d) в

день 0, 3, 6, 9 и 12. Группам, получавшим носитель и розиглитазон, вводили PBS по аналогичной схеме. Животным контрольной группы розиглитазон добавляли в корм в количестве 0,015%, доступ к корму не ограничивали. Массы тела мышей и пищи регистрировали ежедневно. Уровни глюкозы измеряли с помощью глюкометра (One Touch® Ultra®, Lifescan, г. Милпитас, штат Калифорния, США). Массу жировой и нежировой ткани у мышей, находящихся в сознании, количественно измеряли методом ЯМР с разрешением по времени (TD-NMR), с помощью прибора Bruker Mini-Spec LF110. Пероральный тест на переносимость глюкозы (OGTT) у мышей проводили после 4 ч голодания. Глюкозу в крови измеряли через надрез на хвосте через 0, 30, 60, 90 и 120 мин после введения через желудочный зонд 2 г/кг глюкозы, 10 мл/кг. Инсулин измеряли через 0, 30 и 90 мин после введения глюкозы.

В конце исследования мышей умерщвляли посредством ингаляции CO₂ и отбирали посмертную пробу крови. Сыворотку помещали в планшет на 96 лунок на влажный лед, а затем хранили при температуре -80°C. Извлекали печень и оценивали содержание жира по отношению к общей массе на срезах печени методом TD-NMR на приборе Bruker MiniSpec mq60, в соответствии с инструкцией производителя.

Рассчитывали оценку резистентности к инсулину натощак по гомеостатической модели (HOMA-IR) на основании произведения глюкозы натощак (в мг/дл) и инсулина (в мЕд/л), деленного на коэффициент 405.

Введение мышам DIO FP1 по схеме q3d в дозах 1 нмоль/кг и 10 нмоль/кг приводило к снижению массы тела (табл. 8) и потребления пищи (табл. 9). Указанные снижения достигали статистической значимости только в определенные моменты времени, как описано ниже.

FP1 вызывал снижение массы тела при дозах 1 (со 2-го до 14-го дня) и 10 нмоль/кг (с 1-го до 14-го дня) у мышей DIO (табл. 8 и фиг. 4). Значительное снижение потребления пищи наблюдали в 1-й и 2-й дни исследования при дозе 1 нмоль/кг и в 1, 8 и 9-й дни при дозе 10 нмоль/кг (табл. 9).

Таблица 8

Изменение массы тела (% от начальной) во время введения FP1 у мышей DIO

Введение День	Носитель Н/П	FP1 (нмоль/кг)			Розиглитазон 10 мг/кг в день
		0,1	1	10	
-2	0,1 ± 0,2	-0,1 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2
-1	-0,8 ± 0,3	-0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,3	-0,3 ± 0,4	-0,9 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,1 ± 0,2	-0,1 ± 0,4	-1,5 ± 0,5	-2,8 ± 0,4*	1,9 ± 0,2
2	0,0 ± 0,3	-0,8 ± 0,5	-3,2 ± 0,4*	-3,1 ± 0,5*	2,2 ± 0,5
3	-0,2 ± 0,4	-0,4 ± 0,4	-3,2 ± 0,6*	-4,0 ± 0,7*	2,6 ± 0,5
4	-0,4 ± 0,5	-0,7 ± 0,5	-3,8 ± 0,6*	-4,4 ± 0,8*	3,0 ± 0,5*
5	-0,5 ± 0,4	-1,0 ± 0,3	-4,0 ± 0,5*	-4,6 ± 0,9*	3,8 ± 0,6*
6	-0,4 ± 0,6	-0,5 ± 0,5	-3,8 ± 0,4*	-5,6 ± 0,9*	4,0 ± 0,7*
7	-0,3 ± 0,5	-0,5 ± 0,5	-4,3 ± 0,6*	-6,1 ± 0,9*	5,5 ± 0,8*
8	-0,6 ± 0,5	-0,5 ± 0,5	-4,2 ± 0,6*	-6,7 ± 1,1*	6,1 ± 0,9*
9	-0,4 ± 0,5	-0,2 ± 0,5	-4,5 ± 0,6*	-7,2 ± 1,2*	7,0 ± 1,0*

10	-0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	-4,4 ± 0,8*	-7,8 ± 1,2*	7,8 ± 1,1*
11	-0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,4	-4,4 ± 0,8*	-7,9 ± 1,4*	8,2 ± 1,2*
12	-0,8 ± 0,6	0,8 ± 0,5	-4,3 ± 1,0*	-7,9 ± 1,5*	8,5 ± 1,2*
13	-0,8 ± 0,6	0,5 ± 0,5	-3,9 ± 0,9*	-8,7 ± 1,6*	8,6 ± 1,3*
14	-1,7 ± 0,6	-0,4 ± 0,5	-4,6 ± 1,0*	-9,0 ± 1,7*	7,6 ± 1,3*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Таблица 9

Суточное потребление пищи (г) во время введения FP1 у мышей DIO

Введение День	Носитель Н/П	FP1 (нмоль/кг)			Розиглитазон 10 мг/кг в день
		0,1	1	10	
-2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
0	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1
1	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2*	1,5 ± 0,1*	3,6 ± 0,1*
2	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1*	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,2*
3	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1*
4	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1*
5	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,7 ± 0,2*
6	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2*
7	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,8 ± 0,2*
8	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*
9	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2*	4,3 ± 0,2*
10	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1*
11	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,1*
12	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2*
13	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

По данным теста OGTT, выполненного на 14-й день исследования, FP1 существенно снижал уровни глюкозы по сравнению с животными, получавшими носитель, во все моменты времени после времени 0 и при всех трех дозах, применявшихся в испытании (табл. 10). Этот показатель дополнительно количественно определяли как полную площадь под кривой (AUC) и дельта AUC, которые были значительно меньше, по сравнению с животными, получавшими носитель, при всех трех дозах, применявшихся в испытании (табл. 10 и фиг. 5A и 5B).

Таблица 10

Уровни глюкозы в крови (мг/дл) по данным теста OGTT, проведенного через четырнадцать дней, в которые мышам DIO вводили FP1 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)					Полная AUC (мг/дл/ 120 мин)	Дельта AUC (мг/дл/ 120 мин)
		0	30	60	90	120		
Носитель	Н/П	209,6 ± 16,5	399,4 ± 46,4	338,5 ± 46,3	297,5 ± 38,0	269,3 ± 36,6	38 244,4 ± 4308,2	13 089,4 ± 3573,0
FP1	0,1	196,6 ± 7,6	319,0 ± 21,5*	241,6 ± 14,4*	196,0 ± 12,8*	184,0 ± 6,3*	28 408,1 ± 1236,1*	4885,5 ± 955,1*
	1	164,0 ± 7,2	251,4 ± 13,0*	227,6 ± 12,6*	191,9 ± 9,4*	180,6 ± 13,1*	25 295,6 ± 1026,7*	5615,6 ± 647,6*
	10	146,6 ± 5,9	195,6 ± 14,5*	197,1 ± 6,9*	172,1 ± 6,3*	174,9 ± 13,8*	21 768,8 ± 603,0*	4211,4 ± 425,8*
Розигли- зон	10 мг/кг в день	130,8 ± 6,0	199,1 ± 12,9*	204,4 ± 8,5*	184,1 ± 10,9*	169,1 ± 5,7*	22 115,6 ± 671,9*	6425,6 ± 599,6

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Уровни глюкозы после еды измеряли в начале (0-й день), на 7-й день и на 13-й день исследования (табл. 11 и фиг. 6). FP1 вызывал снижение уровня глюкозы в крови статистически значимым образом при дозах 1 нмоль/кг и 10 нмоль/кг на 13-й день исследования.

Таблица 11

Уровни глюкозы в крови после еды во время введения FP1 у мышей DIO по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/кг)	Время после начала введения (дней)		
		0	7	13
Носитель	Н/П	177,6±10,9	173,6±10,6	225,3±23,0
FP1	0,1	174,1±8,5	171,8±16,3	196,4±8,1
	1	167,5±7,8	135,1±11,2	165,3±10,3*
	10	165,3±13,7	145,3±4,9	153,8±7,5*
Розигли- тазон	10 мг/кг в день	189,6±17,3	122,6±8,1*	154,8±6,5*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Уровни инсулина в плазме, измеренные в тесте OGTT, были значительно выше в группе, получавшей FP1, чем в соответственной группе, получавшей носитель, для дозы 0,1 нмоль/кг через 30 мин, и ниже при дозах 1 и 10 нмоль/кг в тот же момент времени (табл. 12). Амплитуда уровня инсулина в тесте OGTT, измеренная по полной площади под кривой, была выше, чем у группы, получавшей носитель, для дозы 0,1 нмоль/кг FP1 (табл. 12), и ниже при дозах 1 и 10 нмоль/кг. В обоих случаях статистическая значимость была достигнута только при самой низкой дозе. В момент времени через 90 мин у мышей, получавших 1 и 10 нмоль/кг FP1, уровень инсулина был ниже; однако этот эффект не достиг статистической значимости. Измерения на основании модели НОМА-IR, как показателя чувствительности к инсулину, были проведены на 14-й день исследования. В этот момент времени введение FP1 привело к снижению НОМА-IR или к улучшенной чувствительности к инсулину при дозе 10 нмоль/кг (табл. 13 и фиг. 7).

Таблица 12

Уровни инсулина в плазме (пг/мл), измеренные в тесте OGTT, проведенном через четырнадцать дней, в которые мышам DIO вводили FP1 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)			Полная AUC (пг/мл/90 мин)
		0	30	90	
Носитель	Н/П	6096,0 ± 774,3	14660,0 ± 3031,2	5034,4 ± 405,1	902 151,9 ± 143123,2
FP1	0,1	7861,0 ± 779,5	33825,8 ± 7902,0*	6494,4 ± 797,0	1834808,8 ± 381276,1*
	1	4808,1 ± 795,8	13061,8 ± 2226,3	3443,5 ± 342,5	763218,1 ± 119 766,8
	10	3478,3 ± 634,6	7147,0 ± 823,8	2958,0 ± 414,0	462528,8 ± 44 653,1
Розиглитазон	10 мг/кг в день	2965,6 ± 524,2	2203,1 ± 193,5*	1180,0 ± 57,1	179025,0 ± 9970,7

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Таблица 13

Модель HOMA-IR после голодания у мышей DIO через четырнадцать дней, в которые им вводили FP1 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/кг)	HOMA-IR
Носитель	Н/П	93,5 ± 15,3
FP1	0,1	112,4 ± 14,6
	1	56,7 ± 9,7
	10	37,7 ± 8,2*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	27,3 ± 4,7*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Величина снижения веса, достигнутая к 13 дню, не привела к измеримым изменениям абсолютной массы жировой ткани или относительной (%) массы жировой ткани при любой дозе (табл. 14). При дозе 10 нмоль/кг наблюдали значительное снижение абсолютной массы нежировой ткани. Этого снижения не наблюдали при выражении в виде относительной (%) массы нежировой ткани. Массу печени мышей измеряли при посмертной аутопсии на 15-й день исследования (табл. 15). Введение FP1 приводило к снижению абсолютной массы печени и массы печени, выраженной в процентах от массы тела, при дозе 10 нмоль/кг. Снижение наблюдали при дозе 1 нмоль/кг, но оно не достигало статистической значимости ни по одному из параметров. Содержание жира в печени измеряли по биопсийному материалу методом ЯМР (табл. 16). Гибридный белок FP1 снижал содержание печеночного жира, измеряемого в процентах от массы биопсийного материала, при дозах 1 и 10 нмоль/кг. Это снижение было значительным при более высокой дозе.

Таблица 14

Состав тела через тринадцать дней введения FP1 по схеме q3d у мышей DIO

Введение	Доза (нмоль/кг)	Масса жировой ткани (г)	Масса нежировой ткани (г)	Масса жировой ткани (% от массы тела)	Масса нежировой ткани (% от массы тела)
Носитель	Н/П	11,6 ± 0,5	29,6 ± 0,4	23,4 ± 0,8	59,6 ± 0,9
FP1	0,1	12,2 ± 0,4	29,7 ± 0,4	24,1 ± 0,6	58,5 ± 0,6
	1	12,1 ± 0,3	28,0 ± 0,4	25,1 ± 0,3	58,3 ± 0,6
	10	10,6 ± 0,3	27,7 ± 0,4*	23,1 ± 0,3	60,6 ± 0,6
Розиглитазон	10 мг/кг в день	14,9 ± 0,6*	30,0 ± 0,5	27,2 ± 0,4*	55,0 ± 0,6*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Таблица 15

Масса печени через пятнадцать дней введения FP1 по схеме q3d у мышей DIO

Введение	Доза (нмоль/кг)	Масса печени (г)	Масса печени (% от массы тела)
Носитель	Н/П	2,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2
FP1	0,1	2,9 ± 0,2	5,8 ± 0,2
	1	2,2 ± 0,1	4,6 ± 0,2
	10	1,9 ± 0,1*	4,2 ± 0,1*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	2,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Таблица 16

Содержание жира в печени, измеренное через пятнадцать дней введения FP1 по схеме q3d, у мышей DIO

Введение	Доза (нмоль/кг)	Жир (%)
Носитель	Н/П	27,3 ± 2,1
FP1	0,1	26,0 ± 1,4
	1	22,5 ± 1,4
	10	17,8 ± 1,6*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	25,9 ± 0,8

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

Пример 11. Влияние FP1 на уровни глюкозы в крови и массу тела у мышей ob/ob.

Цель этого эксперимента состояла в оценке влияния FP1 на массу тела и уровни глюкозы в крови через восемь дней введения мышам ob/ob с ожирением, гипергликемией и дефицитом лептина.

Самцов мышам ob/ob взвешивали и подкожно вводили им дозы FP1 2 мл/кг через каждые три дня (q3d) на 0, 3 и 6-й день. Массы тела мышам и пищи регистрировали ежедневно. Уровни глюкозы измеряли ежедневно с помощью глюкометра. В конце исследования мышам умерщвляли и отбирали посмертную пробу крови.

FP1 в дозе 1 нмоль/кг значительно снижал массу тела (выраженную в процентах от начальной массы тела) у мышам ob/ob, начиная со 2-го дня и по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель. FP1 в дозе 10 нмоль/кг снижал массу тела (выраженную в процентах от начальной массы тела) у мышам ob/ob, начиная с 1-го дня и по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель (табл. 17 и фиг. 8).

Таблица 17

Изменение массы тела (% от начальной) во время введения FP1 по схеме q3d у мышей ob/ob

Введение	Носитель	FP1	
День	Н/П	1 нмоль/кг	10 нмоль/кг
-6	-2,5 ± 0,3	-2,8 ± 0,4	-3,6 ± 0,5
-5	-2,4 ± 0,3	-3,0 ± 0,5	-3,5 ± 0,5
-4	-1,9 ± 0,2	-2,5 ± 0,4	-2,8 ± 0,3
-1	-0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	-0,3 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,5 ± 0,2	-1,6 ± 0,2	-2,3 ± 0,5*
2	1,1 ± 0,2	-1,8 ± 0,4*	-2,0 ± 0,9*
3	1,3 ± 0,3	-2,5 ± 0,4*	-3,1 ± 1,1*
4	1,8 ± 0,3	-3,3 ± 0,5*	-4,2 ± 1,3*
5	1,8 ± 0,4	-3,5 ± 0,5*	-4,7 ± 1,5*
6	2,0 ± 0,5	-4,0 ± 0,7*	-5,7 ± 1,6*
7	2,8 ± 0,6	-4,8 ± 0,8*	-6,3 ± 1,7*
8	3,5 ± 0,8	-4,5 ± 1,0*	-6,1 ± 1,9*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

* p<0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.

FP1 в дозе 10 нмоль/кг снижал уровни глюкозы после еды у мышей ob/ob в 1-й и 2-й дни исследования, а также с 4-го дня по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель. Снижение уровня глюкозы в крови наблюдали при дозе 1 нмоль/кг; однако этот эффект не достиг статистической значимости (табл. 18 и фиг. 9).

Таблица 18

Уровни глюкозы после еды у мышей ob/ob во время введения FP1 по схеме q3d

Введение	Носитель	FP1	
День	Н/П	1 нмоль/кг	10 нмоль/кг
-6	463,6 ± 31,2	395,7 ± 52,0	463,6 ± 41,0
-5	554,9 ± 57,5	609,6 ± 53,6	552,9 ± 53,0
-4	502,9 ± 41,6	517,9 ± 71,6	490,3 ± 54,4
-1	552,1 ± 45,1	567,2 ± 51,2	586,0 ± 42,6
0	468,8 ± 57,3	479,7 ± 61,8	437,0 ± 42,7
1	537,0 ± 42,8	439,0 ± 80,4	336,2 ± 51,0*
2	511,7 ± 43,5	440,0 ± 74,3	293,7 ± 37,6*
3	447,8 ± 54,2	369,6 ± 75,9	279,4 ± 38,8
4	516,3 ± 47,0	384,6 ± 84,0	261,2 ± 43,7*
5	531,0 ± 47,1	410,9 ± 92,2	286,9 ± 55,8*
6	596,1 ± 45,1	451,1 ± 82,6	301,9 ± 49,3*
7	566,7 ± 44,3	425,3 ± 86,9	246,7 ± 43,5*
8	509,9 ± 37,6	337,8 ± 75,1	223,4 ± 34,1*

Данные представлены как среднее ±SEM. n=8 на группу.

Пример 12. Фармакокинетика у различных видов животных.

Фармакокинетика у мышей.

FP1 внутривенно и подкожно вводили самкам мышей линии C57BL/6 в дозе 2 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 7 дней после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Концентрацию FP1 определяли методом иммуноанализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени сведена в табл. 19 и 20, и показана на фиг. 10.

Таблица 19
Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно самкам мышей линии C57BL/6

Момент времени	FP1, доза, подкожно						
	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Средний результат	Станд. откл.
	56 (нМ)	57 (нМ)	58 (нМ)	60 (нМ)	63 (нМ)	(нМ)	
4 ч.	32,299	50,735	42,766	32,407	23,018	36,245	10,698
24 ч.	88,822	106,418	88,648	103,841	80,346	93,615	11,093
72 ч.	33,563	38,473	32,473	33,625	32,769	34,181	2,451
96 ч.	20,639	24,988	21,247	19,356	20,771	21,400	2,124
День 7	5,399	6,919	7,234	5,994	5,637	6,237	0,803

Таблица 20
Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно самкам мышей линии C57BL/6

Момент времени	FP1, доза, внутривенно						
	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Средний результат	Станд. откл.
	52 (нМ)	53 (нМ)	65 (нМ)	66 (нМ)	70 (нМ)	(нМ)	
1 ч.	240,419	233,318	232,484	276,913	272,727	251,172	21,857
24 ч.	86,823	95,774	80,201	93,153	88,853	88,961	6,027
72 ч.	33,634	37,447	33,108	41,680	34,034	35,981	3,612
96 ч.	22,666	20,588	19,458	33,718	20,361	23,358	5,909
День 7	7,401	5,606	4,896	8,556	4,205	6,133	1,803

Фармакокинетический анализ показал, что период терминальный полужизни FP1 у мышей линии C57BL/6 после подкожного и внутривенного введения составлял 1,67 и 1,57 дня, соответственно (табл. 21). Средняя биодоступность FP1 после подкожного введения составила ~ 71%.

Таблица 21
Среднее ($\pm$ CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 2 мг/кг самкам мышей линии C57BL/6

Путь введения		$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/день/кг)	Vss (мл/кг)	C _{max} (нг/мл)	T _{max} * (дни)	AUC _{0-посл.} (день* нг/мл)	AUC _{0-inf} (день* нг/мл)
Подкожно	Среднее	1,67	49,48		14 994	1	38 315	40 734
	(CO)	(0,14)	(4,791)		(1776)		(3851)	(4072)
Внутривенно	Среднее	1,57	35,00	69,03	40 231	0,04	55 263	57 531
	(CO)	(0,19)	(3,13)	(5,8)	(3500)		(4853)	(5416)

Примечание. *T_{max} (медиан.).

Фармакокинетика у крыс.

FP1 внутривенно и подкожно вводили самкам крыс линии Спрег-Доули в дозе 2 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 7 дней после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Концентрацию FP1 определяли методом иммуноанализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени сведена в табл. 22 и 23, и показана на фиг. 11.

Таблица 22
Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно самкам крыс линии Спрег-Доули

Момент времени	FP1, группа 3 (доза, подкожно)						
	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Средний результат	Станд. откл.
	53 (нМ)	55 (нМ)	67 (нМ)	68 (нМ)	69 (нМ)	(нМ)	
4 ч.	4,766	3,500	3,932	3,546	3,250	3,799	0,593
24 ч.	45,118	53,192	39,196	39,823	40,804	43,627	5,826
72 ч.	18,900	24,102	23,124	23,718	18,933	21,755	2,615
96 ч.	12,193	14,333	14,185	14,669	11,256	13,327	1,511
День 7	2,805	2,821	2,447	3,438	2,358	2,774	0,426

Таблица 23

Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно самкам крыс линии Спрег-Доули

Момент времени	FP1, группа 4 (доза, внутривенно)						Средний результат (нМ)	Станд. откл.
	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного		
	51 (нМ)	52 (нМ)	57 (нМ)	64 (нМ)	66 (нМ)	66 (нМ)		
1 ч.	43,620*	382,676	403,255	443,080	510,105		356,547	181,560
24 ч.	102,665*	142,661	139,066	124,528	126,425		127,069	15,728
72 ч.	46,720	60,105	67,090	59,257	70,423		60,719	9,127
96 ч.	29,409	39,897	41,225	42,258	48,074		40,173	6,779
День 7	6,976	11,251	8,913	9,540	13,006		9,937	2,298

*Повторный анализ подтвердил результаты.

Фармакокинетический анализ показал, что терминальный период полужизни FP1 у крыс линии Спрег-Доули после подкожного и внутривенного введения составлял 1,34 и 1,51 дня, соответственно (табл. 24). Средняя биодоступность FP1 после подкожного введения составила ~ 23%.

Таблица 24

Среднее ($\pm$ CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 2 мг/кг самкам крыс линии Спрег-Доули

Путь введен		$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/день/кг)	Vss (мл/кг)	C _{max} (нг/мл)	T _{max} * (дни)	AUC _{0-посл.} (день*нг/мл)	AUC _{0-inf} (день*нг/мл)
Подкожно	Среднее	1,34	100,09		6987	1	19 250	20 112
	(CO)	(0,04)	(3,97)		(417)		(794)	(820)
Внутривенно	Среднее	1,51	24,75	53,41	59 000	0,04	83 028	86 525
	(CO)	(0,12)	(8,53)	(17,15)	(25 031)		(20 126)	(20 881)

Примечание. *T_{max} (медиан.).

Фармакокинетика у обезьян.

FP1 внутривенно и подкожно вводили новым самцам яванского макака (*Macaca fascicularis*) в дозе 1 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 21 дня после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства иммунологическим методом анализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени сведена в табл. 25 и 26, и показана на фиг. 12.

Таблица 25

Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно яванским макакам, в соответствии с определениями иммунологическим методом

Момент времени	FP1 (доза, подкожно)					Станд. откл.
	Животное 110 (нМ)	Животное 111 (нМ)	Животное 112 (нМ)	Средний результат	Средний результат	
Предварительная	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	Н/П
6 ч.	49,304	43,784	72,110	55,066	55,066	15,017
24 ч.	93,368	71,958	96,863	87,396	87,396	13,483
48 ч.	107,689	97,509	115,144	106,781	106,781	8,853
72 ч.	113,601	104,190	104,449	107,414	107,414	5,360
120 ч.	101,490	95,049	91,717	96,085	96,085	4,968
168 ч.	82,167	75,435	81,569	79,724	79,724	3,726
240 ч.	71,033	56,732	59,266	62,344	62,344	7,631
336 ч.	44,380	42,758	42,571	43,236	43,236	0,995
432 ч.	30,911	29,445	32,839	31,065	31,065	1,702
528 ч.	21,277	20,404	26,427	22,703	22,703	3,255

Таблица 26

Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно яванским макакам, в соответствии с определениями иммунологическим методом

	FP1 (доза, внутривенно)				
Момент времени	Животное 104 (нМ)	Животное 105 (нМ)	Животное 106 (нМ)	Средний результат	Станд. откл.
Предварительная	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	Н/П
1 ч.	212,661	235,168	189,000	212,276	23,087
6 ч.	190,315	185,331	183,575	186,407	3,497
24 ч.	141,743	155,943	146,487	148,058	7,229
48 ч.	111,765	126,105	120,744	119,538	7,246
72 ч.	105,076	106,955	106,441	106,157	0,971
120 ч.	92,591	103,882	103,757	100,077	6,483
168 ч.	71,368	93,055	87,706	84,043	11,298
240 ч.	71,554	65,093	65,685	67,444	3,572
336 ч.	46,184	38,961	41,696	42,280	3,647
432 ч.	34,589	31,266	19,492	28,449	7,933
528 ч.	26,885	24,154	22,422	24,487	2,250

Фармакокинетический анализ показал, что терминальный период полужизни FP1 у яванских макак после подкожного и внутривенного введения составил 8,5 и 9,2 дня, соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~ 88% (табл. 27).

