(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190427 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.28

(22) Дата подачи заявки
2013.02.27

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

(54) КОМПОЗИЦИИ КОНЪЮГАТА XTEN И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) **61/634,312; 61/690,187; 61/709,942**
(32) **2012.02.27; 2012.06.18; 2012.10.04**
(33) **US**
(62) **201890389; 2013.02.27**

(71) Заявитель:
АМУНИКС ОПЕРЕЙТИНГ ИНК. (US)

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

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

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

202190427 A2

202190427 A2

КОМПОЗИЦИИ КОНЪЮГАТА XTEN И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка истребует приоритет по предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/634312, поданной 17 февраля, 2012, предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/690187, поданной 18 июня, 2012, и предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/709942, поданной 4 октября, 2012, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Продление периода полувыведения лекарственного средства, которое является лечебным белком, пептидом или небольшой молекулой, часто требует использования специальных рецептур или модификации самого лечебного фактора. Стандартные способы модификации такие как пэгилирование, добавление к лечебному агенту фрагмента антитела или молекулы альбумина, имеют несколько принципиальных недостатков. В то время как эти модифицированные формы могут быть получены в промышленном масштабе, эти стандартные способы обычно подвержены недостаткам из-за высокой стоимости сырья, сложности процесса производства и низкого качества конечного продукта. Нередко является сложным, даже невозможным, очистить целевой материал до гомогенного состояния Это утверждение, в частности, справедливо для процесса пэгилирования, в котором саму реакцию невозможно точно контролировать для получения гомогенного набора пэгилированных агентов, которые несут одинаковое количество или массу полиэтиленгликоля. В дальнейшем, метаболиты этих пэгилированных агентов могут обладать серьезным побочным действием. Например, было обнаружено, что пэгилированные белки вызывают вакуолизацию почечных канальцев на моделях животных (Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G. & Shopp, G. Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. Toxicol. Sci. 1998. 42, 152–157). Выводимые почками пэгилированные белки или их метаболиты могут аккумулироваться в почках, приводя к образованию гидратов ПЭГ, которые препятствуют нормальной гломерулярной фильтрации. Кроме того, у животных и людей может индуцироваться образование антител к ПЭГ (Sroda, K. et al. Repeated injections of PEG-PE liposomes generate anti-PEG antibodies. Cell. Mol. Biol. Lett. 2005.10, 37–47).

[0003] Поэтому, сохраняется значительная потребность в получении альтернативных композиций и способов, пригодных для получения высокоочищенных форм лечебных агентов, обладающих увеличенным периодом полувыведения и приемлемой ценой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности и обеспечение соответствующих преимуществ. Композиции и способы, раскрываемые в данном тексте применимы не только для терапии, но также особенно подходят как средства для доклинических и клинических разработок вероятных лечебных агентов. В некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности, частично путем получения реагентов расширенного рекомбинантного полипептида (XTEN), которые могут быть очищены до гомогенного состояния одной или несколькими простыми стадиями и/или которые пригодны для химической конъюгации с нагрузочными пептидами, белками или небольшими молекулами с реакционно-способными группами, используя широкое разнообразия методов конъюгации. Использование XTEN-реагентов обеспечивает с высоким выходом образование продукта XTEN-связанного агента, который в одном или большем количестве аспектов является исключительным, включая высокую гомогенность, высокую растворимость, длительную стабильность и повышенный конечный период полувыведения по сравнению с неконъюгированным продуктом.

[0005] Настоящее изобретение частично относится к новым композициям содержащим в основном гомогенные расширенные рекомбинантные полипептиды (XTEN) подходящие в качестве конъюгационных участников для связывания с одним или более нагрузочных фармакологически или биологически активных агентов, что приводит к получению композиций XTEN-нагрузочное вещество. В одном аспекте это изобретение предлагает полипептид XTEN, сконструированный для ковалентного связывания с одним или более непосредственно или через кросс-линкеры, обеспечивая получение композиций XTEN-нагрузочное вещество, которое включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более молекул одного, двух, трех и более типов нагрузочных веществ. Объектом настоящего изобретения является предоставление таких сконструированных полипептидов XTEN, которые используются в получении конъюгатов с интересующими нагрузочными агентами в виде композиций с расширенными фармацевтическими свойствами, включающими расширенные фармакокинетические свойства. В этом изобретении предложены полипептиды XTEN, которые в основном гомогенные по длине и последовательности и которые пригодны для получения конъюгатов, содержащих XTEN, связанный с одним или более нагрузочных веществ, что приводит к получению конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, обладающих высокой степенью чистоты. Такие конъюгаты высокой степени чистоты пригодны для получения фармацевтических композиций для пациентов с болезненным состоянием, для которого одно или более нагрузочных веществ обладают полезным действием для предупреждения, лечения или облегчения этого болезненного состояния.

[0006] В первом аспекте изобретения предложены в основном композиции с гомогенным полипептидом XTEN, пригодные как конъюгационные участники для получения промежуточных веществ XTEN-кросс-линкер и композиций XTEN-нагрузочное вещество. В некоторых вариантах изобретение предоставляет в основном гомогенную популяцию полипептидов, включающих расширенный рекомбинантный полипептид (XTEN), и в которой по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул полипептида упомянутой популяции обладают идентичной длиной последовательностей. В одном варианте вышеуказанного осуществления изобретения полипептид XTEN обладает такими характеристиками: общее количество аминокислотных остатков в XTEN составляет по меньшей мере от 36 до около 3000 аминокислотных остатков; суммарное количество остатков глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P) составляет более 90% от общего количества аминокислотных остатков XTEN; последовательность XTEN в основном не содержит повторений, так что (i) последовательность XTEN не содержит три последовательные идентичные аминокислоты, если только эти аминокислоты не являются серином, (ii) по меньшей мере около 80% или около 90% или около 95% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательности, каждый из мотивов последовательности состоит из от около 9 до около 14 аминокислотных остатков, в которых какие-либо два последовательных аминокислотных остатка не встречаются чаще, чем дважды в каждом из мотивов последовательности; или (iii) последовательность XTEN обладает числом подпоследовательностей меньше 10; последовательность XTEN несет больше 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или больше 99% случайных