Таблица 27

Среднее ($\pm$ CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 1 мг/кг яванским макакам

Путь введения		$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/ день/ кг)	Vss (мл/ кг)	C _{max} (нг/ мл)	T _{max} * (дни)	AUC _{0-посл.} (день* нг/мл)	AUC _{0-inf} (день* нг/мл)
Подкожно	Среднее	8,5	3,9		17 776	3	211 030	256 202
	(CO)	(1,5)	(0,3)		(950)		(11 332)	(20 192)
Внутривенно	Среднее	9,2	3,4	45,6	34 001	0,04	239 758	292 206
	(CO)	(0,5)	(0,1)	(1,6)	(3698)		(6095)	(11 516)

Примечание. *T_{max} (медиан.)

Количественное определение концентрации интактного димера в сыворотке яванских макак после внутривенного и подкожного введения проводили методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС (табл. 28 и 29 и фиг. 13 и 14). Концентрации, определяемые данным методом, были близки к концентрациям, определяемы методом иммуноанализа (IA), доказывая, что в организме яванских макак FP1 циркулирует в виде интактного димера без заметной подверженности метаболическим изменениям.

Таблица 28

Зависимость концентрации FP1 в виде интактного димера в сыворотке (нг/мл) от времени после однократного внутривенного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

День	Интактный димер по данным масс-спектрометрии (объединенные пробы)	Данные иммуноанализа (средн.)
0,00	0	0
0,04	33 347	34 537
0,25	29 686	30 328
1,00	28 787	24 089
2,00	17 249	19 449
3,00	16 827	17 272
5,00	16 159	16 282
7,00	11 124	13 674
10,00	8746	10 973
14,00	5328	6879
18,00	3857	4629
22,00	2252	3984

Таблица 29

Зависимость концентрации FP1 в виде интактного димера в сыворотке (нг/мл) от времени после однократного подкожного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

День	Интактный димер по данным масс-спектрометрии (объединенные пробы)	Данные иммуноанализа (средн.)
0,00	0	0
0,25	9625	8959
1,00	15 799	14 219
2,00	17 671	17 373
3,00	19 130	17 476
5,00	12 284	15 633
7,00	10 808	12 971
10,00	8910	10 143
14,00	5814	7034
18,00	4074	5054
22,00	2967	3694

Концентрацию анализов в сыворотке яванских макаков после внутривенного и подкожного введения также измеряли методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином/жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС) (табл. 30 и 31). Выбранные триптические пептиды, а именно: ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK), ASL (ASLEDLGWADWVLSR) и TDT (TDTGVSLQTYDDLAK), расположены внутри FP1 вблизи от N-конца области HSA, N-конца GDF15 и C-конца GDF15, соответственно. Пептиды отслеживали как суррогатные пептиды FP1. Концентрации всех суррогатных пептидов были близки друг другу и концентрациям, измеренным методом иммуноанализа, доказывая, что последовательность GDF15 в FP1 остается интактной и связана с полной последовательностью HSA in vivo.

Таблица 30

Зависимость концентрации в сыворотке (нг/мл) суррогатных пептидов, представляющих различные области FP1, от времени после однократного внутривенного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином /жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС)

Момент времени		FP1 в среднем (нг/мл)			Станд. откл.			Данные иммуно анализа (нг/мл)
День	Часы	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	Н/П	Н/П	Н/П	0,0
0,04	1	32400,0	39766,7	33333,3	2623,0	3162,8	2722,7	34536,9
0,25	6	29100,0	27166,7	30600,0	3439,5	1006,6	2095,2	30328,1
1,00	24	24366,7	23300,0	23800,0	4215,8	3996,2	4100,0	24088,7
2,00	48	19433,3	17733,3	18700,0	1457,2	1193,0	854,4	19448,6
3,00	72	18100,0	17200,0	17166,7	360,6	871,8	1001,7	17271,6
5,00	120	15966,7	14033,3	14233,3	1001,7	642,9	1011,6	16282,3
7,00	168	13733,3	11800,0	12100,0	1115,0	600,0	300,0	13673,6
10,00	240	9303,3	8570,0	8570,0	2290,1	1682,2	1685,9	10973,0
14,00	336	5860,0	5890,0	6056,7	415,8	312,2	388,0	6878,9
18,00	432	4143,3	4400,0	4226,7	374,3	52,9	571,2	4628,6
22,00	528	2830,0	3256,7	2753,3	355,4	420,0	319,0	3984,0

Таблица 31

Зависимость концентрации в сыворотке (нг/мл) суррогатных пептидов, представляющих различные области FP1, от времени после однократного подкожного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином/жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС)

Момент времени		FP1 в среднем (нг/мл)			Станд. откл.			Данные иммуно анализа (нг/мл)
День	Часы	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	Н/П	Н/П	Н/П	0,0
0,25	6	9323,3	7430,0	8123,3	1900,3	2471,6	1954,1	8959,1
1,00	24	15233,3	13390,0	14533,3	2926,3	3222,0	2683,9	14219,2
2,00	48	15366,7	14000,0	14166,7	2579,4	1646,2	2311,6	17373,0
3,00	72	17300,0	16033,3	15333,3	1571,6	1001,7	986,6	17476,0
5,00	120	15333,3	13366,7	13666,7	1222,0	1692,1	1501,1	15632,9
7,00	168	13333,3	11633,3	11700,0	709,5	472,6	781,0	12970,9
10,00	240	8496,7	7376,7	8343,3	1475,5	189,0	1039,1	10143,2
14,00	336	6046,7	6116,7	6253,3	90,2	118,5	110,6	7034,5
18,00	432	4593,3	5250,0	4636,7	802,6	1157,5	621,7	5054,2
22,00	528	3056,7	3490,0	3116,7	424,5	687,7	220,5	3693,7

Анализ стабильности в человеческой плазме Целью данного исследования был анализ стабильности FP1 в человеческой плазме ex vivo. Свежую незамороженную человеческую плазму получали из гепаринизированной крови двух субъектов (одного мужчины и одной женщины) путем центрифугирования. FP1 инкубировали в этой матрице при температуре 37°C с осторожным перемешиванием в течение 0, 4, 24 и 48 ч. Концентрацию FP1 определяли методом иммуноанализа. Среднее отличие в процентах от начальной концентрации (0 ч) варьировало в интервале от -4,1 до -12,9 и не увеличивалось со временем, что свидетельствует о стабильности FP1 в человеческой плазме в течение до 48 ч ex vivo (табл. 32 и фиг. 15).

Таблица 32

Концентрация FP1 (мкг/мл) через 0, 4, 24 и 48 ч инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (Sub), в соответствии с определениями иммунологическим методом

Проба <i>ex vivo</i>	Конц. в плазме мужчины Sub 1 (мкг/мл)	% отличия TO	Конц. в плазме женщины Sub 2 (мкг/мл)	% отличия TO	Средняя конц. (мкг/мл)	% отличия TO
Плазма, Т 0 ч. FP1	11,503	Н/П	12,649	Н/П	12,076	Н/П
Плазма, Т 4 ч. FP1	10,524	-8,5	10,521	-16,8	10,523	-12,9
Плазма, Т 24 ч. FP1	9,934	-13,6	12,402	-2,0	11,168	-7,5
Плазма, Т 48 ч. FP1	10,582	-8,0	12,575	-0,6	11,578	-4,1

Количественное определение концентрации интактного димера после инкубации в человеческой плазме проводили методом иммуоаффинного захвата/ЖХМС. Концентрации, определенные данным методом, оставались стабильными с течением времени (0, 4, 24 и 48 ч), доказывая, что FP1 сохраняется в человеческой плазме *ex vivo* в виде интактного димера в течение до 48 ч (табл. 33 и фиг. 16).

Таблица 33

Средняя концентрация FP1 (мкг/мл) в виде интактного димера и отличие (%) от начальной концентрации через 0, 4, 24, 48 ч инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов, в соответствии с определениями методом иммуоаффинного захвата/ЖХМС

	Конц. димера (мкг/мл)	Отличие (%)
0 ч.	15,8	100,0
4 ч.	15,8	100,1
24 ч.	15,9	100,9
48 ч.	15,2	96,0

Пример 13. Стратегия иммунного ответа.

Для обнаружения антилекарственного антитела (ADA) у животных и в клинических пробах будут разработаны методы анализа иммунного ответа (IR). Анализ иммунного ответа (IR) будет определять ADA-положительные пробы для сравнения статуса по ADA с результатами фармакокинетического/токсикокинетического (РК/ТК) анализа, что позволит оценивать воздействие и фармакокинетические параметры FP1. Клинический анализ иммунного ответа будет применяться для просмотра проб сыворотки, подтверждения специфичности ADA-положительных проб и определения титра ADA для подтвержденных положительных проб. Затем будет разработан метод анализа нейтрализующих антител (NAb), применимый к положительным пробам от ADA-положительных субъектов, подтвержденным на стадии 1 программы. Далее будет выполнено определение перекрестной реактивности ADA в отношении эндогенного GDF15 для применения на стадии 2 программы. Перед выполнением первого исследования у человека (FIH) будет проведена оценка риска иммуногенности, а при надлежащем обосновании возможно проведение дополнительных анализов для характеристики иммунного ответа.

Пример 14. Токсикологический план.

Поскольку эндогенный рецептор-мишень для GDF15 не выявлен, отсутствуют функциональные данные в отношении FP1, как и данные о связывании *in vitro*. Тем не менее, исследования фармакологических показателей и эффективности однократных и множественных доз, проведенные на крысах, мышах и яванских макаках, продемонстрировали активность FP1 у этих видов, что свидетельствует о его влиянии на снижение потребления пищи, снижение массы тела и модуляцию переносимости глюкозы в пероральном тесте. В качестве грызунов и не-грызунов в токсикологическом исследовании, на основании результатов по эффективности, приняты крыса и обезьяна, соответственно, учитывая однако тот факт, что собственное воздействие FP1 на рецептор у этих видов (в отличие от человека) охарактеризовано не полностью.

Примеры 15-19 включают характеристику другого примера гибридного белка настоящего изобретения, описанного в примере 5, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (кодируемую последовательностями нуклеотидов SEQ ID NO: 92 (оптимизация кодонов 1) и 110 (оптимизация кодонов 2)). Этот гибридный белок представляет собой полностью рекомбинантный белок, который существует в виде гомодимера гибрида HSA (C34S) и варианта делеции зрелого человеческого GDF15 (201-308; SEQ ID NO: 8), соединенных содержащим 42 аминокислоты линкером, состоящим из глицино-

вых и сериновых остатков GS-(GGGGS)₈. Единственный нативный свободный цистеин в положении 34 HSA был заменен на серин. Далее в примерах этот конкретный гибридный белок HSA-GDF15 для простоты будет именоваться "FP2".

Пример 15. Влияние FP2 на потребление пищи мышами линии C57BL/6.

Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи самцами мышей линии C57BL/6 после введения однократной дозы. В данном исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6 (в возрасте 10-12 недель), полученных от компании Taconic Biosciences (г. Хадсон, штат Нью-Йорк, США). Мышей размещали в клетках по отдельности, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты (6:00/18:00), и предоставляли им неограниченный доступ к воде и корму. Самцы мышей линии C57BL/6 в течение минимум 72 ч проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ; затем мышей на основании потребления пищи за последние 24 ч разделяли на шесть групп, по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композиции путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 ч после введения композиции. Для сравнения в настоящем исследовании использовали препарат 6xHis-FP1.

FP2 оказывал значительное влияние на снижение потребления пищи через 12, 24 и 48 ч после введения при всех уровнях дозы, применявшихся в испытании (табл. 34). У мышей наблюдали снижение в процентном изменении потребления пищи по сравнению с PBS во все моменты времени и при всех уровнях дозы (табл. 35).

Таблица 34

Влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи в течение 48 часов мышами линии C57BL/6
Суммарное потребление пищи (г)

Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	3,7 ± 0,2	4,4 ± 0,2	8,8 ± 0,4
FP2, 1 нмоль/кг	2,8 ± 0,4*	3,0 ± 0,4**	6,9 ± 0,7*
FP2, 4 нмоль/кг	2,4 ± 0,2***	3,1 ± 0,2**	7,0 ± 0,3*
FP2, 8 нмоль/кг	1,9 ± 0,2****	2,4 ± 0,1****	6,2 ± 0,2****
FP2, 16 нмоль/кг	1,8 ± 0,1****	2,7 ± 0,1***	6,3 ± 0,4**
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	2,3 ± 0,3***	2,8 ± 0,4**	6,6 ± 0,7**

Данные представлены как среднее ±SEM.

* p<0,05, по сравнению с PBS.

** p<0,01, по сравнению с PBS.

*** p<0,001, по сравнению с PBS.

**** p<0,0001, по сравнению с PBS, соответственно.

Статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

n=8 на группу, за исключением 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг (n=6).

Таблица 35

Влияние однократной дозы FP2 на процентное снижение потребления пищи (по сравнению с носителем в контроле) в течение 48 ч у мышей линии C57BL/6

Процент ингибирования по сравнению с PBS			
Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	0,0 ± 7,9	0,0 ± 7,7	0,0 ± 5,9
FP2, 1 нмоль/кг	22,4 ± 12,5*	31,8 ± 10,5**	21,8 ± 8,1*
FP2, 4 нмоль/кг	36,6 ± 7,2***	30,4 ± 5,8**	20,2 ± 4,7*
FP2, 8 нмоль/кг	47,0 ± 6,2****	45,7 ± 3,8****	29,7 ± 3,9****
FP2, 16 нмоль/кг	49,2 ± 4,1****	38,1 ± 4,1***	27,8 ± 5,1**
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	36,9 ± 9,9***	36,5 ± 8,8**	24,6 ± 8,2**

Анорексигенный эффект FP2 выражен как относительное снижение потребления пищи по сравнению с PBS в контроле, соответственно.

Данные представлены как среднее ±SEM.

* p<0,05, по сравнению с PBS.

** p<0,01, по сравнению с PBS.

*** p<0,001, по сравнению с PBS.

**** $p < 0,0001$, по сравнению с PBS, соответственно.

Статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

$n=8$ на группу, за исключением 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг ($n=6$).

Пример 16. Влияние FP2 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули.

Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи и прирост массы тела у самцов крыс линии Спрег-Доули после введения однократной дозы. Животных получили от компании Charles Rivers Labs (г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США), они имели массу тела 200-225 г и были использованы в течение одной недели после доставки. Животных размещали в клетках по отдельности на подстилках Alpha Dry, и с пластиковой трубкой для подачи, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты. Им предоставляли неограниченный доступ к воде и кормили кормом для лабораторных грызунов; Корм для грызунов Irradiated Certified PicoLab® Rodent Diet 20, 5K75* (поставщик: Purina Mills, г. Сент-Луис, штат Миссури, через ASAP, г. Квакертаун, штат Пенсильвания, США). Перед введением дозы каждую крысу взвешивали и регистрировали массу тела.

Животные в течение минимум 72 ч проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ; затем крыс на основании потребления пищи за последние 24 ч разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композиции путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 ч после введения композиции. Для сравнения в настоящем исследовании использовали препарат 6xHis-FP1.

После введения однократной дозы FP2 измеряли зависимое от дозы снижение потребления пищи. При дозе 0,3 нмоль/кг не наблюдали существенных отличий в потреблении пищи. При дозе 1 нмоль/кг наблюдали значительное влияние на снижение потребления пищи через 12 ч, но не через 24 или 48 ч. При уровнях дозы 3 и 10 нмоль/кг наблюдали значительное снижение потребления пищи во все моменты времени (табл. 36, фиг. 19). Снижение в процентном изменении потребления пищи по сравнению с PBS наблюдали во все моменты времени и при всех уровнях дозы (табл. 37).

Таблица 36

Влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи в течение 48 ч крысами линии Спрег-Доули

Суммарное потребление пищи (г)			
Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	21,7 ± 0,6	25,0 ± 0,8	53,1 ± 1,6
FP2, 0,3 нмоль/кг	19,5 ± 0,9	22,9 ± 0,7	48,4 ± 1,5
FP2, 1 нмоль/кг	17,5 ± 0,9*	19,8 ± 0,8	47,0 ± 2,6
FP2, 3 нмоль/кг	16,1 ± 1,2**	17,0 ± 1,0**	39,2 ± 3,2**
FP2, 10 нмоль/кг	15,8 ± 0,9***	16,5 ± 0,9**	36,5 ± 3,2**
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	15,0 ± 1,4***	15,7 ± 1,2**	37,2 ± 4,5**

Данные представлены как среднее ±SEM.

* $p < 0,05$, по сравнению с PBS.

** $p < 0,01$, по сравнению с PBS.

*** $p < 0,001$, по сравнению с PBS, соответственно.

Статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

$n=8$ на группу.

Таблица 37

Влияние однократной дозы FP2 на процентное снижение потребления пищи (по сравнению с носителем в контроле) в течение 48 ч крысами линии Спрег-Доули

Процент ингибирования по сравнению с PBS			
Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	0,0 ± 4,0	0,0 ± 4,6	0,0 ± 4,3
FP2, 0,3 нмоль/кг	10,0 ± 4,7	8,5 ± 4,1	8,8 ± 3,9
FP2, 1 нмоль/кг	19,3 ± 4,7*	20,8 ± 4,1	11,5 ± 5,5
FP2, 3 нмоль/кг	25,9 ± 6,1**	32,0 ± 4,7**	26,2 ± 6,5**
FP2, 10 нмоль/кг	27,4 ± 4,8***	33,8 ± 4,1**	31,2 ± 6,4**
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	30,8 ± 6,6***	37,0 ± 5,4**	29,9 ± 8,8**

Анорексигенный эффект FP2 выражен как относительное снижение потребления пищи по сравне-

нию с PBS в контроле, соответственно.

Данные представлены как среднее $\pm$ SEM.

* $p < 0,05$, по сравнению с PBS.

** $p < 0,01$, по сравнению с PBS.

*** $p < 0,001$, по сравнению с PBS, соответственно.

Статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

$n=8$ на группу.

Пример 17. Влияние FP2 на потребление пищи, массу тела и гомеостаз глюкозы у мышей с алиментарным ожирением (DIO) линии C57BL/6.

Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи и массу тела, а также улучшать гомеостаз глюкозы при многократной дозе у самцов мышей DIO линии C57BL/6 в течение 8 дней. В данном исследовании использовали самцов мышей DIO линии C57BL/6 (в возрасте 21 недели, откормленные жиромодераторным кормом в течение 15 недель), полученные от компании Taconic Biosciences (г. Хадсон, штат Нью-Йорк, США). Мышей размещали в клетках по отдельности, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты (6:00/18:00), им предоставляли неограниченный доступ к воде и давали корм Research Diet D12492 (Research Diets, г. Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США). Перед экспериментом мыши больше 1 недели проходили акклиматизацию в виварии для мышей. Конечными результатами исследования являлись измерения потребления пищи, массы тела, состава тела и гликемических показателей (тест OGTT, уровень глюкозы в крови). За один день перед введением дозы животных взвешивали и разделяли на группы по массе тела (BW).

Дозу мышам вводили путем подкожной инъекции. Животные, которым вводили FP2, получали данную композицию на 0-й день, 3-й день, 6-й день, 9-й день и 12-й день. Группа, получавшая носитель, и группа, получавшая розиглитазон, в эти дни получали стерильный PBS подкожно. Розиглитазон добавляли в корм в количестве 0,015%, доступ к корму не ограничивали. Массу тела и потребление пищи регистрировали ежедневно в течение пятнадцати дней. Уровень глюкозы в крови измеряли на 0, 7 и 13-й дни. Пероральный тест на переносимость глюкозы (OGTT) проводили на 14-й день. Уровни инсулина измеряли в выбранные моменты времени в ходе проведения теста OGTT. На 15-й день мышей умерщвляли посредством ингаляции CO_2 и отбирали посмертные пробы крови через пункцию сердца для анализа воздействия. Отдельную ветвь ФК проводили в группах, состоящих из трех мышей на каждую дозу, всего 15 мышей.

Анализ зависимости воздействие-ответ (E-R) для FP2 у мышей DIO.

Большинство животных в фармакодинамических (ФД) ветвях (эффективность) в последний день исследования, когда отбирали фармакокинетические (ФК) пробы, имели необнаружимые концентрации лекарственного средства, возможно из-за иммуногенности. Таким образом, при проведении анализа зависимости воздействие-ответ (на 3, 6 и 9-й дни, соответственно) средние профили ФК из ветвей ФК, вместо отдельных ФК из ветвей ФД, использовали для изменения массы тела (%) относительно исходного уровня в ветвях ФД при соответственном уровне дозы. Этот метод предполагает, что с точки зрения воздействия лекарственного средства ветви ФК ведут себя аналогично ветвям ФД.

Для корреляции между воздействием и данными ответа (логарифмически преобразованные концентрации лекарственных препаратов) использовали модель $E_{\max}$ (GraphPad Prism 6, log (агонист) против ответа). Угловой коэффициент Хилла был принят равным 1. Следует отметить, что подобранные моделью значения EC_{10} - EC_{50} для 3, 6 и 9 дней отличались не более чем вдвое, несмотря на то, что оценки $E_{\max}$ были различными ($E_{\max} = -4,26, 8,18$ и $-9,85\%$, соответственно). У некоторых животных на 9-й день также наблюдали снижение воздействия лекарственного средства ввиду возможного образования ADA, и поэтому оценки параметра E-R на основании данных на 9-й день следует интерпретировать с осторожностью.

Влияние двухнедельного воздействия FP2 на потребление пищи, массу тела, гомеостаз глюкозы и содержание жира в печени оценивали у самцов у мышей с алиментарным ожирением (DIO) линии C57BL/6. В ветви ФК исследования до 9-го дня исследования, воздействие в группе введения, получавшей дозу 0,3 нмоль/кг, составило 1,7-3,3 нМ FP2, в группе введения, получавшей дозу 1,0 нмоль/кг - 7,1-14 нМ, в группе введения, получавшей дозу 3,0 нмоль/кг - 20,8-41,6 нМ, в группе введения, получавшей дозу 10 нмоль/кг - 28,5-112,9 нМ FP2 ($n=2$ или 3, табл. 49). После 9-го дня наблюдалось снижение уровня циркуляции у большинства животных, несмотря на постоянное введение препарата по схеме q3d (табл. 49). В согласии с этим ускоренным выведением, большинство животных в ветви ФД исследования на 15-й день имело необнаружимые уровни циркулирующего FP2 (табл. 50).

Введение FP2 мышам DIO по схеме q3d привело к снижению потребления пищи (табл. 38), массы тела (табл. 39, 40 и фиг. 20) и уровня глюкозы в крови после еды, по сравнению с носителем в контроле (табл. 43 и фиг. 23). Значительное снижение потребления пищи наблюдали на 2-й день, 5-й день, 8-й день при дозе 0,3 нмоль/кг, с 1-го дня по 7-й день при дозе 1,0 нмоль/кг, на 1-й день, 2-й день, с 4-го дня по 6-й день, и на 8-й день при дозе 3,0 нмоль/кг, а также на 1-й день, с 3-го дня по 6-й день, на 8-й день и на 9-й день при дозе 10,0 нмоль/кг. Процентное изменение массы тела было значительным с 5-го дня по 13-й

день при дозе 0,3 нмоль/кг, с 3-го дня по 13-й день при дозах 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг, и с 4-го дня по 13-й день при дозе 3,0 нмоль/кг. Изменение массы тела в граммах было значительным с 8-го дня при дозе 0,3 нмоль/кг, с 6-го дня при дозе 1,0 нмоль/кг, с 7-го дня при дозе 3,0 нмоль/кг и с 5-го дня при дозе 10,0 нмоль/кг. Снижение уровней глюкозы в крови после еды было значительным на 7-й день у животных с уровнем дозы 3,0 нмоль/кг, и было значительным на 13-й день у животных с уровнями дозы 3,0 и 10,0 нмоль/кг.

Мыши DIO, получавшие FP2 по схеме q3d, на 14-й день имели улучшенную переносимость глюкозы по сравнению с носителем в контроле, по данным теста с пероральным введением глюкозы (табл. 41; фиг. 21A и 21B). Уровень глюкозы значительно снижался через 30 мин в группе, получавшей дозу 0,3 нмоль/кг, через 60 и 120 мин в группе, получавшей дозу 1,0 нмоль/кг, через 120 мин в группе, получавшей дозу 3,0 нмоль/кг, и через 30, 90 и 120 мин в группе, получавшей дозу 10,0 нмоль/кг. Полная площадь под кривой была значительной для всех групп по дозам. Уровни инсулина по данным теста переносимости глюкозы значительно снижались через 30 мин в группах, получавших дозы 0,3 и 10,0 нмоль/кг (табл. 42; фиг. 22A и 22B). Кроме того, по сравнению с животными, получавшими носитель, наблюдали значительное снижение вычисленного значения HOMA-IR после голодания у мышей DIO через 14 дней, в которые им вводили FP2 по схеме q3d в дозе 10,0 нмоль/кг, что указывает на улучшенную чувствительность к инсулину (табл. 44 и фиг. 24).

Состав тела измеряли методом МРТ в -1-й день перед началом исследования и на 13-й день (табл. 47 и табл. 48). Введение FP2 в дозах 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг мышам DIO приводило к значительному снижению массы жировой ткани на 13-й день; при этом не наблюдалось изменений массы нежировой ткани во всех подопытных группах. На 13-й день подопытная группа, получавшая 10,0 нмоль/кг, имела значительное увеличение относительной (%) массы нежировой ткани и значительное относительное (%) снижение массы жировой ткани по сравнению с группой, получавшей носитель. С -1-го по 13-й день были значительными изменения массы нежировой ткани в подопытных группах, получавших 0,3 нмоль/кг, 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг, и были значительными относительные изменения (%) массы нежировой ткани в подопытных группах, получавших 1,0, 3,0 и 10,0 нмоль/кг. С -1-го по 13-й день были значительными изменения массы жировой ткани и относительные изменения (%) массы нежировой ткани во всех подопытных группах по сравнению с носителем в контроле.

Не наблюдали существенных отличий в уровнях эндогенного мышинового GDF15 в сыворотке между животными, получавшими носитель и получавшими FP2 по схеме q3d в течение 15 дней (табл. 46).

Заключение: результаты показывают, что повышение воздействия лекарственного средства по существу связано с большим (%) изменением массы тела относительно исходной на уровне популяции по всем подопытным группам в исследовании, в 3, 6 и 9-й дни.

Воздействие FP2 в течение двух недель приводило к снижению потребления пищи, снижению массы тела, снижению уровня глюкозы в крови, улучшению переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину у мышей DIO. Значительное снижение потребления пищи за множество дней было достигнуто введением доз 1,0, 3,0 и 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. Масса тела существенно снижалась, начиная с третьего - пятого дня после начала исследования. Уровень глюкозы в крови после еды значительно снизился на 13-й день после введения FP2 в дозах 3,0 и 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. Чувствительность к инсулину, которую оценивали по значительному снижению значения HOMA-IR после голодания, была достигнута через 14 дней, в которые животным вводили FP2 в дозе 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. На 13-й день наблюдали значительное повышение процентной массы нежировой ткани и значительное снижение процентной массы жировой ткани у мышей DIO, получавших FP2 в дозе 10,0 нмоль/кг по схеме q3d.

Таблица 38

Влияние FP2 на суточное потребление пищи (г) после 13 дней введения

Введение День	Носитель н/п	FP2 (нмоль/кг)				Розиглитазон 10 мг/кг в день
		0,3	1,0	3,0	10,0	
0	2,0±0,1	1,9±0,1	2,2±0,2	1,9±0,2	1,9±0,2	2,2±0,1
1	2,4±0,2	2,1±0,1	1,6±0,1*	1,5±0,1*	1,3±0,1*	2,7±0,1
2	2,5±0,1	1,8±0,1*	1,7±0,2*	1,9±0,1*	2,0±0,1	3,0±0,2
3	2,5±0,1	2,1±0,1	1,7±0,1*	1,9±0,1	1,8±0,1*	2,8±0,2
4	2,6±0,1	2,0±0,1	1,8±0,1*	1,9±0,1*	1,9±0,1*	2,9±0,2

5	2,8± 0,1	2,1±0,2*	2,2±0,1*	2,2±0,0*	1,9±0,1*	2,7±0,2
6	2,8± 0,1	2,3±0,2	2,1±0,1*	2,2±0,1*	2,0±0,1*	2,8±0,2
7	2,6± 0,2	2,±0,1	2,0±0,1*	2,0±0,2	2,1±0,1	2,9±0,2
8	2,7± 0,2	2,1±0,1*	2,2±0,1	2,0±0,1*	2,0±0,1*	3,1±0,2
9	2,8± 0,1	2,3±0,1	2,3±0,2	2,3±0,2^	2,1±0,2*	3,2±0,1
10	2,6± 0,1	2,5±0,1	2,4±0,2	2,3±0,2^	2,1± 0,2	3,0±0,2
11	2,9± 0,1	2,5±0,1	2,8±0,2	2,6±0,4	2,6± 0,1	3,3 ± 0,1
12	2,8± 0,1	2,7±0,2	2,8±0,1	2,8±0,2	2,9± 0,1	3,1 ± 0,2
13	2,7± 0,1	2,5±0,2	2,6±0,1	2,6±0,1	2,2± 0,1	3,1 ± 0,2

Значения представляют среднее $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе, за исключением данных для n=7, которые отмечены значком^.

* $p<0,05$, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 39

Влияние FP2 на процентное изменение массы тела после 13 дней введения

Введение День	Носитель Н/П	FP2 (нмоль/кг)				Розиглитазон 10 мг/кг в день
		0,3	1,0	3,0	10,0	
-1	-0,1 ± 0,4	0,5 ± 0,2	-0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,6	0,1 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	-0,4 ± 0,5	-1,0 ± 0,3	-2,2 ± 0,4	-1,8 ± 0,6	-2,4 ± 0,5	1,3 ± 0,4
2	-0,4 ± 0,3	-2,2 ± 0,4	-3,4 ± 0,6	-3,0 ± 0,6	-3,1 ± 0,4	1,3 ± 0,5
3	-0,3 ± 0,4	-2,3 ± 0,4	-4,2 ± 0,6*	-3,5 ± 0,6	-4,3 ± 0,5*	1,9 ± 0,5
4	-0,3 ± 0,5	-2,9 ± 0,5	-5,3 ± 0,6*	-4,9 ± 0,7*	-5,8 ± 0,7*	1,8 ± 0,7
5	-0,2 ± 0,4	-4,2 ± 0,7*	-6,2 ± 0,6*	-5,6 ± 0,7*	-6,8 ± 0,7*	1,7 ± 0,8
6	-0,4 ± 0,6	-5,1 ± 0,7*	-7,4 ± 0,8*	-6,9 ± 0,7*	-8,5 ± 0,9*	1,1 ± 0,9
7	0,2 ± 0,8	-5,1 ± 0,7*	-7,7 ± 0,9*	-7,4 ± 0,7*	-8,7 ± 0,9*	2,0 ± 1,0
8	0,2 ± 1,0	-6,1 ± 0,8*	-7,9 ± 0,9*	-8,0 ± 0,8*	-9,7 ± 0,8*	2,4 ± 1,1
9	0,5 ± 1,1	-6,0 ± 0,9*	-8,4 ± 0,9*	-8,8 ± 0,9*	-10,1 ± 1,0*	3,1 ± 1,0
10	1,1 ± 1,2	-5,7 ± 0,8*	-8,1 ± 0,9*	-8,9 ± 0,9*	-10,7 ± 1,2*	3,5 ± 1,2
11	1,2 ± 1,3	-6,1 ± 0,9*	-8,2 ± 0,8*	-8,6 ± 1,3*	-11,1 ± 1,4*	3,7 ± 1,2
12	1,4 ± 1,3	-6,3 ± 1,2*	-7,7 ± 0,8*	-8,2 ± 1,4*	-10,9 ± 1,4*	4,1 ± 1,3
13	1,7 ± 0,9	-5,8 ± 1,4*	-7,1 ± 1,0*	-7,2 ± 1,4*	-10,9 ± 1,4*	4,7 ± 1,3

Значения представляют среднее $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p<0,05$, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, кри-

терий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 40
Влияние FP2 на изменение массы тела (г) после 13 дней введения

Введение	Носитель	FP2 (нмоль/кг)				Розиглитазон
День	Н/П	0,3	1,0	3,0	10,0	10 мг/кг в день
-1	44,6 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6
0	44,6 ± 0,6	44,3 ± 0,6	44,6 ± 0,6	44,7 ± 0,6	44,6 ± 0,7	44,4 ± 0,6
1	44,5 ± 0,7	43,8 ± 0,6	43,6 ± 0,6	43,9 ± 0,7	43,5 ± 0,7	45,0 ± 0,7
2	44,5 ± 0,7	43,3 ± 0,7	43,1 ± 0,6	43,3 ± 0,7	43,2 ± 0,7	45,0 ± 0,7
3	44,5 ± 0,7	43,2 ± 0,7	42,7 ± 0,6	43,1 ± 0,7	42,6 ± 0,6	45,3 ± 0,7
4	44,5 ± 0,7	43,0 ± 0,7	42,2 ± 0,6	42,5 ± 0,7	42,0 ± 0,7	45,2 ± 0,7
5	44,5 ± 0,7	42,4 ± 0,7	41,8 ± 0,5	42,2 ± 0,7	41,5 ± 0,6*	45,2 ± 0,7
6	44,5 ± 0,7	42,0 ± 0,7	41,3 ± 0,6*	41,6 ± 0,7	40,7 ± 0,5*	44,9 ± 0,8
7	44,7 ± 0,7	42,0 ± 0,7	41,1 ± 0,6*	41,4 ± 0,7*	40,6 ± 0,5*	45,3 ± 0,8
8	44,7 ± 0,7	41,6 ± 0,7*	41,1 ± 0,7*	41,1 ± 0,7*	40,2 ± 0,6*	45,5 ± 0,8
9	44,8 ± 0,7	41,6 ± 0,8*	40,8 ± 0,7*	40,8 ± 0,8*	40,0 ± 0,8*	45,8 ± 0,7
10	45,1 ± 0,7	41,8 ± 0,8*	41,0 ± 0,8*	40,8 ± 0,8*	39,8 ± 0,8*	46,0 ± 0,8
11	45,2 ± 0,8	41,6 ± 0,8*	40,9 ± 0,7*	40,8 ± 0,9*	39,6 ± 0,9*	46,1 ± 0,8
12	45,3 ± 0,7	41,5 ± 0,9*	41,2 ± 0,7*	41,0 ± 0,9*	39,7 ± 0,9*	46,3 ± 0,9
13	45,4 ± 0,7	41,7 ± 0,9*	41,4 ± 0,8*	41,5 ± 0,9*	39,7 ± 0,9*	46,5 ± 0,9

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 41

Влияние FP2 на уровни глюкозы в крови (мг/дл) в тесте OGTT, проведенном через 14 дней введения

Введение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)					Полная AUC (мг/дл/ 120 мин)	Δ AUC (мг/дл/ 120 мин)
		0	30	60	90	120		
Носитель	Н/П	161 ± 10	225 ± 17	228 ± 14	208 ± 18	213 ± 19	25 429 ± 1228	6094 ± 1430
FP2	0,3	144 ± 4	163 ± 14*	209 ± 11	180 ± 12	171 ± 7	21 270 ± 399*	3985 ± 521
	1,0	151 ± 9	179 ± 18	188 ± 7	179 ± 13	163 ± 8*	21 096 ± 754*	2972 ± 907
	3,0	149 ± 8	180 ± 18	179 ± 11*	164 ± 6	163 ± 9*	20 338 ± 876*	2426 ± 1058
	10,0	134 ± 6	163 ± 7*	190 ± 13	152 ± 7*	163 ± 8*	19 599 ± 614*	3539 ± 1198
Розиглитазон	10 мг/кг в день	132 ± 9	152 ± 10*	162 ± 13*	138 ± 9*	159 ± 9*	17 904 ± 632*	2139 ± 1179

Значения представляют среднее $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений для значений уровней глюкозы; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки для AUC.

Таблица 42

Влияние FP2 на уровни инсулина (нг/мл) в тесте OGTT, проведенном через 14 дней введения

Введение	Доза (нмоль/кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)			Полная AUC (нг/мл/90 мин)
		0	30	90	
Носитель	Н/П	4,2 ± 0,7	12,2 ± 2,3	3,6 ± 0,5	716,1 ± 122,0
FP2	0,3	2,9 ± 0,6	5,8 ± 1,8*	2,4 ± 0,4	377,1 ± 97,3
	1,0	2,9 ± 0,4	8,2 ± 2,6	2,6 ± 0,4	491,8 ± 118,2
	3,0	3,0 ± 0,3	8,4 ± 1,5	2,5 ± 0,3	498,6 ± 77,0
	10,0	2,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5*	2,1 ± 0,4	295,5 ± 32,0
Розиглитазон	10 мг/кг в день	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2*	0,8 ± 0,1	118,5 ± 9,6*

Значения представляют среднее $\pm$ SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений для значений уровней инсулина; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки для AUC.

Таблица 43
Влияние FP2 на уровни глюкозы в крови (мг/дл) после еды

Введение	Доза (нмоль/кг)	Время после начала введения (дней)		
		0	7	13
Носитель	Н/П	162 ± 5	159 ± 6	180 ± 9
FP2	0,3	143 ± 5	150 ± 9	168 ± 9
	1,0	153 ± 12	135 ± 7	159 ± 7
	3,0	148 ± 3	127 ± 6*	151 ± 8*
	10,0	146 ± 6	136 ± 4	148 ± 3*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	137 ± 7	117 ± 4*	134 ± 6*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 44
Значение HOMA-IR после голодания у мышей DIO через 14 дней, в которые им вводили FP2 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/кг)	HOMA-IR
Носитель	Н/П	48,7 ± 9,2
FP2	0,1	30,1 ± 6,6
	1,0	30,5 ± 3,8
	3,0	31,3 ± 3,2
	10,0	22,7 ± 3,1*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	8,7 ± 1,0*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 45
Масса печени у мышей DIO через 15 дней введения FP2 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/кг)	Масса печени (г)	Масса печени (% от массы тела)
Носитель	Н/П	1,9 ± 0,1	4,3 ± 0,3
FP2	0,1	1,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1
	1,0	1,7 ± 0,0	4,2 ± 0,1
	3,0	1,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1
	10,0	1,7 ± 0,1	4,2 ± 0,1
Розиглитазон	10 мг/кг в день	1,9 ± 0,1	4,1 ± 0,2

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений.

венных сравнений.

Таблица 46

Уровни мышиног GDF15 (пг/мл) в сыворотке мышей DIO через 15 дней введения FP2 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/кг)	mGDF15
Носитель	Н/П	258,3 ± 21,4
FP2	0,1	214,1 ± 10,3
	1,0	191,6 ± 12,7
	3,0	254,5 ± 28,6
	10,0	202,0 ± 10,0
Розиглитазон	10 мг/кг в день	509,6 ± 26,2*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 47

Влияние JNJ-64739090, вводимого мышам DIO по схеме q3d, на состав тела (г), по данным МРТ

Введение	Доза (нмоль/кг)	Жировая ткань (г), день -1	Жировая ткань (г), день 13	Δ Жир (г)	Нежировая ткань (г), день -1	Нежировая ткань (г), день 13	Δ Нежировая ткань (г)
Носитель	Н/П	17,4 ± 0,6	18,2 ± 0,6	0,9 ± 0,3	25,4 ± 0,3	25,1 ± 0,3	-0,4 ± 0,2
FP2	0,3	17,0 ± 0,6	15,2 ± 0,8	-1,9 ± 0,6*	25,8 ± 0,7	24,5 ± 0,5	-1,2 ± 0,2*
	1,0	17,0 ± 0,6	14,9 ± 0,6*	-2,1 ± 0,4*	25,8 ± 0,5	24,6 ± 0,4	-1,2 ± 0,2*
	3,0	17,4 ± 0,7	15,1 ± 1,1	-2,3 ± 0,5*	25,3 ± 0,4	24,2 ± 0,4	-1,1 ± 0,1
	10,0	16,7 ± 0,6	13,2 ± 0,8*	-3,6 ± 0,5*	26,1 ± 0,6	24,5 ± 0,6	-1,7 ± 0,2*
Розиглитазон	10 мг/кг День	17,2 ± 0,6	19,1 ± 0,5	1,9 ± 0,6	25,5 ± 0,7	25,1 ± 0,6	-0,4 ± 0,2

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 48
Влияние FP2, вводимого мышам DIO по схеме q3d, на состав тела (%), по данным МРТ

Введение	Доза (нмоль/ кг)	Жировая ткань (%) , день -1	Жировая ткань (%) , день 13	Δ Жир (%)	Нежировая ткань (%) , день -1	Нежировая ткань (%) , день 13	Δ Нежировая ткань (%)
Носитель	Н/П	38,1 ± 1,0	40,1 ± 1,0	2,1 ± 0,3	55,9 ± 0,9	55,3 ± 0,9	-0,6 ± 0,3
FP2	0,3	37,6 ± 1,2	36,3 ± 1,3	-1,3 ± 0,9*	56,8 ± 1,3	59,0 ± 1,4	2,2 ± 0,8
	1,0	37,2 ± 1,1	35,8 ± 0,9	-1,4 ± 0,5*	56,7 ± 1,1	59,5 ± 1,0	2,8 ± 0,6*
	3,0	38,3 ± 1,4	36,1 ± 2,0	-2,3 ± 0,7*	55,9 ± 1,2	58,7 ± 2,0	2,8 ± 0,8*
	10,0	36,9 ± 1,1	33,1 ± 1,5*	-3,8 ± 0,8*	57,5 ± 1,0	61,7 ± 1,4*	4,2 ± 0,7*
Розиглипта зон	10 мг/кг День	38,0 ± 1,2	41,1 ± 0,9	3,1 ± 0,9	56,2 ± 1,2	53,9 ± 0,8	-2,3 ± 0,8

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* p<0,05, по сравнению с носителем в контроле.

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений.

Таблица 49
Воздействия FP2 в сыворотке (нМ) в ветви ФК исследования у мышей DIO, получавших введение по схеме q3d

Группа введения	Идентификатор субъекта	Время после введения начальной дозы (время после введения последней дозы)						
		День 3	День 6	День 9	День 12	День 14 (48 ч.)	День 15 (72 ч.)	День 17 (120 ч.)
0,1 нмоль/ кг	9	1,930	2,993	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	10	1,853	3,369	2,817	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	1,715	2,637	2,568	2,709	3,441	1,313	< LOQ
1,0	9	8,198	9,660	9,645	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
нмоль/ кг	10	7,073	10,595	8,966	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	6,689	13,967	10,802	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3,0 нмоль/ кг	9	20,802	26,329	27,863	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	10	23,563	32,020	41,576	1,168	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	21,704	30,101	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
10,0 нмоль/ кг	9	28,495	33,050	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	10	70,779	112,898	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	70,404	111,767	55,117	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Данные выражены в виде концентрации у каждого животного.

< LOQ=ниже предела количественного определения; LOQ=0,494 нМ.

** Значения в 3, 6, 9 и 12-й дни непосредственно перед введением следующей дозы.

Таблица 50
Терминальные воздействия FP2 в сыворотке (нМ) у мышей DIO через 15 дней введения по схеме q3d

Идентификатор животного	Группа введения (нмоль/кг)			
	0,1	1,0	3,0	10,0
1	2,567	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	44,149
3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
4	1,144	0,678	< LOQ	< LOQ
5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
6	3,440	< LOQ	< LOQ	< LOQ
7	2,727	< LOQ	< LOQ	< LOQ
8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Данные выражены в виде концентрации у каждого животного.

< LOQ=ниже предела количественного определения; LOQ=0,494 нМ.

Пример 18. Фармакокинетика FP2 у различных видов животных и иммунный ответ.

Фармакокинетика у мышей.

Фармакокинетические свойства FP2 оценивали путем подкожного введения самкам мышей линии C57BL/6. FP2 вводили подкожно (n=5 проб на каждый момент времени) и внутривенно (n=5 проб на каждый момент времени) самкам мышей линии C57BL/6 (Sage Laboratories, г. Сент-Луис, штат Миссури, США) при уровне дозы 2,0 мг/кг в PBS (pH 7,3-7,5). В последний момент времени отбирали пробы терминальной крови. В течение 168 ч отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Уровни FP2 измеряли методом иммуноанализа. Профили концентрации лекарственного средства в плазме сведены в табл. 51 и 52, и показаны на фиг. 25.

Фармакокинетический анализ показал, что терминальный период полужизни FP2 у мышей линии C57BL/6 после внутривенного и подкожного введения составил ~ 1,51 и 1,76 дня, соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~ 61%.

Таблица 51

Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения подкожно (п/к) мышам линии C57BL/6

	FP2, доза, подкожно						
Момент времени	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Средний результат	Станд. откл.
	31	32	33	35	36	(нг/мл)	(нг/мл)
	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)		
4 ч.	11310,11	6323,44	23489,21	4357,74	4835,54	10063,21	7995,0
24 ч.	12378,58	10 896,80	17 769,03	15928,14	15404,08	14 475,33	2785,0
72 ч.	5127,95	5569,27	6727,37	7909,66	7550,32	6576,91	1210,5
96 ч.	3059,83	3350,25	4042,04	4095,15	4431,94	3795,84	569,0
168 ч.	784,61	1202,66	1364,68	1557,60	1678,02	1317,51	348,9

Таблица 52

Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения внутривенно (в/в) мышам линии C57BL/6

Момент времени	FP2, доза, внутривенно					Средний результат (нг/мл)	Станд. откл. (нг/мл)
	Результат животного 37	Результат животного 40	Результат животного 41	Результат животного 45	Результат животного 48		
	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)		
1 ч.	49573,59	42382,59	40001,18	43085,75	46443,59	44297,34	3742,9
24 ч.	22173,85	19120,39	19393,78	19798,29	17459,96	19589,25	1696,7
72 ч.	8334,33	7989,10	8573,44	9086,37	8186,68	8433,98	422,5
96 ч.	4478,83	4699,80	4749,93	5331,39	4579,08	4767,81	332,3
168 ч.	1044,24	1419,64	1393,44	1835,63	979,49	1334,49	343,6

Таблица 53

Фармакокинетические параметры FP2 после введения внутривенно в дозе 2 мг/кг и подкожно в дозе 2 мг/кг мышам линии C57BL/6

Путь введения		$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/день/ кг)	Vz или Vz/F (мл/кг)	C_{max} (нг/мл)	T_{max}^* (дни)	AUC _{0-посл.} (дни* нг/мл)	AUC _{0-inf} (дни* нг/мл)
Подкожно	Среднее	1,76	43	108	15619	1	44972	48379
	CO	0,16	8	20	4870		8563	9147
Внутривенно	Среднее	1,51	25	55	44297	0,042	76 269	79253
	CO	0,18	1	6	3743		3788	4051

Фармакокинетика у крыс.

FP2 вводили подкожно (n=5 проб на каждый момент времени) и внутривенно (n=5 проб на каждый момент времени) самкам крыс линии Спрег-Дуоли (Sage Laboratories, г. Сент-Луис, штат Миссури, США) при уровне дозы 2,0 мг/кг в PBS (pH 7,3-7,5). В последний момент времени отбирали пробы терминальной крови. В течение 168 ч отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Уровни FP2 измеряли методом иммуноанализа. Профили концентрации лекарственного средства в плазме сведены в табл. 54 и 55, и показаны на фиг. 26. Фармакокинетические параметры, рассчитанные на основании этих данных, сведены в табл. 56.

Фармакокинетический анализ FP2 у крыс линии Спрег-Дуоли показал, что терминальный период полужизни после внутривенного и подкожного введения составил ~ 1,46 и 1,37 дня, соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~ 28%.

Таблица 54

Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения подкожно (п/к) крысам линии Спрег-Дуоли

FP2, доза, подкожно							
Момент времени	Результат животного 01	Результат животного 02	Результат животного 03	Результат животного 04	Результат животного 05	Средний результат	Станд. откл.
	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)
4 ч.	730,95	257,94	469,95	496,34	400,65	471,16	172,2
24 ч.	9236,27	6658,79	7728,92	7449,56	6502,60	7515,23	1092,1
72 ч.	4559,04	4464,72	5619,82	4287,25	3844,15	4555,00	655,6
96 ч.	2791,97	2452,35	3387,55	2316,06	2176,00	2624,79	483,8
168 ч.	622,32	606,36	< 80,00	514,19	476,49	554,84	70,7

Таблица 55

Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения внутривенно (в/в) крысам линии Спрег-Дуоли

FP2, доза, внутривенно							
Момент времени	Результат животного 06	Результат животного 07	Результат животного 08	Результат животного 09	Результат животного 10	Средний результат	Станд. откл.
	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)
1 ч.	60 785,80	47 392,80	43 046,54	46 014,25	44 547,65	48 357,41	7134,5
24 ч.	25 470,36	24 729,88	21 157,29	20 497,32	21 459,71	22 662,91	2267,1
72 ч.	8208,46	9262,13	8866,76	8635,93	8843,83	8763,42	384,1
96 ч.	4433,18	4833,22	4995,63	4630,60	4604,13	4699,35	218,1
168 ч.	1083,14	1469,35	1614,61	1394,17	1053,89	1323,03	245,7

Таблица 56

Фармакокинетические параметры FP2 после введения внутривенно в дозе 2 мг/кг и подкожно в дозе 2 мг/кг крысам линии Спрег-Дуоли

Путь введения		$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/день/ кг)	Vz или Vz/F (мл/кг)	C_{max} (нг/мл)	T_{max}^* (дни)	AUC _{0-посл.} (дни* нг/мл)	AUC _{0-inf} (дни* нг/мл)
Подкожно	Среднее	1,37	84	165	7515	1	22 614	24 036
	CO	0,04	10	17	1092		2509	2893
Внутривенно	Среднее	1,46	23	49	48 357	0,042	83 271	86 089
	CO	0,12	2	6	7135		6081	5820

Фармакокинетика у обезьян.

FP2 вводили подкожно в дозе 1 мг/кг и внутривенно в дозе 1 мг/кг трем самкам яванского макака

каждому, в PBS (рН 7,0-7,6). В течение 21 дня отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства.

Фармакокинетические (ФК) параметры FP2 характеризовали после введения яванским макакам однократной дозы внутривенно (1,0 мг/кг) и подкожно (1,0 мг/кг). Зависимость концентрации лекарственного средства в плазме от времени после введения подкожно, по данным иммуноанализа и ЖХМС, сведена в табл. 57 и 58, соответственно, а после введения внутривенно, по данным иммуноанализа и ЖХМС, сведена в табл. 59 и 60, соответственно. Данные иммуноанализа представлены в виде графика на фиг. 27, а данные ЖХМС представлены на фиг. 28.

Исходя из результатов иммуноанализа, среднее значение терминального периода полужизни ($t_{1/2}$) FP2 после внутривенного и подкожного введения на основании NCA составило $\sim 7,05$ и $\sim 8,51$ дня, соответственно. Средние ФК параметры после внутривенного и подкожного введения сведены в табл. 61. Исходя из результатов иммунологического биоанализа, среднее расчетное значение терминального периода полужизни ($t_{1/2}$) FP2 после внутривенного и подкожного введения на основании модели без компартментов составило 7,05 и 8,51 дня, соответственно. Средняя биодоступность (F%) FP2 у яванских макаков после подкожного введения согласно расчетам на основании AUC_{0-last} составила 98,5%, а согласно расчетам на основании AUC_{0-inf} составила 109,2%.

Таблица 57

Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макаков после однократного введения подкожно, по данным иммуноанализа

Время (ч.)	Иммуноанализ			Сред. , подкожное введение	Станд. откл.
	Животное 704	Животное 705	Животное 706		
0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	Н/П
6	7365,3	6128,5	6056,9	6516,9	735,6
24	19 716,8	10 903,8	10 554,7	13 725,1	5191,9
48	18 191,7	14 353,7	14 464,7	15 670,0	2184,5
72	17 813,9	14 207,5	12 684,0	14 901,8	2634,5
120	13 823,9	11 445,8	10 590,8	11 953,5	1675,3
168	12 359,6	10 103,8	9467,8	10 643,8	1519,7
240	9457,9	7642,6	8109,1	8403,2	942,7
336	6796,8	5679,8	5235,7	5904,1	804,3
432	5581,3	3830,6	3746,5	4386,1	1035,9
528	4126,2	2613,4	2879,3	3206,3	807,7

Н/П - не применимо.

Таблица 58

Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макаков после однократного введения подкожно, по данным ЖХМС

Время (ч.)	ЖХМС			Сред. , подкожное введение	SEM
	Животное 704	Животное 705	Животное 706		
0	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	Н/П
6	6110,0	5910	6200,0	6073,3	85,7
24	#	10 420,0	11 300,0	10 860,0	359,3
48	16 560,0	13 510,0	14 960,0	15 010,0	880,8
72	13 690,0	13 450,0	13 380,0	13 506,7	93,9
120	11 040,0	#	#	11 040,0	Н/П
168	#	8680,0	9400,0	9040,0	293,9
240	6940,0	7070,0	7140,0	7050,0	58,6
336	4400,0	4580,0	4430,0	4470,0	55,7
432	-	2910,0	-	2910,0	Н/П
528	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	Н/П

- =не удалось выполнить анализ в первый раз, пробы недостаточно для повторного анализа.

=неправильно маркированная пробирка, проба исключена из анализа.

Н/П - не применимо.

Таблица 59

Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макак после однократного введения внутривенно, по данным иммуноанализа

Время (ч.)	Иммуноанализ			Сред. , внутривенно е введение	Станд. откл.
	Животное 701	Животное 702	Животное 703		
0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	Н/П
1	29 938,3	31 139,0	23 545,3	28 207,6	4082,0
6	24 711,9	21 173,0	20 434,4	22 106,4	2286,5
24	19 648,4	21 420,9	8662,7	16 577,3	6911,3
48	17 790,1	17 107,0	12 983,1	15 960,0	2600,7
72	17 889,4	13 871,1	13 692,4	15 151,0	2373,3
120	15 298,6	11 982,5	11 361,5	12 880,9	2116,7
168	11 752,0	10 982,8	9933,8	10 889,5	912,7
240	8921,1	7465,0	6733,4	7706,5	1113,6
336	6572,8	5750,5	4687,6	5670,3	945,1
432	1099,6	3425,0	3458,0	2660,9	1352,2
528	< 80,0	2069,0	2416,2	2242,6	Н/П

Н/П - не применимо.

Таблица 60

Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макак после однократного введения внутривенно, по данным ЖХМС

Время (ч.)	ЖХМС			Сред. , внутривенное введение	SEM
	Животное 701	Животное 702	Животное 703		
0	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	Н/П
1	25 340,0	28 820	26 220,0	26 793,3	1044,7
6	24 610,0	26 340,0	23 810,0	24 920,0	746,6
24	18 410,0	18 680,0	9810,0	15 633,3	2912,7
48	16 290,0	17 370,0	13 840,0	15 833,3	1044,3
72	15 430,0	14 920,0	14 280,0	14 876,7	332,7
120	11 180,0	11 480,0	11 440,0	11 366,7	94,0
168	9170,0	#	#	9170,0	Н/П
240	6800,0	7380,0	7600,0	7260,0	238,6
336	2870,0	3860,0	3480,0	3403,3	288,3
432	-	-	3030,0	3030,0	Н/П
528	1150,0	1680,0	1400,0	1410,0	153,1

-#не удалось выполнить анализ в первый раз, пробы недостаточно для повторного анализа.

Н/П - не применимо.

#=неправильно маркированная пробирка, проба исключена из анализа.

Таблица 61

Среднее значение ($\pm$ CO) фармакокинетических параметров FP2 после внутривенного и подкожного введения яванским макакам в дозе 1 мг/кг

Путь введения		$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/день/кг) ()	Vz или Vz/F (мл/кг)	C _{max} (нг/мл)	T _{max} * (дни)	AUC _{0-посл.} (день*нг/мл)	AUC _{0-inf} (день*нг/мл)
Подкожно	Среднее	8,51	4,6	56	16178	1,67	180792	221032
	CO	1,28	0,8	7	3065		29990	44931
Внутривенно	Среднее	7,05	4,9	51	28208	0,042	183468	202380
	CO	1,45	0,2	12	4082		18268	9617

ФК параметры представляют собой средние значения ФК по данным иммуноанализа, на основании

NCA.

*Tmax (медиана).

Анализ стабильности в человеческой плазме.

Стабильность FP2 исследовали в свежей гепаринизированной плазме ex vivo при 37°C в течение до 48 ч. Свежую незамороженную человеческую плазму получали из гепаринизированной крови двух субъектов (одного мужчины и одной женщины) путем центрифугирования. FP2 инкубировали в этой матрице при температуре 37°C с осторожным перемешиванием в течение 0, 4, 24 и 48 ч. Концентрацию FP2 определяли методом иммуноанализа. Количественное определение концентрации интактного димера в этой матрице при условиях анализа проводили методом независимого иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

По данным иммуноанализа коэффициент извлечения в процентах от исходной концентрации варьировал в интервале 104,8-94,1 и не уменьшался с течением времени, доказывая, что FP2 стабилен в человеческой плазме ex vivo в течение до 48 ч (фиг. 29 и табл. 62). По данным ЖХМС, концентрация оставалась стабильной во времени, доказывая, что JNJ-64739090 остается в человеческой плазме ex vivo в виде интактного димера в течение до 48 ч (фиг. 30 и табл. 63).

Таблица 62

Стабильность FP2 в человеческой плазме ex vivo (нг/мл) (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 ч, по данным иммунологического анализа

Композиция	Пол	Время (ч.)	Концентрация (нг/мл)	Нормализованное извлечение в процентах
FP2	женщина	0	9104	100,0
		4	9056	99,5
		24	9332	102,5
		48	9374	103,0
	мужчина	0	9473	100,0
		4	9929	104,8
		24	9081	95,9
		48	8912	94,1

Таблица 63

Стабильность FP2 в человеческой плазме ex vivo (нг/мл) (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 ч, по данным интактной ЖХМС

Композиция	Пол	Время (ч.)	Концентрация (нг/мл)	Нормализованное извлечение в процентах
FP2	Жен.	0	11 090	100,0
		4	10 830	97,7
		24	10 500	94,7
		48	10 030	90,4
	Муж.	0	10 760	100,0
		4	9640	89,6
		24	10 190	94,7
		48	8500	79,0

Пример 19. Эффективность FP1 и FP2 у яванских макак.

Были оценены влияния FP1 и FP2 на потребление пищи и массу тела после введения однократной дозы у новых яванских макак.

FP1 подкожно вводили группе новых яванских макак в трех разных уровнях доз: 1, 3 и 10 нмоль/кг. Также в исследование включили группу, получавшую носитель. Животным вводили препарат по слепому методу. Исследование продолжалось в целом 6 недель: в течение 2 недель измеряли исходные уровни потребления пищи и собирали данные, и в течение 4 недель собирали данные после одноразового введения композиции. Воздействия лекарственного препарата в плазме измеряли на 1, 7, 14, 21 и 28-й день после введения.

Введение яванским макакам однократной дозы FP1 приводило к снижению потребления пищи и массы тела, по сравнению с носителем в контроле (фиг. 32-33). Значительное снижение суточного потребления пищи наблюдали на 4, 5, 6 и 8-12-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (фиг. 32). Среднее суточное потребление пищи за неделю значительно снизилось на 2-й неделе после введения уровня дозы 10 нмоль/кг. При уровне дозы 3 нмоль/кг наблюдали острое значительное процентное снижение среднего

потребления пищи за неделю на 2-й неделе после введения дозы, по сравнению с потреблением до введения дозы, а при уровне дозы 10 нмоль/кг наблюдали значительное процентное снижение среднего потребления пищи за неделю на 1-й и 2-й неделях после введения дозы, по сравнению с потреблением до введения дозы. Значительное процентное снижение массы тела по сравнению с 0-м днем наблюдали на 28-й день при уровне дозы 3 нмоль/кг, и на 14, 21 и 28-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (фиг. 33).

FP2 подкожно вводили группе новых яванских макаков в трех разных уровнях доз: 1, 3 и 10 нмоль/кг. Также в исследование включили группу, получавшую носитель. Животным вводили препарат по слепому методу. Исследование продолжалось в целом 11 недель: в течение 5 недель измеряли исходные уровни потребления пищи и собирали данные, в течение 1 недели вводили препарат, и в течение 5 недель собирали данные о стадии выведения. Воздействия лекарственного препарата в плазме измеряли на 1, 7, 14, 21, 28, 35 и 42-й дни после введения.

Введение яванским макакам однократной дозы FP2 приводило к снижению потребления пищи и массы тела, по сравнению с носителем в контроле (фиг. 34-35). Значительное снижение суточного потребления пищи наблюдали на 3, 5-8, 10 и 12-й дни при уровне дозы 3 нмоль/кг, и на 3-38 и 40-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (фиг. 34). Среднее суточное потребление пищи за неделю значительно снизилось на 1-й неделе после введения дозы 3 нмоль/кг, и значительно снизилось на 1-6-й неделях после введения дозы 10 нмоль/кг. При уровне дозы 3 нмоль/кг наблюдали значительное процентное снижение среднего суточного потребления пищи за неделю на 2-й неделе после введения дозы, по сравнению с потреблением до введения дозы, а при уровне дозы 10 нмоль/кг наблюдали значительное процентное снижение среднего суточного потребления пищи за неделю на 1-6-й неделях после введения дозы, по сравнению с потреблением до введения дозы. Значительное процентное изменение массы тела по сравнению с 0 днем наблюдали на 21-42-й дни при уровне дозы 1 нмоль/кг, на 14-42-й дни при уровне дозы 3 нмоль/кг, и на 7-42-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (фиг. 34).

Пример 20. Гетеродимер HSA-GDF15:GDF15.

Было проведено исследование биоактивности гетеродимера HSA-GDF15:GDF15.

Для создания гетеродимера HSA-GDF15:GDF15 были разработаны два конструкта. Первый конструкт содержал HSA, соединенный с N-концом зрелого GDF15 (AA 203-308) посредством глицин-серинового линкера (SEQ ID NO: 93). Второй конструкт содержал меченный бх гистидином HSA, соединенный с N-концом зрелого GDF15 (AA 197-308) посредством глицин-серинового линкера и сайта расщепления протеазы HRV3C (SEQ ID NO: 94). Эти плазмиды котрансфицировали в соотношении 1:1 в системе Expi293™ Expression (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Пептиды секретировались как белки HSA-GDF15, включая гетеродимерную и гомодимерную формы, в которых мономеры связывались посредством дисульфидных мостиков.

Супернатанты с клеточных культур временно трансфицированных клеток Expi293™ собирали через 5 дней после трансфекции, осветляли центрифугированием и стерилизовали фильтрованием (0,2 мкм, мембрана PES, Corning). Осветленные супернатанты загружали в колонку HisTrap HP (GE Healthcare), уравновешенную раствором 20 mM фосфата натрия, 500 mM NaCl с pH 7,4. После загрузки несвязанный белок удаляли путем промывания колонки уравновешивающим буферным раствором. Белки HSA-GDF15, включая гетеродимерную и гомодимерную формы, связывались в колонке и элюировались раствором 20 mM фосфата натрия, 150 mM имидазола с pH 7,4. Фракции элюата объединяли и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C в присутствии меченного бх гистидином фермента HRV3C (компания Janssen) для получения гетеродимера HSA-GDF15:GDF15. После инкубации раствор белка диализовали в уравновешивающем буферном растворе для удаления имидазола, а затем еще раз пропускали через колонку HisTrap HP. Гетеродимер HSA-GDF15:GDF15, элюировали раствором 20 mM фосфата натрия, 50 mM имидазола с pH 7,4 на этапе промывания, при этом меченные гистидином белки удерживались. Гетеродимер дополнительно подвергали очистке методом эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) уравновешенной в 1x DPBS, pH 7,2. Фракции элюата из колонки SEC, содержащие HSA-GDF15:GDF15 высокой чистоты (по данным SDS-PAGE) объединяли и фильтровали. Концентрации белка определяли по поглощению при 280 нм на спектрофотометре BioTek SynergyHTTM. Качество очищенных белков оценивали методами SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Ultimate 3000). Уровни эндотоксина измеряли методом LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod). Очищенный белок хранили при 4°C.

Клетки SK-N-AS (ATCC), стабильно экспрессирующие рецептор GDF15 (GFRAL), за 24 ч перед анализом высевали в среду для выращивания (10% FBS) в планшете на 96 лунок. Через 24 ч клетки истощали в течение 3 ч в инкубаторе при температуре 37°C, для чего среду культивирования заменяли на 200 мкл эссенциальной среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с добавлением 1% лошадиной сыворотки HI. Затем среду с добавлением 1% лошадиной сыворотки HI заменяли на 200 мкл AB1 и дополнительно инкубировали в течение 2 ч в инкубаторе при температуре 37°C. При проведении анализа изо всех лунок аспирировали AB1, добавляли 100 мкл исследуемой композиции в разных концентрациях в AB2, после чего планшет инкубировали в течение 15 мин в инкубаторе при температуре 37°C. Через 15 мин исследуемый раствор извлекали и добавляли 30 мкл лизирующего буфера (содержит-

ся в наборе для обнаружения), планшет встряхивали на планшетном шейкере при комнатной температуре в течение 30 мин. Для обнаружения, 16 мкл лизированной пробы переносили в планшет для анализа на 384 лунки и добавляли 4 мкл детекторных антител HTRF pAKT. Планшет инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, а затем считывали сигнал HTRF на приборе Envision (Perkin Elmer).

Значения ЕС₅₀ рассчитывали методом нелинейной регрессии (подгонки кривой) с помощью программного приложения GraphPad Prism®. Данные представляли как среднее ± стандартная ошибка (СО) по трем отдельным экспериментам, с тремя повторностями на каждую точку данных. Молекулярную идентичность гетеродимера HSA-GDF15:GDF15 подтверждали методом масс-спектрометрии. Сдвиг кривой гетеродимера влево указывает на то, что гетеродимер HSA-GDF15:GDF15 обладает большей мощностью в индуцировании pAKT по сравнению с соответствующей молекулой гомодимера с дополнительным альбумином.

Пример 21. Термостабильность линкера.

Исследовали термостабильность для различных линкеров, соединяющих HSA и GDF15. Для оценки способности к фрагментированию и образованию агрегатов гибридные белки HSA-GDF15 с разными линкерами разводили до концентрации 10 мг/мл. После добавления ЭДТА и метионина пробы инкубировали при температуре 40°C в течение 14 дней. Затем пробы разводили до концентрации 1 мг/мл и оценивали методом эксклюзионной/высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-ВЭЖХ). В этих белках количественно определяли процентное содержание интактного белка, а также фрагментов и агрегатов. В табл. 64 показано, что белки HSA-GDF15 с линкерами, состоящими из повторов AP, наиболее устойчивы к фрагментированию в условиях тепловой нагрузки.

Чтобы оценить, влияют ли эти линкеры на взаимодействие GDF15 с его рецептором, проводили иммунный анализ, при котором на планшет наносили гибридный белок GFRAL-Fc и определяли анти-GDF15 или анти-HSA с использованием моноклональных антител к GDF15 (Janssen) и к HSA (Kerafast, Inc., г. Бостон, штат Массачусетс, США). Анализ показал, что все эти варианты линкеров, представленные в табл. 6б, связываются с рецептором схожим образом.

Таблица 64

Результаты эксклюзионной/высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-ВЭЖХ) после тепловой нагрузки в течение 14 дней

SEQ ID NO	Линкер	Агрегаты (%)	Интактные (%)	Фрагменты (%)
113	GS (GGGGS) ₈	3, 33	84, 44	12, 22
115	GA (GGGGA) ₈	3, 51	87, 98	8, 5
117	(AP) ₁₀	1, 64	98, 36	0
119	(AP) ₁₂	2, 36	97, 64	0
121	GGG- (EGKSSGSGSESKST) ₃ -GGG	1, 67	85, 24	13, 09
123	GS (PGGGS) ₈	2, 96	88, 12	8, 91
125	GS (AGGGS) ₈	3, 44	86, 22	10, 34
127	GGG- (EGKSSGSGSESKST) ₂ -GGG	1, 71	91, 17	7, 12

Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации, без отступления от существа и объема настоящего изобретения.

Последовательности, на которые в настоящей заявке приводятся ссылки, представлены ниже в таблице:

WT - дикий тип

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Человеческий сывороточный альбумин, WT (HSA)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQQCFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL
2	Вариант HSA, C34S	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLCADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV

		ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL
3	Вариант HSA, C34A	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQAFFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL
5	HSA (C34S) – GS (GGGS) ₄ – GDF15 (WT) гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGGGGGGGGGGGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI
6	Зрелый GDF15 (197–308)	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLA KDCHCI
7	Усеченный зрелый GDF15 (200–308)	GDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDC HCI
8	Усеченный зрелый GDF15 (201–308)	DHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM HAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCH CI
9	Усеченный зрелый GDF15 (202–308)	HCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM AQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHC I
10	Усеченный зрелый GDF15 (203–308)	CPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA QIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI

11	Усеченный зрелый GDF15 (211-308)	CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI
25	HSA (C34S) - AS (GGGGS) ₂ GT - -GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEAEKGKLVASQAAL GLASGGGGSGGGSGTARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPR EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQ KTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI
26	HSA (C34S) - AS (GGGGS) ₅ GT - GDF15 (WT)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEAEKGKLVASQAAL GLASGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGTARNGDHC PLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI
27	HSA (C34S) - AS (AP) ₅ GT - GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEAEKGKLVASQAAL GLASAPAPAPAPAGTARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPR

		EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNFMVLIQ KTDGTGVSQTYYDDLAKDCHCI
28	HSA (C34S) AS (AP) ₁₀ GT - GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASAPAPAPAPAPAPAPAPAPGTARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDL GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNFMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLAKDCHCI
29	HSA (C34S) - AS (AP) ₂₀ GT - GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGTARNGDHC PLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNFMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLAKDCHCI
30	HSA (C34S) - AS (EAAAK) ₄ GT - GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGTARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDL

		GWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI
31	HSA (C34S) - AS (EAAA) ₈ GT- GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAASQAAL GLASEAAKEAAKEAAKEAAKEAAKEAAKEAAKEAAKEAAKEAAKGTARNGDHC PLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI
36	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 гибрид (мутант, делеция 13)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSGGSGSRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTG VSLQTYDDLLAKDCHCI
37	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 гибрид (мутант, делеция 14)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSGGSGSRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTM

		CIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS SLQTYDDLAKDCHCI
40	HSA (C34S) – GS (GGGGS) ₄ – GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI
48	HSA (C34A) – GS (GGGGS) ₄ –GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQAPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI
55	HSA (C34A) – GS (GGGGS) ₈ – GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQAPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRLLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEAEKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPL

		GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIK TSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLAKDCHCI
56	HSA (C34A) - (AP) ₁₀ - GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVC KN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTL EKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLAPAPAPAPAPAPAPAPAPARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYN PMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLAKDCHCI
59	HSA (C34S) - (AP) ₁₀ - GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVC KN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTL EKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLAPAPAPAPAPAPAPAPAPARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYN PMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLAKDCHCI
60	HSA (C34S) - GS- (GGGS) ₈ - GDF15 (WT)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFT ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVC KN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTL EKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPL

		GPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIK TSLHRLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
64	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (I89R)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPAS YNPMVLQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
65	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ -GDF15 (I89W)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPAS YNPMVLWQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
66	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (L34A, S35A, R37A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW

		ADWVAAPAEVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
67	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (V87A, I89A, L98A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMALAQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
68	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (L34A, S35A, I89A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVAAPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLAQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
69	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (V87A, I89A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGSGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW

		ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMALAQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
70	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (Q60W)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTL EKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
71	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (W32A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTL EKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADAVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
72	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLLR LAKTYETTL EKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA

		ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
73	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (Q60A, S64A, R67A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKCSLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAAIKTALHALKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
74	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (W29A, Q60A, I61A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKCSLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA AAKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
75	HSA (C34S) - GS (GGGS) ₄ - GDF15 (W29A, W32A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRPVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAQRLKCSLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCNK YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA

		ADAVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAFCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI
76	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 5	gacgcccaagagcgaggtggccaccggttcaaggacctggcgaggagaa cttcaaggccctggtgctgatcgcttcgccagtagctgcagcagtcacct tcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagacctgcacacctgttcgg cgacaagctgtgcacctggccacctgcgggagacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacgagtgcttcctgcagcacaag gacgacaacccccacctgccccggtggtgctggcccgaggtggacgtgatgtg cacgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgaga tcgccccggcgccccctacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaag cggtacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgacgacaaggccgctg cctgctgcccaagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgcca agcagcggtgaagtgcgcagcctgcagaagttcggcgagcgggccttaag gcctggcgctggcccgctgagccagcggttccccaggccgagttcgccga ggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacg gcgacctgctggagtgcccgacgacggggccgacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagccccct gctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccg acctgcccagcctggcccgacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaac tacgcccagggccaaggacgtgttcctgggcatgttcctgtacgagtagccccg gcggcaccgactacagcgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacg agaccacctggagaagtgctgcgcgcccgcgacccccacgagtgctacgcc aaggtgttcgacgagttcaagccccgtggtggaggagccccagaaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtagaagttccagaacgccc tgctggtgcggtacaccaagaaggtgccccaggtagcaccgccccctggtg gaggtgagccggaacctgggcaaggtggcgacgaagtgtgcaagcaccgga ggccaagcggatgccctgcgcgaggactacctgagcgtggtgctgaaccagc tgtgcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgacgggtgaccaagtgctgc accgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacga gacctacgtgcccaaggagttcaacgcccagacaccttcaccttccacgcccaca tctgcacctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgacctggtg gagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgat ggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgcccagaggaggcaagaagctggtggccgcccagccaggccgctg ggcctgggcagcgggcgggcggcgagcgccggcgatctggtggaggtgg cagtgaggagggggatccgctcgcaacggtgacctgccccctggttctg gtcgtgctgccgctgcacaccttcgcttctctggaagacctgggttgg gctgactgggttctgtctcctcggaagttcaggttaccatgtgcatcggtgc ttgccccttctcagttccgctgctaacatgacgctcagatcaaaacctctc tgacccgctgaaacctgacaccttcctgctcctgctgctgcttctctct tacaacctatggttctgatccagaaaaccgacacgggtgttctctcgagac

		ctacgacgacctgctggctaaagactgccactgcatc
77	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 25	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcggaagaaaa ttttaaggccctcgcttattcgcccttcgccaataacctccagcagtcgccgt tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgccgagaactgcgacaagacctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcacgctcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctcgcaaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaacctaaacttgctcgccctggccgacctgaggtcgacgtgatgtg caccgcttccacgacaacgaggaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgctcgaggagcacccttatttctacgccccgaactgtgttcttcgccaag cggtaacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgagataaggcggcttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctcgatgaggggaaggcgtcctccgcta agcagcggctgaaatgtcgagcctccagaagttcggggagcgccttcaag gcctgggcccgtggcgccgctgtctcaacggttccgaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcacgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcacg gcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaaatgctgcgaaaagccctt gctgaaaagtcccaactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgccgcgcg acctccgctccctggccgcccgttctgtgagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaagacgtgttcctgggaatgttctgtatgagtagcccg ccgcccacccgactactcggtcgtgctcctgctgctgacgtggcaagacctacg aaaccactctggagaagtgtcgccgcccggagcccgacagagtgtctacgca aaggtgttcgacgagttcaagccactgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctggagagtagacaaattccagaacgcgc ttctcgtgctacaccaagaaggccccccaggtgtccactccgacctgggtg gaagtgtccaggaacctgggaaggctcggtccaagtgttgcaagcatcccga ggctaagcgcatgccctgcgcgaggactactgtccgtggtgctgaatcagc tgtcggtgtccatgaaaagacccagtggtccgacagagtaccaagtgtgtg accgaatcgctcgtgaaccggcgccgtgcttttccgcactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaaccttcacttccacgcccga tctgcaactgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctgggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgcgcccttcgtggaaaagtgttgtaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgccaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggcctcgctagcgggtggagggggcagcgggtggaggatccggtaccgcgcg caacggggaccactgtccgctcgggcccggcggtgtgctgccgtctgcacacgg tccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggcccgatgggtgctgtcgccacgg gaggtgcaagtgaacctgtgcatcggcgcgtgcccgagccagttccgggcggc aaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcacgcctgaagcccgaacgg tgccagcgcctgctgctgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaa aagaccgacacgggggtgtcgctccagacctatgatgactgttagccaaaaga ctgccactgcata

78	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 26	gatgctcataagtcggaagtcgcccacagattcaaggacctcggaagaagaaa ttttaaggccctcggtcttatcgcccttcgcccataacctccagcagtcgccgt tcgaggaccacgtgaagctcggtgaacgaagtgaaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgcccagaaactcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcacgctcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgctcgccctggctccgcccctgaggtcgacgtgatgtg caccgctgtccacgacaacgaggaaacctttcttaagaagtacgtgtacgaga ttgctgaggagcacccttattctacgccccgaactgtgttcttcgccaag cggtaacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgacgataaaggcggttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctgctgaggggaaggcgtcctccgcta agcagcggctgaaatgtgcgagcctccagaagtgcggggagcgcgcttcaag gcctgggcccgtggcgccgtgtctcaacgggtccgaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctgggtcacgacgtgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcacg gcgatctgctggaatgcgcccgtgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaagctgaaggatgctgcgaaaagccctt gctggaagagtcctactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgcg acctccgctccctggccgcccgtttctgtgagtcgaaggatgtgtgcaagaac taacgagaagccaaggacgtgttctggtgaatgtttctgtatgagtagcccg ccgcaaccccgactactcggtcggtcctcgtcgactggcaaaagacctacg aaaccactctggagaagtgtgcgcccgcgaggaccgcacgagtgctacgca aaggtgttcgacgagttcaagccaattgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagatacaaatccagaacgcgc ttctcgtgcgctacaccaagaagggtccccagggttccactccgacctgggtg gaagtgtccaggaaacctgggaagggtcggtccaagtgttgcaagcatcccga ggctaagcgcatgccctgcgcccaggactactgtccgtggtgctgaatcagc tgtgctgctccatgaaaagacccagtggtccgacagagtgaccaagtgtgt accgaatcgctcgtaaccggcgccgtgttttccgactggagggtgacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcaactttccacgcccaca tctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgcctggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgccccttcgtggaaggtgttgtaagcggacgacaaggaga cttgcttcgccaagaaggaaagagctcggtggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgtacgagggtggcggtcaggtggcgaggtagcgggtgaggcgg ctctggcgagggtgatcaggcgaggaggttcgggtggaggaggtcaggag gaggaggaagtggaggaggggatccggtaccgctcgcaacggggaccactgt ccgctcgggcccggcggtgtgctgctgtgcacaggtccgctgctgctgga agacctgggctgggcccgttggtgctgtgcgacgggaggtgcaagtacca tgtgcatcggcgctgcccagccagttccggggcgcaaacatgcacgcgag atcaagacgagcctgacccgctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctg cgtgcccgccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacccggg tgtcgtccagacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata
----	--	--

79	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 27	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagaagaaaa ttttaaggccctcgtgcttatcgcttcgcccatacctccagcagtcgccgt tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagactgt gtggcgatgaatccgccgagaactgcgacaagacctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaacctaaactgcctcgctggctccgccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcttccacgacaacgaggaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgcgaggaggcacccttatttctacgccccgaactgtgttcttcgccaag cggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgacgataaggcggttg cctgctgccgaagctcgacgagttgcgcatgaggggaagcgctcctccgcta agcagcggtgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgcgcttcaag gcctgggcccgtggcgcgctgtctcaacgggtcccgaaggccgagttcgcca agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtcacg gcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaaccaggacagcatttctgcaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaagagtcactgcacgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctccgctcctggccgcccgttctgaggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgagaagccaaggacgtgttctgggaatgttctgtatgagtacgcccg ccgcaacccgactactcggtcgtgctcctgctgcgactggcaagacctacg aaaccactctggagaagtgcgcgccgcccggacccgcacgagtgctacgca aaggtgttcgacgagttcaagccactgttcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgcgtacaccaagaaggtccccagggttccactccgacctggtg gaagtgtccaggaaacctgggaaggtcgctccaagtgttgcaagcatccoga ggctaagcgcatgccctgcgccgaggactactgtcctggtgtgctgaatcagc tgtgcgtgctccatgaaaagaccccagtggtccgacagagtaccaagtgtgt accgaatcgctcgtgaaccggcgccggtgttcttcgcactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttccacgccgaca tctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgcctgggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagacagctgaaggccgtcat ggatgatttcgcgccctcgtggaaaagtgtgtgaaagcgacgacaaggaga cttgcttcgccaagaaggaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggcctcgctagcgcacctgccccgctccagctcctgcaccaggtacgcgcg caacggggaccactgtccgctcgggcccggtgtgctgcgctgtgcacacgg tccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccgatgggtgctgtgcgccagg gaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagaccagttccggggcgc aaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacgg tgccagcgccctgctgcgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaa aagaccgacaccgggtgtcgctccagacctatgatgactgttagccaaga ctgccactgcata
80	Нуклеиновая	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagaagaaaa

	кислота, кодирующая SEQ ID NO: 28	ttttaaggccctcgtgcttatcgcccttcgccaatacctccagcagtcgccgt tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggtatgaatccgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctcgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaacctaaacttgctcgcctgggtccgccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcgttccacgacaacgaggaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgctggaggacaccttatttctacgccccgaactgttgtttcttcgccaag cggtaacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgccaaggaaggcgttg cctgctgccgaagctcgacgagttgcgcgatgaggggaagcgctcctccgcta agcagcggtgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgcgcttcaag gcctgggcccgtggcgcgctgtctcaacggttcccgaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgtgacg gcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttggccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtcccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgccgccg acctcccgctccctggccgcccgtattcgtggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttcctgggaatgtttctgtatgagtacgccg ccgcccacccggaactactcggctcgtcctcgtcgcgactggcaaaagacctacg aaaccactctggagaagtgtgcgcccgcgaggacccgcacgagtgctacgca aagtggttcgacgagttcaagccacttgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgcgctacaccaagaaggtcccccagggtgccactccgacctgggtg gaagtgtccaggaaacctgggaaggtcggtccaagtgtgcaagcatcccgga ggctaagcgcatgccctgcgcccaggactacttgtccgtggtgctgaatcagc tgtgcgtgctccatgaaaagacccagtggtccgacagagtgaccaagtgtgtg accgaatcgctcgtgaaccggcgccggtgttttccgcactggagggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaaccttcactttccacgccgaca tctgcaactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctgggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgcggccttcgtggaaggtgtgtgtaaagcggaacgacaaggaga cttgcttcgccaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgtctagcgcacctgccccgctccagcaccgccccagccccgtctcc cgcaccagctcctgcaccaggtaccgctcgcaacggtgaccactgccctctgg gtctcgtgctgctgcgcctgcacaccgttcgcgcttctctggaagacctg ggtgggctgactgggttctgtctcctcgcgaagttcaggttaccatgtgcat cggtgcttgcccttctcagttccgcgctgctaacaatgcacgctcagatcaaaa cctctctgcaaccgctgaaacctgacaccgttccgtgctccttgctgcggttcc gcttcttacaaccctatgggtctgatccagaaaaccgacacgggtgtttctct gcagacctacgacgacctgctggctaaagactgccactgcac
81	Нуклеиновая кислота,	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcggaaga ttttaaggccctcgtgcttatcgcccttcgccaatacctccagcagtcgccgt

	кодирующая SEQ ID NO: 29	tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtgccacgctgagagaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaacctaacttgctcgcctggtccgccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcttccacgacaacgaggaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgcgaggaggcacccttatttctacgccccgaactgtgttcttcgccaag cggtaacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgataaggcggttg cctgctgccgaagctcgacgagttgcgcatgaggggaaggcgtcctccgcta agcagcggctgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgcgcttcaag gcctgggcccgtggcgccgtgtctcaacggttccggaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgttgtaacg gcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttctgcaaaagtgaaggatgctgcgaaaagccctt gctggaagagtcacctgcatcggaagtggagaacgacgagatgccgcgg acctcccgctccctggcgcgcatcttctggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgcccacccggactactcggtcgtgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaacctactctggagaagtgcctgcgcgcgcggaccgcacgagtgctacgca aaggtgttcgacgagttcaagccacttgctcagggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgcgctacaccaagaagggtccccagggtgctccactccgacctggtg gaagtgtccaggaacctgggaaagggtcggtccaagtgtgcaagcatcccgga ggctaagcgcatgccctgcgcgcgaggaactactgtccgtggtgctgaatcagc tgtgctgctccatgaaaagaccccagtgctccgacagagtgaccaagtgcgtgt accgaatcgctcgtgaaccggcgccgtgcttttccgcactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagtccaacgcagaaaccttcaacttccacgcgcgaca tctgcaactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgcctgggtg gagcttgtaaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgcgcccttcgtggaaaagtgttgtaaacgggacgacaaggaga cttgcttcgccaagaaggaaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgtacgcacactgcccccgctccagccccagctcctgcacctgctcc agcaccagctcctgcaccagctccagccccctgcacctgcaccgctccagccc cagctcctgcacctgctccagcaccaggtaccgcgcgcaacggggaccactgt ccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacgggtccgcgctgctgga agacctgggctgggcccgttggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgaacca tgtgcatcgcgcggtgcccagagccagttccggggggcaaacatgcacgcgcag atcaagacgagcctgcaccgctgaagcccgcacgggtgccagcgcctgctg cgtgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggg tgtcgctccagacctatgatgactgttagccaaagactgccactgcata
82	Нуклеиновая кислота,	gatgctcataagtccgaagtgcgcccacagattcaaggacctcggaagaagaaa ttttaaggccctcgtgcttatcgcttcgcccataacctccagcagtcgccgt

	кодирующая SEQ ID NO: 30	tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaacctaacttgctcgcctgggtccgccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcgttccacgacaacgaggaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgctggaggacaccttatttctacgccccgaactgtgttcttcgccaag cggtaacaaggctgctttaccgaatgctgccaggccgacgataaggcgcttg cctgctgccgaagctcgacgagttgcgcgatgaggggaaggcgctcctccgcta agcagcggtgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgcgccttcaag gcctgggcccgtggcgccgtgtctcaacgggtcccgaaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgtgttcacg gcgatctgctggaatgcgccgatgacagagccgatttggccaagtacatctgc gaaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtcccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgccgccg acctcccgctccctggccgccgatttcgtggagtgcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttcctgggaatgtttctgtatgagtacgccg ccgcccacccggactactcggctcgtgctcctgctgcgactggcaaaagacctacg aaaccactctggagaagtgcctgcgcgcgcggacccgcacgagtgctacgca aaggtgttcgacgagttcaagccactgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactcggaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgcgctacaccaagaaggtccccagggtgccactccgacccctgggtg gaagtgtccaggaaacctgggaaggctcggtccaagtgtgcaagcatcccg ggctaagcgcatgccctgcgcgaggaactactgtccgtgggtgctgaatcagc tgtgcgtgctccatgaaaagacccagtgctccgacagagtaccaaagtgtgt accgaatcgctcgtgaaccggcgccgtgcttttccgcactggagggtgacga aaacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcacttccacgcgcgaca tctgcaactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgcccgtgtg gagcttgtaaacacaagcctaaggccaccaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgcggccttcgtggaaggtgttgtaaacggagcagacaaggaga cttgcttcgcgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgtcagcgaagcagcagccaaagaagcagccgcaaaagaagcagccgc taaggaggccgcagcaaaagggtaccgcgcgcaacggggaccactgtccgctcg ggcccgggctgtgctgcctctgcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacctg ggctgggcccgttggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcat cggcgctgcccagccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaaga cgagcctgcaaccgctgaagcccgcacgggtgccagcgcctgctgcgtgccc gccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgcgct ccagacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcata
83	Нуклеиновая кислота, кодирующая	gacgcccacaagagcgaggtggccacccggttcaaggacctggcgagagaaa cttcaaggccctgggtgctgatcgcttcgccagtaacctgcagcagtcacct tcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgc

	SEQ ID NO: 40	gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtggccaccctgctgggagacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacgagtgcttcctgcagcacaag gacgacaaccccaacctgccccggctggtgctggcccgagggtggacgtgatgtg caccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgaga tcgcccggcgccaccctacttctacgcccccgagctgctgttcttcgccaag cgggtacaaggccgcttcaccgagtgctgcccaggccgacgacaaggccgctg cctgctgcccaagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgcca agcagcggtgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcgggccttcaag gcctgggcccgtggccggctgagccagcggttcccaaggccgagttcgccga ggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacccgagtgctgccacg gcgacctgctggagtgcgccgacgacgggcccgcacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtctgcgagaagccct gctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgcg acctgcccagcctggccgacgacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaac tacgccgagggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtacgccg gcccaccccgactacagcgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacg agaccacctggagaagtgcctgcgccgcccgcacccccacgagtgtacgcc aaggtgttcgacgagttcaagcccctggtggaggagccccagaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtacaagttccagaacgccc tgctggtgcggtacaccaagaaggtgccccaggtgagcaccccacacctggtg gaggtgagccggaacctgggcaaggtgggcagcaagtgtgcaagcaccgca ggccaagcggatgccctgcgccgaggactacctgagcgtggtgtgaaccagc tgtgctgctgcacgagaagaccccgtgagcgacccgggtgaccaagtgtgc accgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggagggtggacga gacctacgtgcccaaggagttcaacgccgagaccttcaccttccacgcccga tctgcacctgagcgagaaggagcgcgagatcaagaagcagacccgctggtg gagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgat ggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgcccagggagggaagaagctggtggccgcccagccaggccgccc ggcctgggcagcgccggcgccgagcgccgcccggcgatctggtggaggtgg cagtgaggagggggatccgcgcgaacggggaccactgtccgctcgggccc ggcgttgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgg gccgattgggtgctgtgcacacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcgccg gtgcccagccagttccggggcggaacatgcacgcgagatcaagacgagcc tgacccgctgaagcccgcacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagc tacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacggggtgtcgctccagac ctatgatgactttagccaaagactgccactgcata
84	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 55	gatgcacacaagagtgaagttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagccccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcatacccttttgg

		agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttcttggctaaa aggatataagctgcttttacagaatggttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgctcgcca aacagagactcaagtggtccagtcctccaaaaatttgagagaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttccaaagctgagtttgacaga agtttccaagtttagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgcatg gagatctgcttgatgtgctgatgacagggcgaccttgccaagtatatctgt gaaaaatcaagattcgatctccagtaactgaaggatgctgtgaaaaacctct gttgaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaaatgatgagatgcctgctg actgcttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaggatgtcttctgggcatgttttgatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaacctctagagaagtgtgtgctgctgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaacctcttgtggaagagcctcagaatttaacaa acaaaattgtgagcttttgagcagcttgagagtacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtaactccaactcttgta gaggtctcaagaacctaggaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggtcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgcagagtcaccaaagctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatga aacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaaatcaagaaacaaactgcactgtt gagctcgtaaacacaaagcccaaggcaaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcgaggagggtaaaaaacttgtgtgcaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcgcgcgcgcgagcgcgcgcgatctggtggaggtgg cagtgaggagggggatccggcgcgcgcgagcgcgcgcgatctggtg gaggtggcagtgaggagggggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctc gggcccggcggttgctgctgctgcacacgggtccgcgctgctggaagacct gggctgggctgattgggtgctgctgccacgggaggtgcaagtaccatgtgca tcggcgctgcccagccagttccggcgggcaaacatgcacgcgcagatcaag acgagcctgcacgcctgaagcccgacacgggtgacgcgcctgctgctgccc cgccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgctgc tcagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata
85	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 56	gatgcacacaagagtgaagttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttcaaaaccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagggcccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcatacccttttgg

		agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacattttgaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttcttggctaaa aggtataaagctgcttttacagaatggtgccaaagctgctgataaagctgctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgctgcca aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttccaaagctgagtttgaga agtttccaagtttagtgacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgcatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacaggcggaaccttgccaagtatactgt gaaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctct gttgaaaaatcccactgcattgccgaagtgaaaaatgatgagatgcctgctg acttgcttctattagctgctgattttgtgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaggatgtcttctgggcatgttttgatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgctgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaacctctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaacctcttgtggaagagcctcagaatttaataca acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagtagacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtcaactccaactcttgta gaggtctcaagaaacctaggaagtgaggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggtcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgcagagtcaccaaagtctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatga aacatacgttccaaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaaactgcactgtt gagctcgtagaaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcgaggagggtaaaaaacttgtgtgcaagtcaagctgcctta ggcttagcacctgcccccgctccagcaccgccccagccccctgctccgcacc agctcctgcaccagcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggccccggcggt gctgccgtctgcacacgggtccgcgctgctggaagacctgggctgggctgat tgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgccc gagccagttccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcacc gcctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat cccatggtgctcattcaaaagaccgacacggggtgtcgctccagacctatga tgacttgtagcacaagactgccactgcata
86	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 40 (оптимизация)	gatgcacacaagagtgaagttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttcaaaccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctcat ttgaagatcatgtaaaattagtgaaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcatacccttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg

	кодонов 1)	actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttcttgctaaa aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgctgcca aacagagactcaagtggtgccagctccaaaaatttgagaaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttccaaagctgagtttgaga agtttccaagttagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgcatg gagatctgcttgatgtgctgatgacaggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctc gttgaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgctgctg acttgcttcttagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgttttgatgaatatgcaag aaggcactcctgattactctgtcgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgctgctgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctctgttggaagagcctcagaatttaataca acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagtagacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtaactccaactcttgta gaggtctcaagaacctaggaagtggtggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggtcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgcagagtcaccaaagctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatga aacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaaatcaagaaaacaaactgcactgtt gagctcgtgaaacacaaagcccaaggcaaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttccgaggagggtaaaaaacttggtgctgcaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcggcggcggcgagcggcggcgcgatctggtgaggtgg cagtgaggagggggatccgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccg ggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgctcgctggaagacctgggtgg gccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgc gtgcccagagccagttccggcgcaaacatgcacgcgagatcaagacgagcc tgacccgctgaagcccgacacgggtgccagcgcctgctgctgcccgcagc tacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacccgggtgtcgctccagac ctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata
87	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 40 (оптимизация кодонов 2)	gacgcccacaagagcgaggtggccacagattcaaggacctgggcgagaaaa cttcaaggccctggtgctgatcgcttcgccagtagctgcagcagagccct tcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaaccgagttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcg cgacaagctgtgcaccgtggccaccctgcgggaaacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggaacccgagcggaacgagtgcttctgcagcacaag

		gacgacaacccccacctgccagactcgtgcggcccgaggtggacgtgatgtg cacgccttccacgacaacgaggaaacctctctgaagaagtacctgtacgaga tcgccagacggcacccctacttctacgcccccgagctgctgttcttcgccaag cggtaacaaggccgcttccacgagtgctgccaggccgcccagataaggccgctg cctgctgcccaagctggacgagctgagagatgagggcaaggccagctccgcca agcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcgggctttaag gcttgggctgtggcccgctgagccagagattccccaaggccgagtttgccga ggtgtccaagctggtcaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtggtgtcacg gcgacctgctggaatgcgccgacgacagagccgacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcgagaagccct gctggaaaagagccactgtatcgccgaggtgaaaacgacgagatgcccgctg acctgccagcctggccgagcctcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaac tacgccgagggccaaggtgtgttctgggcatgttctgtatgagtacgcccg cagacaccccgactacagcgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacg agacaaccttgaaaagtgtgcgcgctgcgcgccccacgagtgctacgcc aaggtgttcgacgagttcaagcctctggtggaagaacccagaaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtaagaattccagaacgcc tgctcgtgcggtacaccaagaaagtgcgccaggtgtccacccccacctggtc gaagtgtccggaaacctgggcaaagtgggcagcaagtgctgcaagcacctga ggccaacgggatgccctgcgcgaggaactacctgtccgtggtgctgaaccagc tgtgcgtgctgcacgagaaaaaccccgctgtccgacagagtgaccaagtgtgt accgagagcctggtcaacagacggccctgcttcagcgccctggaagtggacga gacatacgtgcccaaagagttcaacgccgagacattcaccttccacgccgaca tctgcacctgagcgagaaagagcggcagatcaagaagcagaccgacctggtc gagctggtcaagcacaagcccaaggccaccaagaacagctgaaggccgtgat ggacgacttcgcccgttcgtcgagaagtgttgcaaggccgacgacaaagaga catgcttcgccaagagggcaagaaactggtggccgctctcaggccgacctg ggactgggatctggcggcggagggaagcggaggcggagatctgggggagcg ctctggcggaggggatccgccagaaatggcgaccactgtccccctggccctg gccggtgttcagactgcacacagtgccggccagcctggaagatctgggctgg gccgattgggtgctgagccccagagaagtgcaggtcacaatgtgcatcgccgc ctgccccagccagttcagagccgccaacatgcacgccagatcaagaccagcc tgcaaccggtgaagcccgacacgtgcctgccccctgttgctgcccgcagc tacaaccccatggtgctgattcagaaaaacgacacggcgctgtccctgcagac ctacgacgatctgctggccaaggactgccactgcatc
88	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 48	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagggcccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataccctttttg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaaacgaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg

		cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttctttgtctaaa aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgcca aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagagaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaagctgagtttgaga agtttccaagtttagtgacagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacaggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaaatcaagattcgatctccagtaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctct gttgaaaaatccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgctgctg actgcttcattagctgctgattttgtgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaagatgtcttcctggcatgttttgatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctctgttggaagagcctcagaatttaacaa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagtagcaaatccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtaactccaactcttgta gaggtctcaagaaacctaggaaaagtgccagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggtcctgaaccagt tatgtgtgtgcatgagaaaacgccagtaagtgcagagtcaccaaagtctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatga aacatacgttcccaaagagttaaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttgtt gagctcgtgaaacacaagcccaaggcaacaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcgaaggctgacgataaggaga cctgctttgccgaggagggtaaaaaacttgtgtgcgaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcgcgcgcgcgcgagcgcgcgcgcgatctggtggaggtgg cagtgaggagggggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccgc ggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacctggcgctgg gccgattgggtgctgtgcgcaaggaggtgcaagtgaacctgtgcacggcg gtgcccagccagttccggcgcgcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcc tgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgcgtgcccgccagc tacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgctcgtccagac ctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata
89	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 59	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttcaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataacctttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaaacagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaatacttatatgaaa

		ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttcttggctaaa aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaggtctcgtctgcc aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagagaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgaga agtttccaagttagtacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatactgt gaaaaacaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctct gttgaaaaatccactgcattgccaagtggaaaatgatgagatgcctgctg cctgaccttcattagctgctgattttgtgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaggatgtcttcctgggcatgttttgtatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgctgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctctgtggaagagcctcagaatttaacaa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagtagacaaattccagaatgcgc tattagtctgttacaccaagaaagtaccccaagtgtcaactccaactctgtga gaggtctcaagaaacctaggaaaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggctcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgcagtaagtacagagtcaccaaatgctgc acagaatccttggtgaacagggcagcatgttttcagctctggaagtcgatga aacatacggtcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcactgtt gagctcgtgaaacacaaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagctttttagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcccaggagggtaaaaaactgtgtgctgcaagtcaagctgcctta ggcttagcacctgccccgcctccagcacccgccccagccccctgctcccgacc agctcctgcaccagcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggccccggcggt gtgcccgtctgcacacggtccgcgctgctggaagacctgggctgggcccgat tggtgtgctgtcgccacgggaggtgcaagtaccatgtgcatcggcgctgccc gagccagttccgggcggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcacc gcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgctgccccgcagctacaat cccatggtgctcattcaaaagaccgacacccgggtgtcgctccagacctatga tgacttgtagccaaagactgccactgcata
90	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 60 (оптимизация кодонов 1)	gatgcacacaagagttaggttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctcat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataccctttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaaacaaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgatttggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttcttggctaaa

		aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggttcgtctgcca aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagagaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgaga agtttccaagttagtgcagatcttaccaaagtcacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaaatgctgtgaaaaacctct gttggaataatccactgcattgccgaagtggaaaaatgatgagatgcctgctg acttgcttcattagctgctgattttgtgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaagagatgtcttcctgggcatgttttgatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctctgttggaagagcctcagaatttaataca acaaaattgtgagcttttgagcagcttgagagagtacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtacccaagtgtaacctcaactcttgta gaggtctcaagaaacctaggaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggtcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgcagagtcaccaaagctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgctttcagctctggaagtcgatga aacatacgttcccaaagagtttaagtctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcactgtt gagctcgtgaaacacaaagcccaaggcaaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcgaaggctgacgataaggaga cctgctttgccgaggagggtaaaaaacttgttgctgcaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgatctggtggaggtg cagtgaggaggaggatccggcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgatctggtg gagtggcagtgaggaggaggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctc gggcccggcggtgtgtgcgtctgcacacggtccgcgcgtcgtggaagacct gggctgggaggatgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgaacctgtgca tcggcgcggtgcccgagccagttccggcgcgcaaacatgcacgcgcagatcaag acgagcctgcacgcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgcgtgcc cgccagctacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgtgc tccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata
91	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 70	gacgcccacaagagcgaggtggcccaccggttcaaggacctgggcgaggagaa cttcaaggccctgggtgctgatcgcttcgccagtaacctgcagcagtcacct tcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgacaggttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacctgttcgg cgacaagctgtgcacgtggccacctgcgggagacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggagcccagcggaacgagtgcttctgcagcacaag gacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggcccgaggtggaactgatgtg caccgccttccacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgaga tcgcccggcgacccctacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaag

		cggtaacaaggccgcttcaccgagtgctgccaggccgccaagggccgctg cctgctgcccaagctggacgagctgcggaagggcaagggcagcagcca agcagcggtgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcggttcaag gcctgggcccgtggccggctgagccagcggttcccaaggccgagttccgga ggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacg gcgacctgctggagtgccgacgacccggccgacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagccct gctggagaagagccactgcacgaggtggagaacgacgagatgcccgccg acctgcccagcctggccgagcttctgtggagagcaaggacgtgtgcaagaac tacgcccagggccaaggacgtgttctgtggcatgttctgtacgagtaacgccc gcggcaccgactacagcgtggtgctgctgctgctgctgctgccaagacctacg agaccacctggagaagtgtgcgcccgcgccaacccacgagtgctacgccc aaggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggagccccagaaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctggcgagtagaagttccagaacgccc tgctggtgcggtacaccaagaagtgccccaggtgagcaacccccacctggtg gaggtgagccggaacctgggcaagtggtggcagcaagtgctgcaagccccga ggccaagcggtgacctgcccagggactacctgagcgtggtgctgaaccagc tgtgctgctgcacgagaagccccgtgagcgacccgggtgaccaagtgtgc accgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacga gacctagtgccaaggagttcaacgcccagaccttcacctccacgcccaca tctgacccctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgacctggtg gagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgat ggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgcccaggagggaagaagctggtggccgagccagggccgacctg ggcctggcagcgccggcgccgagcgccgcgcgatctggtggaggtgg cagtgaggaggggggtccgctcgcaacggtgaccaactgcacctggtgctg gtcgctgctgcccctgcacaccgttcgcgcttctctggaagacctgggttg gctgactgggttctgtctctcggaagttcaggttacctgtgcatcggtgc ttgaccttctcagttccgctgcttaacatgcacgcttgatcaaaacctctc tgacccgctgaaacctgacacggttctgctccttgctgctgctgcttct tacaacctatggttctgatccagaaaaccgacacgggtgttctctgcagac ctacgacgacctgctggctaaagactgccactgcac
92	HSA (C34S) - GS- (GGGS) ₈ -GDF15 (делеция 4)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQSSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECF LQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA FK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSSEKERRQIKQTALV

		ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDHCP LGPGR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLAKDCHCI
93	HSA (C34S) - GS- (GGGS) ₈ - GDF15 (делеция 5)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKYL YEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHCP LGPGR CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLAKDCHCI
94	бх-гистидиновая метка- HSA (C34S) - GS- (GGGS) ₈ - Сайт HRV3C белка GDF15	EFHHHHHDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLLKYL YEIARRHPYFYA PELLFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQ KFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGD LLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYET TLEKCCAA ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVP QVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPV SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLVLFQGPARNGDHCP LGPGR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLAKDCHCI
95	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 92 (оптимизация кодонов 1)	GATGCACACAAGAGTGAGGTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCAT TTGAAGATCATGTAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGA AAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAGCTGCTTTTACAGAATGTGCCAAGCTGCTGATAAGCTGCCTG

		CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGCAAAGGATGTCTCCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGTGTGCCCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTGTGA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTTCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGGAAGCGGCGGAGGGGGAGTGGCGCGGTGGCTCCGGGGGGGCGG ATCCGCGCGGAGGGGGCAGCGGGGTGGAGGGAGTGGCGGGGAGGATCAGGGG GAGGAGGATCAGGAGGGGGCGGAAGTGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGACGG TGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGA CTGGGTGCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCTGCC CCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAACAGCTGCAC CGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAA TCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATG ATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
96	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 7	GGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGG TGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAAC ATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCC AGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGA CCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGC CACTGCATA
97	Нуклеиновая кислота, кодирующая	GACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGC GTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGC AAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCGGGGCGGCAACATG

	SEQ ID NO: 8 (оптимизация кодонов 1)	CACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGC GCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCG ACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCAC TGCATA
98	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 8 (оптимизация кодонов 2)	GATCATTTGCCCTCTCGGGCCCGGACGGTGTTCGCCCTCCACACTGTGAGGGC TTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTAC AAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATG CACGCCCAGATAAAAACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGC GCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCG ACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCAC TGCATA
99	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 8 (оптимизация кодонов 3)	GATCATTTGCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGC TTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGC AAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCTTCGCAATTCGGGGCCGGAATATG CACGCCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCGCTGC TCCATGCTGTGTGCGGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCG ATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCAT TGCATC
100	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 9 (оптимизация кодонов 1)	CACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTC GCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGCAAG TGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGGCGGCAACATGCAC GCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCC CTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACA CCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGC ATA
101	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 9 (оптимизация кодонов 2)	CATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGGTGTTCGCCCTCCACACTGTGAGGGCTTC ACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAG TCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCAC GCCCAGATAAAAACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCC CTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACA CCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGC ATA
102	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 9 (оптимизация кодонов 3)	CATTGTCCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTC ACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAG TGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCTTCGCAATTCGGGGCCGGAATATGCAC GCCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCGCTGCTCC ATGCTGTGTGCGGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATA CCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGC ATC
103	Нуклеиновая кислота, кодирующая	TGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCT GGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGCAAGTGA CCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGGCGGCAACATGCACGCG

	SEQ ID NO: 10 (оптимизация кодонов 1)	CAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTG CTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCG GGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
104	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 10 (оптимизация кодонов 2)	TGCCCTCTCGGGCCCGGACGGTGTTCGCCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACT TGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTCA CAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCC CAGATAAAAACCGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTG CTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCG GGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
105	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 10 (оптимизация кодонов 3)	TGTCCTCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCCTGCACACTGTGCGGGCTTCACT GGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCAAGGAGGTGCAAGTGA CCATGTGCATCGGCGCCTGTCTTCGCAATTCGGGCGCGCAATATGCACGCC CAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATG CTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCG GCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
106	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 11 (оптимизация кодонов 1)	TGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTG GGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGA GCCAGTTCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGC CTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATG ACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
107	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 11 (оптимизация кодонов 2)	TGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTG GGTGCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCA GCCAGTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAACAGCCTGCACCGC CTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATG ACTTGTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
108	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 11 (оптимизация кодонов 3)	TGTCGCCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTG GGTGCTGTCCCAAGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCTT CGCAATTCGGGCGCGAATATGCACGCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGC CTCAAGCCCGACACTGTGCTGCTCCATGCTGTGTGCGGCGCTCCTATAACCC CATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATG ATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
109	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 60 (оптимизация кодонов 2)	GATGCGCACAAAGTCGGAAGTGGCCCATCGCTTTAAGGACCTGGGAGAAGAGAA CTTCAAGGCCCTGGTCTGATCGCGTTCGCCAGTACCTCCAGCAGTCCCGT TTGAGGACCACGTCAAGCTTGTGAACGAAGTGACCGAGTTCGCAAAGACTTGT GTGGCCGATGAGTCCGCCGAAAACGCGACAAGTCCCTGCACACCTTGTTCGG AGACAAGCTGTGCACCGTCGCGACTTTCGCGGAGACTTACGGCGAAATGGCGG ACTGCTGCGCAAAGCAGGAGCCCGAAAGGAACGAGTGCTTCTGCAACACAAG GACGACAACCCGAACCTTCCGAGACTCGTGCGGCTGAGGTGACGTGATGTG CACTGCATTCCATGATAACGAAGAAACATTCTGAAGAAGTACCTGTATGAAA TTGCCAGACGCCACCGTACTTCTACGCCCCGAACTGCTGTTCTTCGCCAAG

		AGATACAAGGCCGCTTTACCGAATGTTGTCAAGCCGCCGATAAGGCAGCGTG CCTGCTGCCGAAGTTGGACGAGCTCAGGGACGAAGGAAAGGCCTCGTCCGCCA AGCAGAGGCTGAAGTGC GCGTCGCTCCAGAAGTTTGGAGAGCGGGCTTTTAAAG GCCTGGGCAGTGGCTAGGTTGAGCCAGAGGTTCCCCAAGGCGGAGTTTGCCGA AGTGTCCAAGCTCGTGACTGACCTGACTAAAGTCCATACCGAATGCTGCCACG GCGATCTGCTCGAATGCGCAGATGACCGGGCGGATTGGCCAAGTACATTTGC GAAAACCAAGACTCCATAAGCTCCAAGCTGAAGGAGTGTGTGAAAAGCCTCT GCTCGAGAAGTCCCACTGTATCGCCGAGGTGGAGAACGACGAAATGCCGGCAG ACCTCCCTAGCCTGGCAGCCGACTTCGTGCAATCCAAGGACGTGTGCAAGAAC TACGCCGAAGCGAAGGACGTGTTCTTGGGAATGTTCTGTACGAGTACGCCAG ACGGCATCCAGACTACTCCGTGGTGCTTCTCTGCGGCTGGCCAAGACTTATG AAACGACCCTGGAGAAATGTTGCGCTGCTGCTGACCCACACGAGTGCTACGCC AAAGTGTTGACGAGTTTAAAGCCTCTCGTGGAGGAACCCAGAACCTCATCAA GCAGAACTGCGAACTTTTCGAGCAGCTCGGGGAGTACAAGTTCCAAAACGCGC TGCTTGTCCGCTACACCAAGAAAGTCCGCAAGTGTCCACACCGACCTCGTG GAAGTGTCCAGGAACCTGGGCAAAGTCGGAAGCAAATGTTGCAAGCACCCCGA AGCCAAGCGCATGCCGTGCGCAGAGGACTACCTTTCGGTGGTGTGAACCAAGC TCTGCGTCTGCACGAAAAGACCCCGGTGTGACACCGGTGACCAAGTGTGTGT ACCGAAAGCCTCGTGAATCGGCGCCCTGCTTCTCGGCCCTGGAGGTGGACGA AACTTACGTGCCGAAAGAGTTCAACGCGGAAACCTTACCTTTTCATGCCGATA TCTGCACCTGTCCGAGAAGGAGCGGCAGATCAAGAAGCAGACCCCTGGTG GAGCTTGTGAAACACAAGCCGAAGGCCACTAAGGAACAGCTGAAGGCCGTCAT GGACGATTTGCTGCCTTCGTCGAGAAGTGCTGCAAGGCCGACGACAAGGAGA CTTGCTTCGCTGAAGAAGGGAAGAAGCTTGTGGCCGCTAGCCAGGCTGCACTG GGACTGGGTAGCGGTGGAGGGGATCAGGGGGTGGTGGATCGGAGGAGGAGG ATCAGGAGGTGGCGGCTCAGGAGGAGGCGGATCAGGCGGTGGAGGATCCGGAG GCGGAGGATCGGGTGGAGGAGGCTCAGCGAGGAACGGGGATCATTGTCCCTT GGACCGGGTAGATGCTGTGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCT CGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCACGCGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCA TCGGCGCCTGTCTTCGCAATTCGGGGCCGCAATATGCACGCCAGATCAAG ACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATGCTGTGTGCC GGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCC TGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
110	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 92 (оптимизация кодонов 2)	GATGCGCACAAAGTCGGAAGTGGCCATCGCTTTAAGGACCTGGGAGAAGAGAA CTTCAAGGCCCTGGTCTGATCGCGTTCGCCAGTACCTCCAGCAGTCCCCGT TTGAGGACCACGTCAAGCTTGTGAACGAAGTGACCGAGTTCGCAAAGACTTGT GTGGCCGATGAGTCCGCCGAAAACGCGACAAGTCCCTGCACACCTTGTTCCGG AGACAAGCTGTGCACCGTCGCGACTTTGCGGGAGACTTACGGCGAAATGGCGG ACTGCTGCGCAAAGCAGGAGCCCGAAAGGAACGAGTGCTTCTGCAACACAAG GACGACAACCCGAACCTTCCGAGACTCGTGCGGCCTGAGGTGACGCTGATGTG CACTGCATTCCATGATAACGAAGAAACATTCTGAAGAAGTACCTGTATGAAA TTGCCAGACGCCACCCGTACTTCTACGCCCCGAAGTGTGTCTTCGCCAAG

		AGATACAAGGCCGCTTTACCGAATGTTGTCAAGCCGCCGATAAGGCAGCGTG CCTGCTGCCGAAGTTGGACGAGCTCAGGGACGAAGGAAAGGCCTCGTCCGCCA AGCAGAGGCTGAAGTGCGCGTCGCTCCAGAAGTTTGGAGAGCGGGCTTTAAG GCCTGGGCAGTGGCTAGGTTGAGCCAGAGGTTCCCCAAGCGGAGTTTGCCGA AGTGTCCAAGCTCGTGACTGACCTGACTAAAGTCCATACCGAATGCTGCCACG GCGATCTGCTCGAATGCGCAGATGACCGGGCGGATTGGCCAAGTACATTTGC GAAAACCAAGACTCCATAAGCTCCAAGCTGAAGGAGTGTGTGAAAAGCCTCT GCTCGAGAAGTCCCCTGTATCGCCGAGGTGGAGAACGACGAAATGCCGGCAG ACCTCCCTAGCCTGGCAGCCGACTTCGTGCAATCCAAGGACGTGTGCAAGAAC TACGCCGAAGCGAAGGACGTGTTCTGGGAATGTTCTGTACGAGTACGCCAG ACGGCATCCAGACTACTCCGTGGTGCTTCTCTGCGGCTGGCCAAGACTTATG AAACGACCCTGGAGAAATGTTGCGCTGCTGCTGACCCACACGAGTGCTACGCC AAAGTGTTGACGAGTTTAAGCCTCTCGTGGAGGAACCCAGAACCTCATCAA GCAGAACTGCGAACTTTTCGAGCAGCTCGGGGAGTACAAGTTCCAAAACGCGC TGCTTGTCCGCTACACCAAGAAAGTCCCGCAAGTGTCCACCCGACCTCGTG GAAGTGTCCAGGAACCTGGGCAAAGTCGGAAGCAAATGTTGCAAGCACCCCGA AGCCAAGCGCATGCCGTGCGCAGAGGACTACCTTTCGGTGGTGTGAACCAGC TCTGCGTCTGCACGAAAAGACCCCGGTGTGACCGCGTGACCAAGTGCTGT ACCGAAAGCCTCGTGAATCGGCGCCCTGCTTCTCGGCCCTGGAGGTGGACGA AACTTACGTGCCGAAAGAGTTCAACGCGGAAACCTTACCTTTTCATGCCGATA TCTGCACCCTGTCCGAGAAGGAGCGGCAGATCAAGAAGCAGACCCCTGGTG GAGCTTGTGAAACACAAGCCGAAGGCCACTAAGGAACAGCTGAAGGCCGTCAT GGACGATTCGCTGCCTTCGTGAGAAGTGCTGCAAGGCCGACGACAAGGAGA CTTGCTTCGCTGAAGAAGGGAAGAAGCTTGTGGCCGCTAGCCAGGCTGCACTG GGACTGGGTAGCGGTGGAGGGGATCAGGGGGTGGTGGATCGGAGGAGGAGG ATCAGGAGGTGGCGGCTCAGGAGGAGGCGGATCAGGCGGTGGAGGATCCGGAG GCGGAGGATCGGGTGGAGGAGGCTCAGATCATTTGCCCTTGACCGGGTAGA TGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGA CTGGGTGCTGTCCCGAGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTC CTTCGCAATTCCGGGCCGCAATATGCACGCCAGATCAAGACCTCCCTGCAT CGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAA CCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACGATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATG ATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
111	HSA (C34S)-GS- (GGGS) ₈ - (делеция 5) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQYLLQSSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDLTQVHTECHGDLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLECEKEPFLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC

		TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSHCPLGPGRC CRLHTVTRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTQYDDLLAKDCHCI
112	HSA (C34S)-GS- (GGGGS) ₈ - (делеция 14) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKCASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTFVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSCRLHTVTRAS LEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAP CCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTQYDDLLAKDCHCI
113	(Делеция 2) HSA (C34S)-GS- (GGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSSPFEDHVKLNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDD NPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTCCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAQRLKCASLQKFGERAFAKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTFVSDRVTKCCTE SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDHCPGPGRC RLHTVTRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTPVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTQYDDLLAKDCHCI
114	ДНК для SEQ ID NO: 113 (делеция 2) HSA (C34S)-GS- (GGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	CACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAA AGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTGAAG ATCATGTAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT GATGAGTCAGCTGAAAATTTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTGGAGACAA ATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCT GTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAGATGAC AACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGC TTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGAATAAATACTTATATGAAATGCCA GAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTTTTCTTTGCTAAAAGGTAT

		AAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTT GCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGA GACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGG GCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAAGATTTTC CAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAT CAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGA AAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGC CTTCATTAGCTGCTGATTTGTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAACTATGCT GAGGCAAAGGATGCTTCTCGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCA TCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCA CTCTAGAGAAGTCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAA TTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAG TTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCACTCCAACCTCTGTAGAGGTC TCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGAGCAATGTTGTAACATCCTGAAGCAAA AAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACAGTTATGTG TGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTACCAAATGCTGCACAGAA TCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATA CGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATATATGCA CACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAAACAACTGCACTTGTGTAGCTC GTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGA TTTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCT TTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGGCTT GGAAGCGGCGGAGGGGGAGTGGCGGCGGTGGTCCGGGGGGGCGGATCCGG CGGAGGGGGCAGCGGGGTGGAGGGAGTGGCGGGGAGGATCAGGGGGAGGAG GATCAGGAGGGGGCGGAAGTGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGGTGTTC CGCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGT GCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCC AGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAACAGCCTGCACCGCCTG AAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCAT GGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACT TGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
115	HSA (C34S)-GA- (GGGGA) ₈ - (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLLQSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECFLOHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAQRLKASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECHGDLLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC

		TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADHCP LGPGR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLAKDCHCI
116	ДНК для SEQ ID NO: 115 HSA (C34S)-GA- (GGGGA) ₈ - (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGA AAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGAACTCCTTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTCCCAAAGCTGAGTTTG CAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAACCTCT GTTGGA AAAATCCCACCTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGTCTGTCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGTCTGTCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGAGAGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCTGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACTCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTACCAAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACCTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGGTGCTGGAGGAGCGGGGCGGGCGGGGGTGCCTGTTGGGGGTGG CGCAGGGGGAGGTGGTGCGGGTGGTGGTGGGGCTGGTGGGGGAGGTGCAGGCG GTGGCGGTGCCGGGGGGGTGGCGCGGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGG TGTTGCCGCTCCCACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGA

		CTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCC CCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCCAGATAAAAAACAGCCTGCAC CGCCTGAAGCCCACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAA TCCCATGGTGTCTATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATG ATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
117	HSA (C34S) – (AP) ₁₀ – (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQSSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECC HGD LLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKFLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFABEGKKLVAASQAAL GLAPAPAPAPAPAPAPAPADHCP LGPGRCRLHTV RASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACFSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI
118	ДНК для SEQ ID NO: 117 HSA (C34S) – (AP) ₁₀ – (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCCTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGA AAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCGGAACCTCTTTCTTTGTCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACCTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGC

		TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGCTCAACTCCAACCTCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGA AGCAAAAAGAAATGCCCTGTGCAGAACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAACAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCCTTA GGGCTTGCAACAGCCCCTGCCCCTGCACCTGCACCTGCTCCCGCACCGGCTCC AGCCCCAGCTCCGGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGGTGTGCCGCCTCC ACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCGGACTGGGTGCTGTCC CCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGATTGGCGCTGCCCGAGCCAGTTTCG CGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAACAGCCTGCACCGCTGAAGCCCG ACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCATGGTGCTC ATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGCTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGC CAAAGACTGCCACTGCATA
119	HSA (C34S) – (AP) ₁₂ – (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAPQYLQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFQDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKCN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPDHCPGPGRCRLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPVAPCCVPASYN PMVLIQKTDTGVSLLQTYDDLAKDCHCI
120	ДНК для SEQ ID NO: 119 HSA (C34S) – (AP) ₁₂ – (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCAT TTGAAGATCATGTAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGAAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTGCTAAA AGGTATAAGCTGCTTTTACAGAAATGTGCCAAGCTGCTGATAAGCTGCCTG

		CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGCAGAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTCGATGAATTTAAACCTCTTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTGTAGCAGCTTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTACCAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAGAGTTTAAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACCTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTCGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGACACAGCCCTGCCCCGTGCACCTGCACCTGCTCCCGCACCGGCTCC AGCCCCAGCTCCGGCTCCAGCTCCTGATCATTTGCCCTCTCGGGCCCGGACGGT GTTGCCGCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGAC TGGGTGCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCTGCC CAGCCAGTTTCGCGCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAACAGCCTGCACC GCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGTACAAT CCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGA TGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
121	HSA (C34S)- GGS- (EGKSSGSGSESST)₃ -GGS- (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQSPFEDHVKLNVNEVEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLECCCKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI
122	ДНК для SEQ ID NO: 121 HSA (C34S)- GGS- (EGKSSGSGSESKST) 3-GGS- (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGAATAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTATGCCCCGGAACCTTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAACCTCT GTTGAAAAATCCCCTGCAATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAATTTGTGAGCTTTTGTGAGAGCTTGAGAGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGA AGCAAAAAGAAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGT ACTGAGAGCTTGGTCAACAGGCGGCCGTGCTTCAGCGCCCTCGAGGTGGATGA GACTTATGTCCCAAAGGAGTTTAATGCGGAACTTTTACTTTCCACGCAGACA TTTGCACCTTGTCTGAAAAGGAAAGACAGATTAAGAAAACAGACTGCTCTTGTG GAACTGGTAAACATAAAACAAAAGCTACGAAGGAGCAGCTTAAGGCTGTTAT GGATGATTTGCGCGCGTTTGTGCGAGAAGTGTGCAAAGCGGACGATAAGGAAA CTTGCTTTGCAGAGGAAGGTAAGAACTCGTAGCGGCAAGTCAGGCTGCGCTT GGCTTTGGAGGCAGTGAAGGCAAATCCTCTGGGAGTGGCTCTGAAAGTAAATC CACCGAGGGCAAATCCAGTGGATCTGGGTCTGAATCTAAGTCTACCGAGGGGA AGTCTTCTGGCAGTGGGTGAGAATCTAAATCTACAGGCGGCTCTGACCATGTC CCGTTGGGACCAGGACGCTGCTGTGCGCTTCATACAGTGCAGCGAGTTTGGGA AGACCTGGGCTGGGCTGACTGGGTGCTTAGCCCTCGGGAGGTCCAGGTCACAA TGTGCATTGGCGCGTGTCCAGTCAATTTAGAGCAGCAAATATGCACGCCCAA

		ATAAAAACCTCCCTGCATAGGCTTAAGCCAGATACTGTCCCCGACCATTGCTG TGTGCCTGCTTCTTACAATCCTATGGTACTCATCCAGAAGACCGACACGGGAG TTAGCCTCCAGACTTATGACGACCTCTTGGCTAAAGATTGCCATTGTATT
123	HSA (C34S)-GS- (PGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQY LQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTC VADESAENC DKS LHTLF GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLADFVESKDVKCN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFLQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMFCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKLVAASQAAL GLGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSDHCP LFGPR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI
124	ДНК для SEQ ID NO: 123 HSA (C34S)-GS- (PGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTGCTCATCGGTTTAAAGATTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAATTAGTGAATGAAGTAAGTGAATTTGCAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAAATGAAGAGACATTTTGGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCGGAACTCCTTTCTTTGTGTA AGGTATAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGAAGGCTTCGCTCGCCA AACAGAGACTCAAGTGTCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTCGATGAATTTAAACCTTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATGTGAGCTTTTGGAGCAGCTTGAGAGTACAAATCCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTGTAAACATCCTGA

		AGCAAAAAGAAATGCCTGTGCAGAAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAAACGAT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACGAAATGTTGC ACAGAGTCACTGGTCAACAGGAGACCTTGCTTCTCCGCTCTTGAGGTTGACGA AACGTATGTCCCAAAAGAGTTCAACGCCGAAACGTTTACGTTTCATGCGGACA TATGCACTCTCAGTGAGAAGGAGCGACAAATCAAAAACAGACTGCTCTTGTA GAGTTGGTAAACACAAACCTAAAGCAACAAAGAGCAATTGAAAGCTGTGAT GGACGATTTTGCAGCTTTCGTAGAAAAGTGCTGCAAGGCCGACGATAAAGAAA CCTGTTCGCTGAAGAAGGCAAAAAAATTGTTGCGGCATCTCAGGCCGCTCTT GGACTTGGGAGCCCGGGTGGCGGGTCTCCAGGCGGAGGCTCTCCGGCGGGAGG TAGTCCCGGAGGGGGTAGTCCGGCGCGCGTTCTCCAGGTGGAGGTTCTCCTG GTGGTGGCAGTCCTGGCGGAGGATCTGATCACTGTCCCCTTGGGCCCGGGAGG TGCTGCCGACTTCATACAGTTCGCGCCAGCCTTGAAGATTGGGGTGGGCCGA CTGGGTGTTGAGCCCGAGAGAGGTCCAAGTCACGATGTGATTGGAGCCTGTCT CCTCTCAATTCCGAGCCGCAAATATGCATGCGCAAATAAGACGAGTCTCCAT CGGTGGAAGCCTGATACTGTCCCAGCTCCGTGCTCGTCCCCGCGAGTTATAA TCCCATGGTCTTATACAGAAACAGACACTGGTGTCAGCCTTCAGACGTATG ACGATTGTCTGCTAAAGACTGTCAATTGTATT
125	HSA (C34S)-GS- (AGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLLKKLYEIIARRHPYFYAPELFFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYA KVFEDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLEGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPKAEKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVEITYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETFAEEGKKLVAASQAAL GLGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGGSAGGSDHCP LGPGR CCR LHTVRASLEDLGDWADVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPVAPCCVPASYNPMVLIQKTDTVGSLQTYDDLAKDCHCI
126	ДНК для SEQ ID NO: 125	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAAATTAGTGAATGAAGTAAGTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAATTTGTGACAAATCACTTCATACCTTTTGGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAAACAAGAACTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTGTCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCC

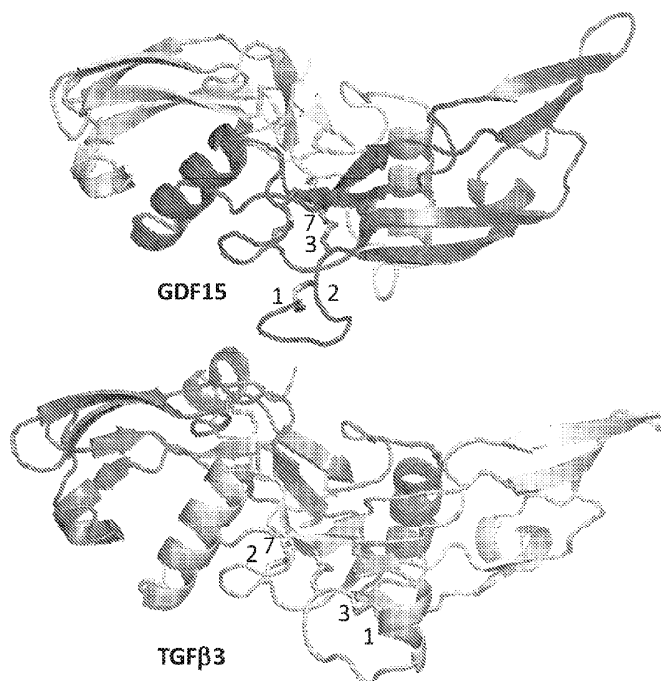
		AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTCAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTCCCAAAGCTGAGTTTGAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATCCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAACATCCTGA AGCAAAAAGAAATGCCCTGTGAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACTAAATGTTGT ACCGAGTCTCTTGTAAATAGCGGCCATGCTTCAGTGCATTGGAAGTCGACGA AACCTATGTACCAAAGGAGTTCACGCAGAAACATTTACATTCATGCTGATA TCTGCACATTGAGCGAGAAAGAGAGACAGATTAAGAAACAGACGCGCTTGTT GAACTGGTTAAACACAAACCAAAGCTACCAAGGAGCAGCTTAAGGCAGTAAT GGATGACTTCGCGGCCTTTGTGAGAAATGTTGTAAAGCGGATGATAAAGAGA CATGCTTCGCCGAAGAGGGCAAAAACCTTGTAGCGGCAAGCCAGGCCGCACTG GGTCTCGGTAGTGCAGGCGGTGGTTGAGCGGGGGAGGATCTGCAGGTGGTGG CTCAGCGGGTGGCGGTAGCGCTGGGGGGGGCTCCGAGGTGGGGGATCAGCAG GCGGCGGATCAGCCGGCGGTGGATCCGACCACTGTCTCTCGGGCTGGTCTGG TGTTGCCGCTCCATACTGTGCGCGCTCTCTTGAGGATCTGGGGTGGGCTGA TTGGGTCTCTCTCCCCGGAAGTGACAGGTGACCATGTGTATTGGTGCTTGCC CAAGTCAATCCGAGCAGCTAACATGCACGCCAGATCAAGACTAGCCTGCAT CGGCTTAAGCCCGACACTGTTCTGCCCCCTTGCTGTGTCTGCTATCTTATAA TCCAATGGTCTGATCCAGAAAACCGATACGGGTGTATCATTGCAAACATACG ACGACTTGCTTGCCAAGATTGCCATTGCATT
127	HSA (C34S)- GGS- (EGKSSGSGSESST) ₂ -GGS- (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVDTLTKVHTECHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTLV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETFAEEGKKLVAASQAAL

		GLGGSEKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSDHCPLGPRCCRLHTRV ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDVFP APCCVPASYNFMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLAKDCHCI
128	ДНК для SEQ ID NO: 127	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCCTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTGA AAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTATGCCCGGAACTCCTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGAAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGTCTGTCTGTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGTCTGTCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTTGTGAGCTTTTGTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCTGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAGTGGGCAGCAAAATGTTGTAACATCTCTGA AGCAAAAAGAAATGCCCTGTGCAGAAAGCTATCTATCCGTGGTCTGTAACAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACGAAATGCTGT ACAGAATCCCTCGTGAATAGAAAGCCCTGCTTCTCTGCCCTGAGGTGGACGA GACTTACGTCCCTAAGGAGTTTAAACGCCGAGACCTTTACTTTTCATGCTGATA TTTGCAACCTTTCCGAAAAGGAGCGGCAGATCAAGAAACAAACAGCCTTGGTG GAACTCGTAAACATAAAACCCAAAGCCACCAAGGAACAACCTAAAGCTGTTAT GGATGACTTCGCAGCCTTCGTGAGAAATGTTGCAAGGCGGATGATAAGGAAA CGTGTTTGTGCTGAGGAAGGGAAGAGTTGGTTGCTGCCTCTCAAGCGGCTCTG GGGCTTGGCGGATCAGAGGGGAAGTCTCCGGGTCCGGTAGCGAGTCCAAATC TACGGAAGGGAAGTCATCCGCTTCTGGGTGAGAGTCCAAATCCACAGGAGGAT CAGACCATTTGCCATTGGGACCAGGACGATGTTGTGCGCTGCATACGGTAAGA GCGTCTGTGAGGATCTCGGCTGGGCCGATTGGGTTCTCTACACACGAGAAGT ACAGGTACAAATGTGCATAGGAGCTTGTCCGAGCCAATCCGGGCGGCTAATA TGCACGCACAGATCAAGACCTCTTTGACCCGCTTGAAGCCCGATACCGTGCCA
		GCACCGTGTGCGTCCCAGCATCTTACAACCTATGGTTTTGATACAGAAAAC TGACACAGGTGTGAGCCTCCAGACATATGATGATTTGCTGGCTAAGGATTGCC ACTGTATA

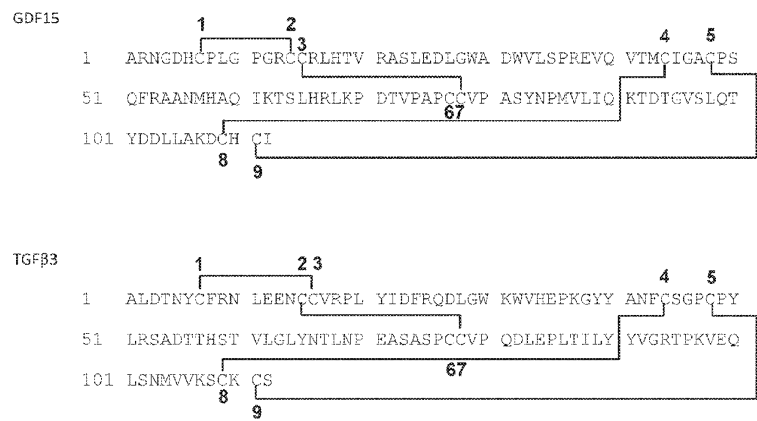
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Гибридный белок, содержащий:
 - белок, продлевающий период полужизни, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2,
 - линкер, имеющий длину 35-48 аминокислот и содержащий аминокислотную последовательность (GGGGS)_n, где n равно 7 или 8 (SEQ ID NO: 42 или 43), и
 - белок GDF15, выбранный из группы, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 6;
 причем гибридный белок составлен от N-конца до C-конца в порядке (a)-(b)-(c).
- Гибридный белок по п.1, в котором линкер имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
- Гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60 и 92.
- Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный белок по п.1.

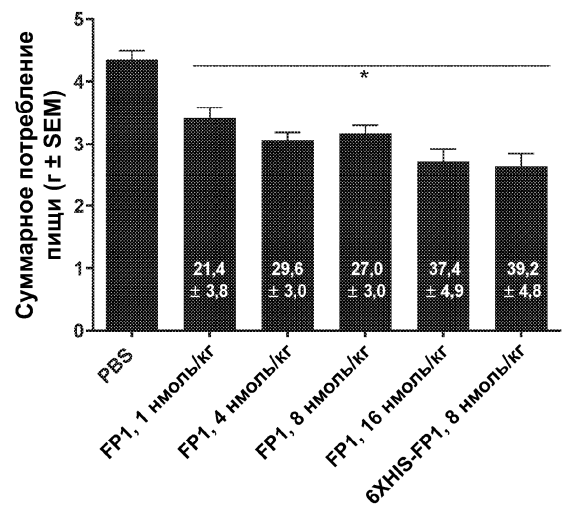
5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.4, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90, 95, 109, 110.
6. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок по п.1.
7. Вектор по п.6, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90, 95, 109, 110.
8. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок по п.1.
9. Способ продуцирования гибридного белка по п.1, включающий этапы, на которых:
 - (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок по п.1, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок; и
 - (2) выделяют гибридный белок по п.1, продуцированный клеткой-хозяином.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.
11. Способ лечения или профилактики метаболического расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.10.
12. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2 типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности и ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок по п.1.
13. Способ лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2 типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности и ревматоидного артрита у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Димер, содержащий две полипептидные цепи, причем каждая цепь содержит гибридный белок по п.1.



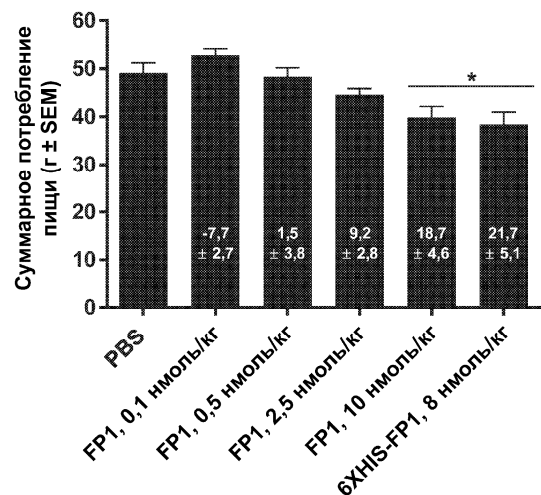
Фиг. 1А



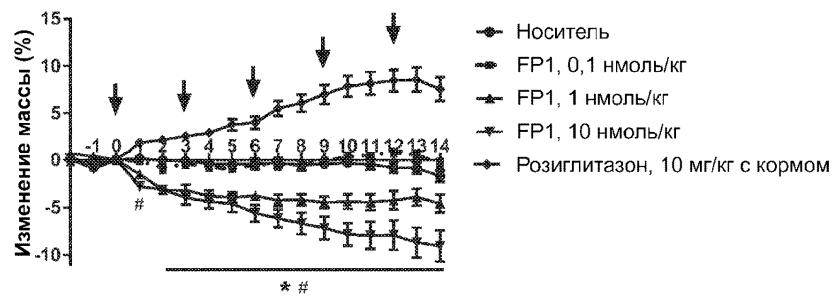
Фиг. 1В



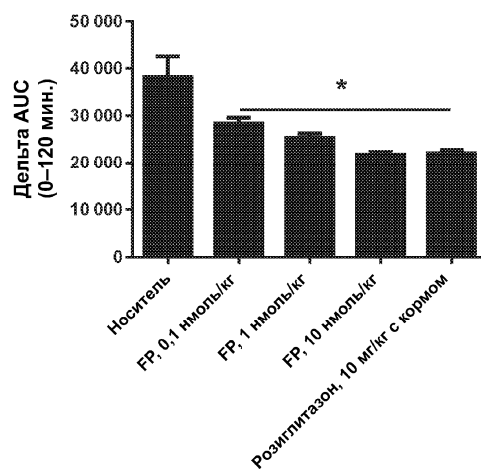
Фиг. 2



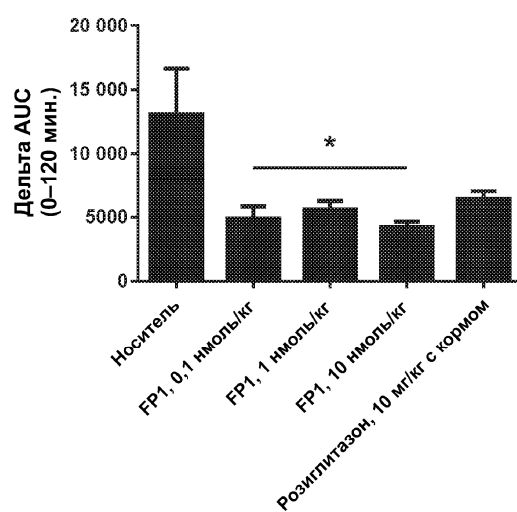
Фиг. 3



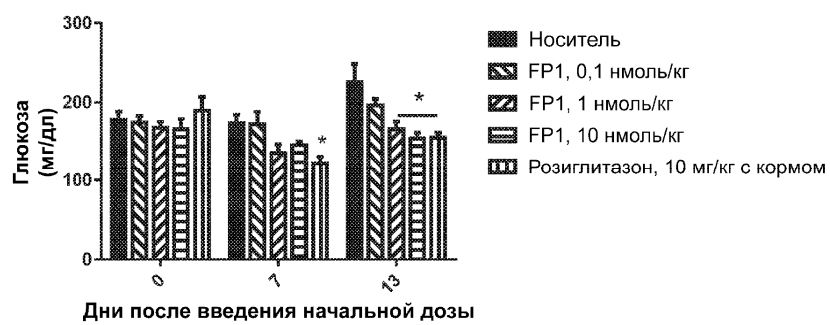
Фиг. 4



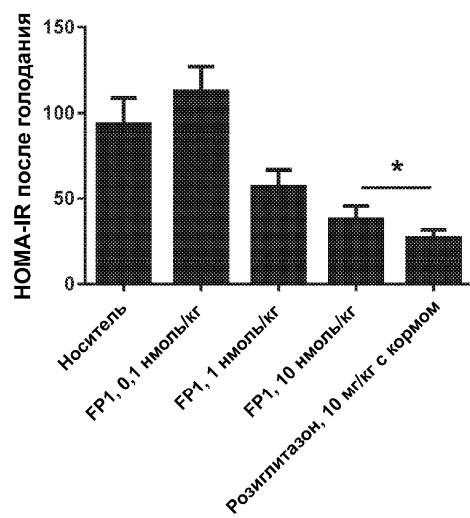
Фиг. 5А



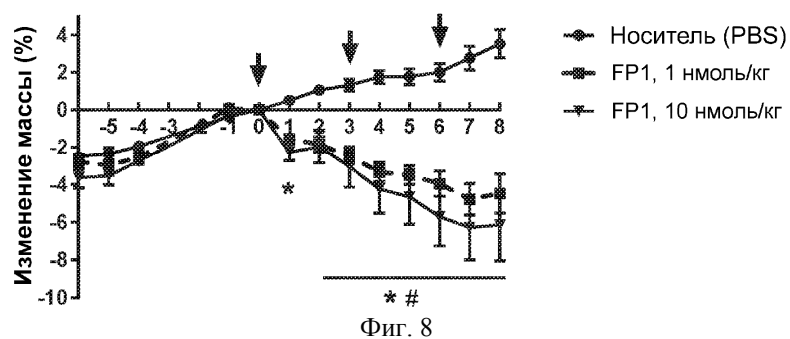
Фиг. 5В



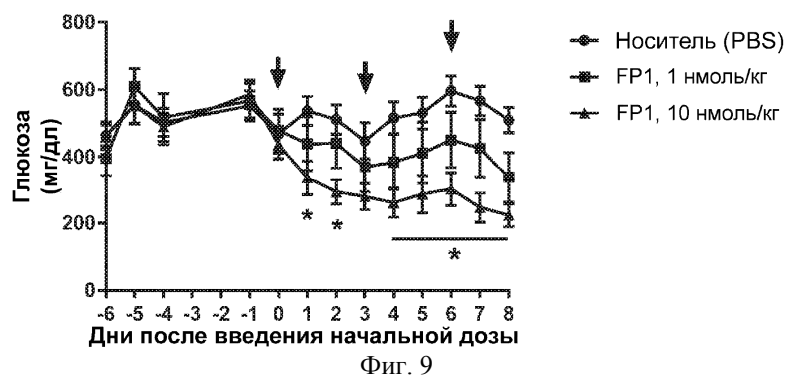
Фиг. 6



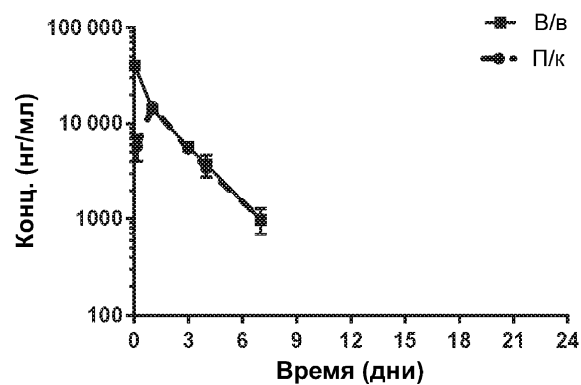
Фиг. 7



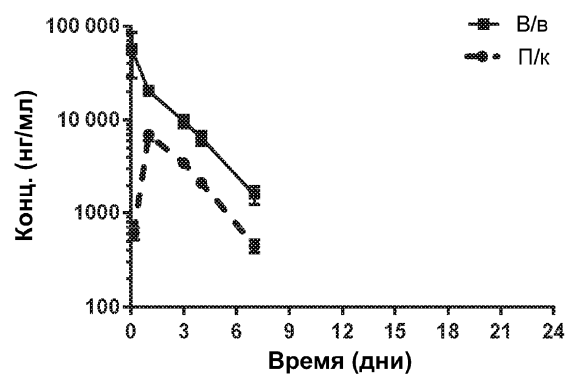
Фиг. 8



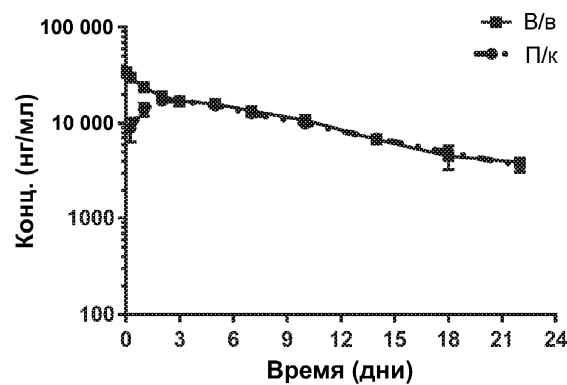
Фиг. 9



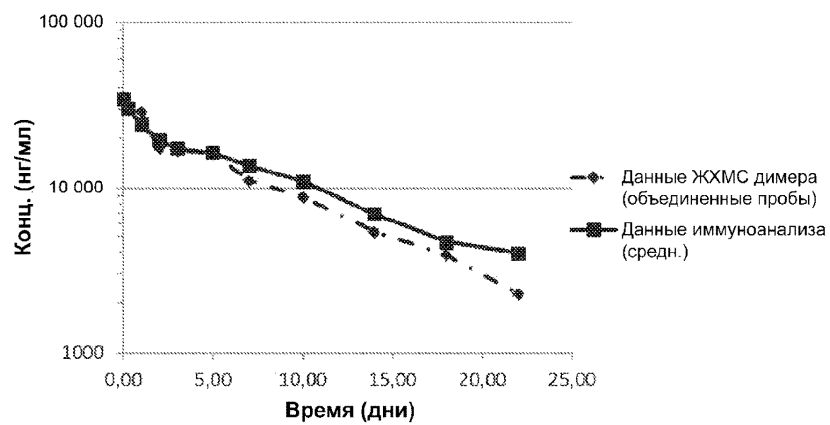
Фиг. 10



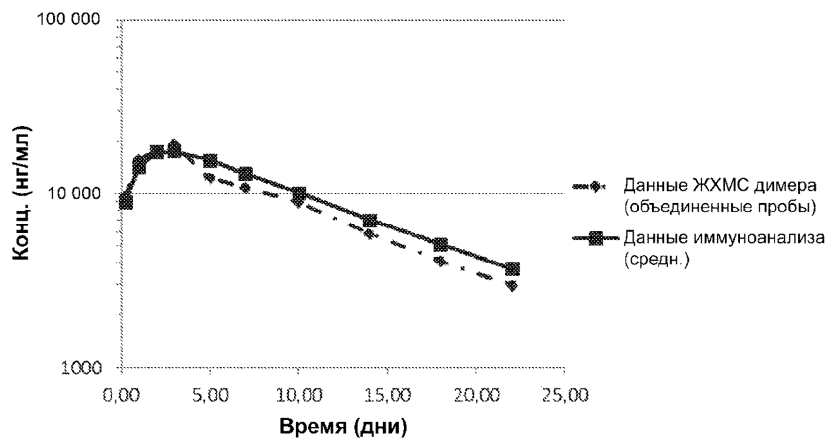
Фиг. 11



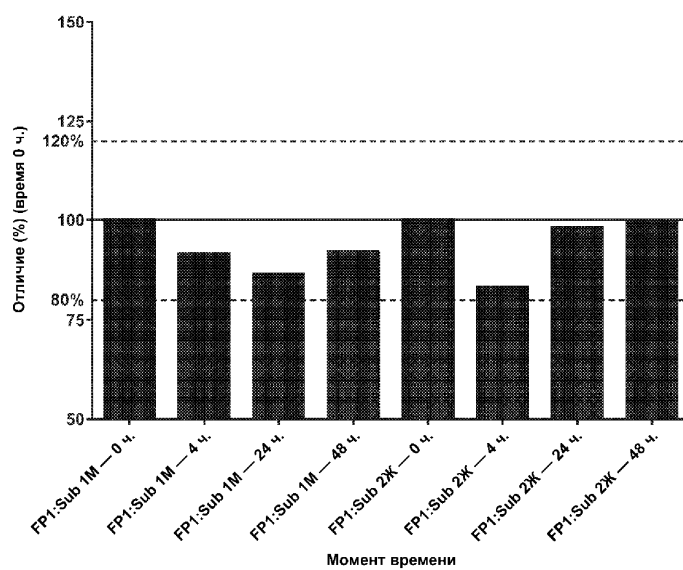
Фиг. 12



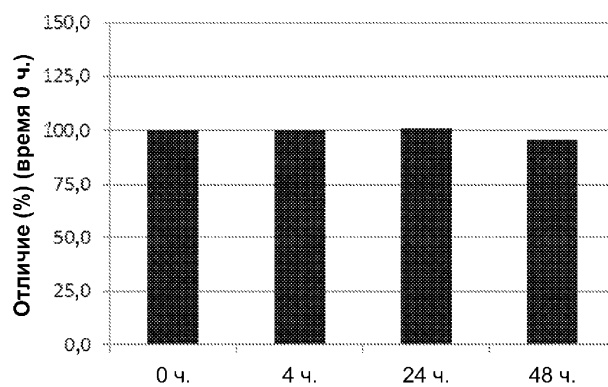
Фиг. 13



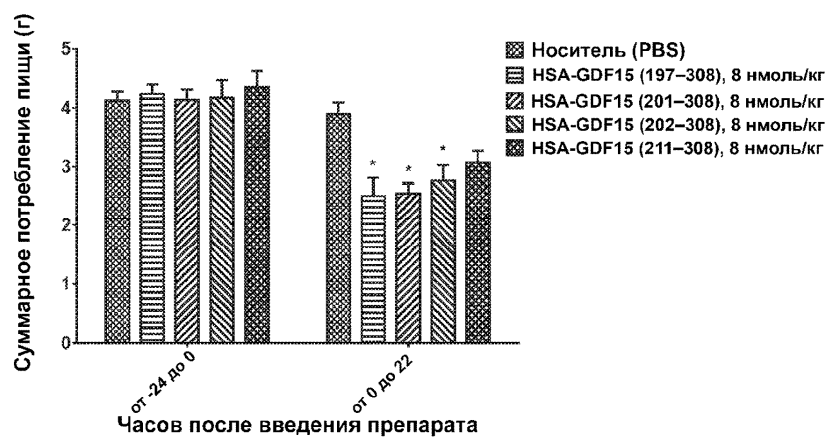
Фиг. 14



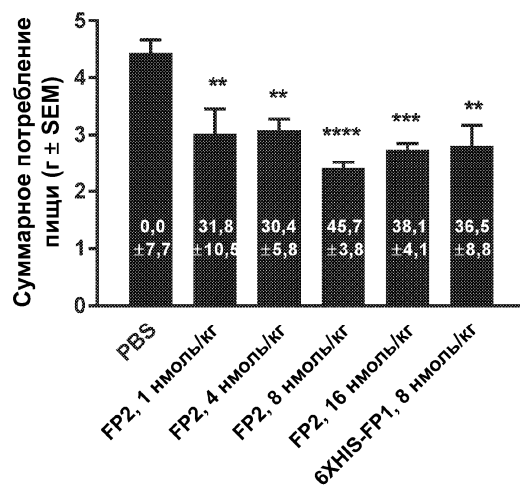
Фиг. 15



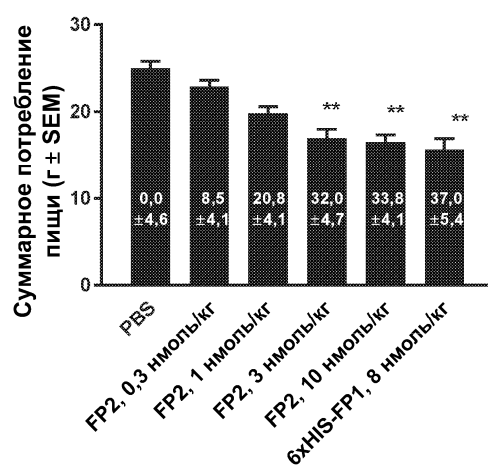
Фиг. 16



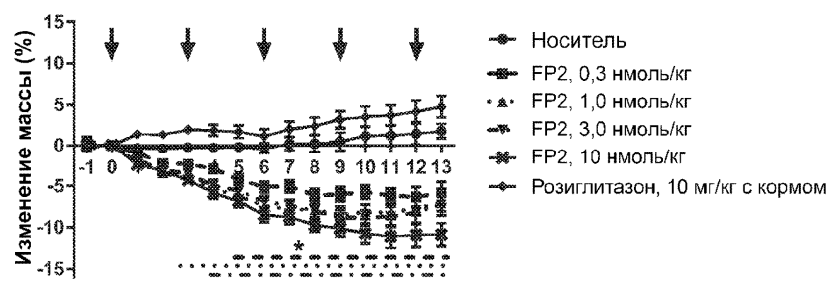
Фиг. 17



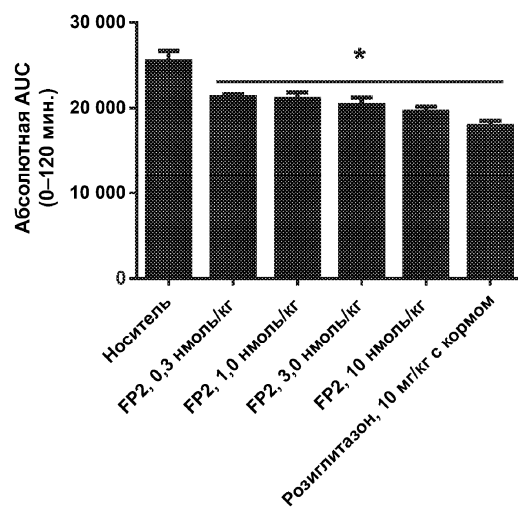
Фиг. 18



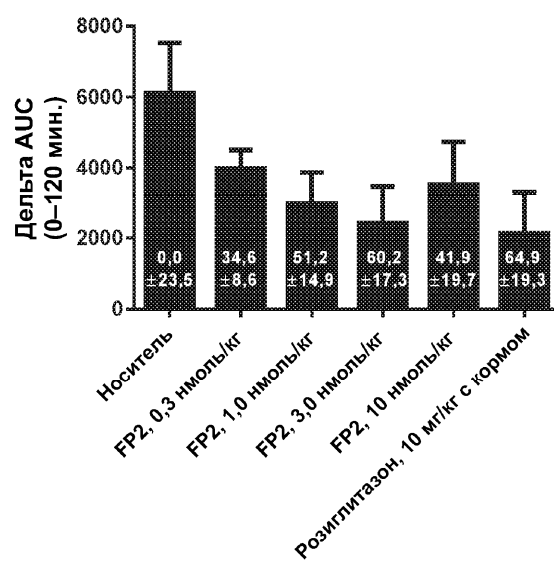
Фиг. 19



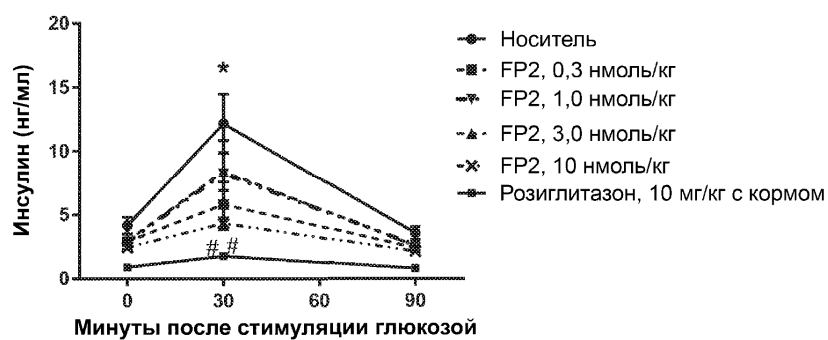
Фиг. 20



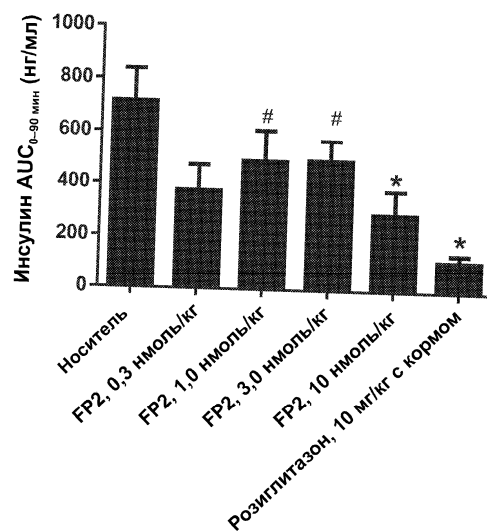
Фиг. 21А



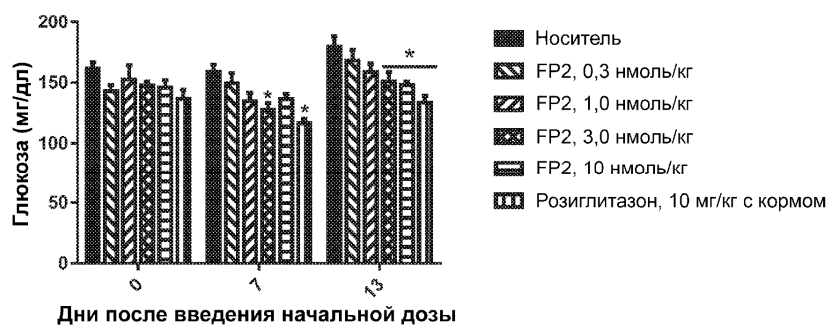
Фиг. 21В



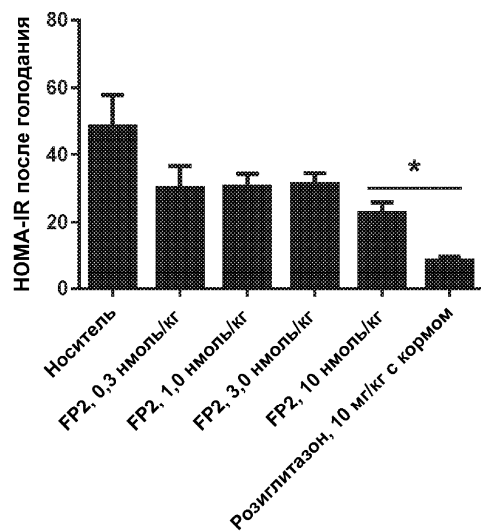
Фиг. 22А



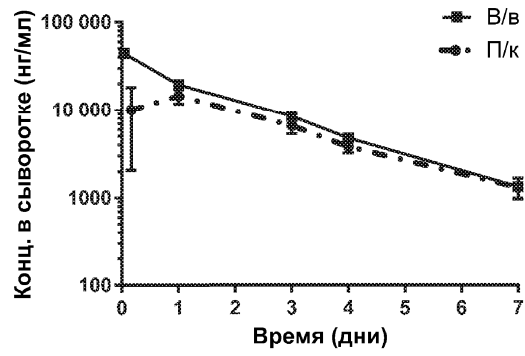
Фиг. 22В



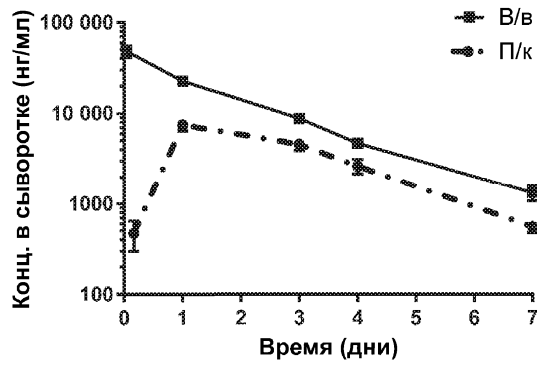
Фиг. 23



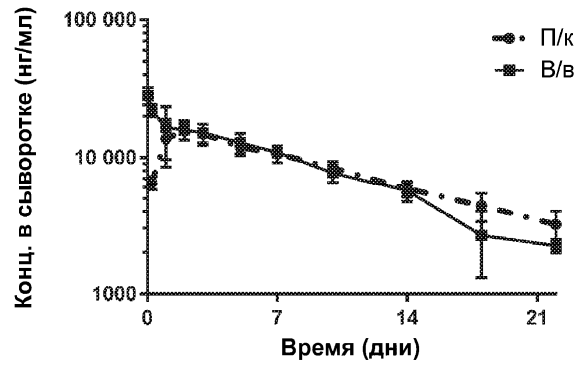
Фиг. 24



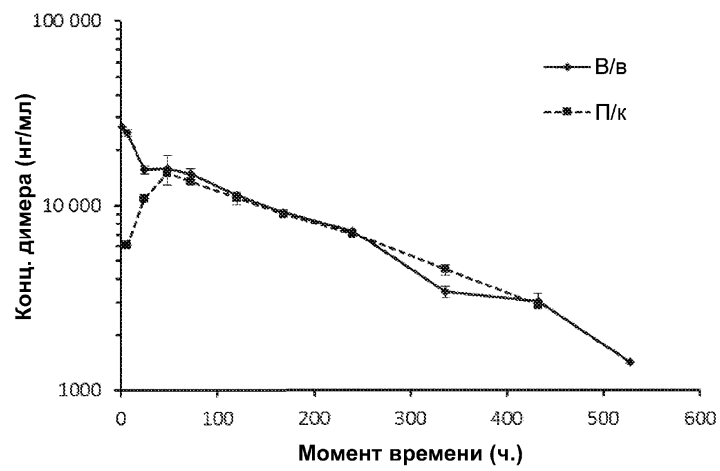
Фиг. 25



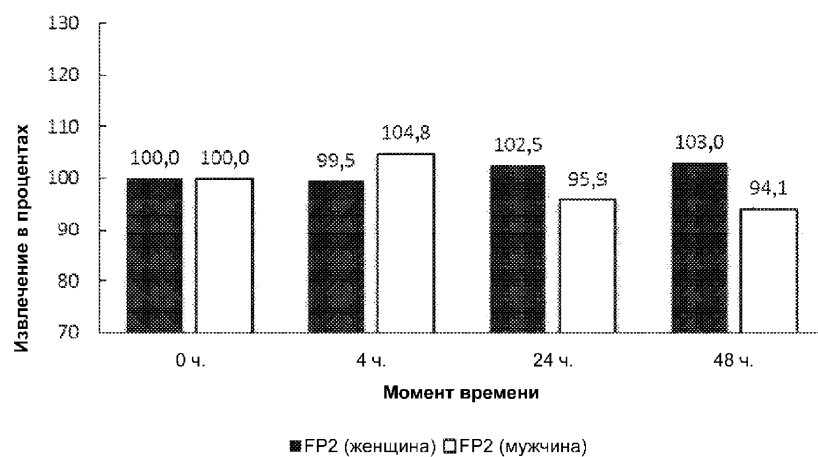
Фиг. 26



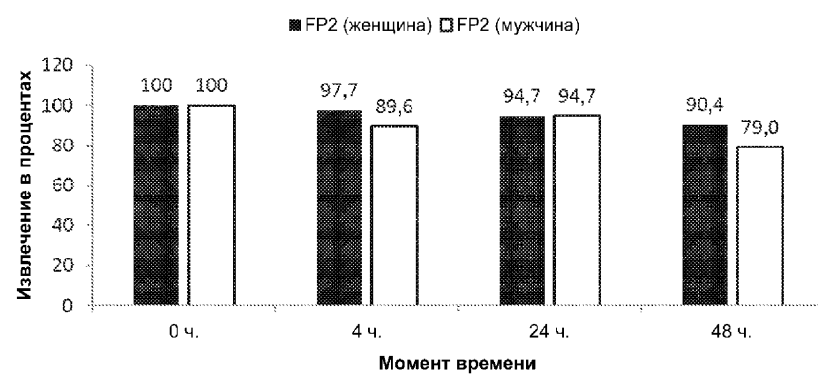
Фиг. 27



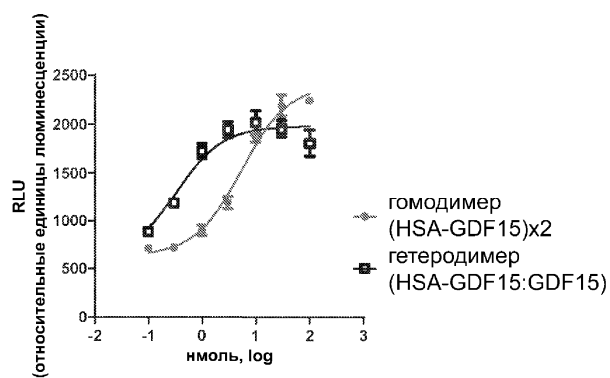
Фиг. 28



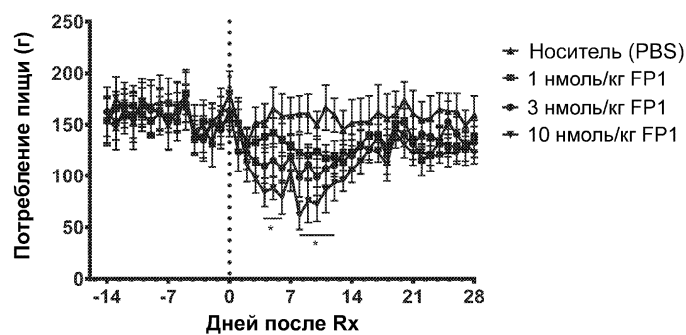
Фиг. 29



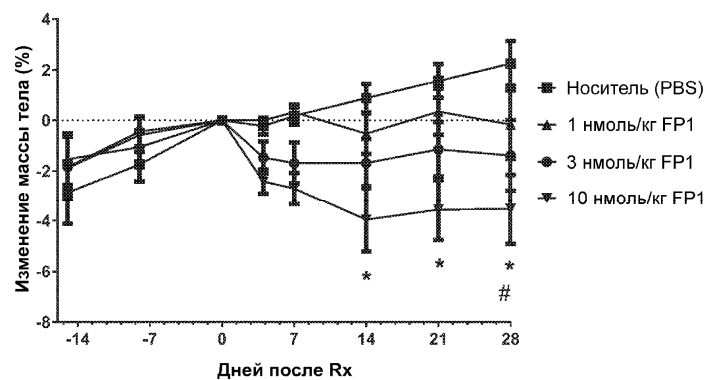
Фиг. 30



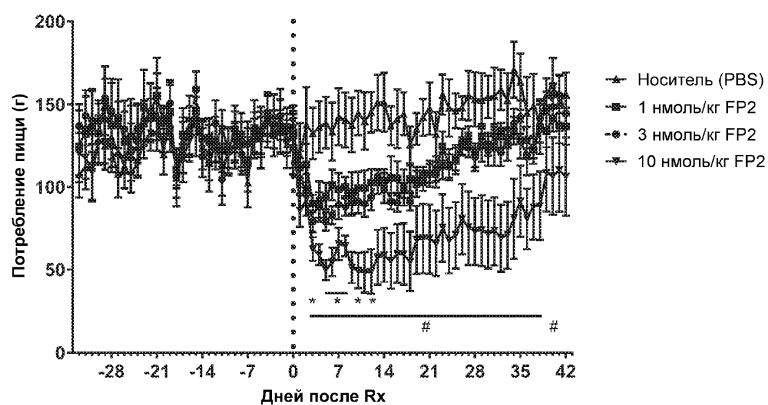
Фиг. 31



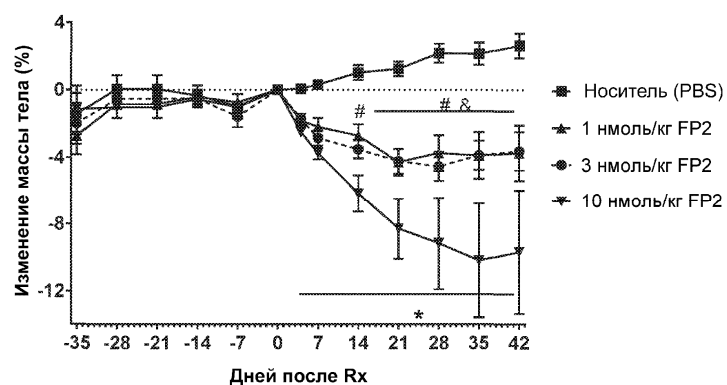
Фиг. 32



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35

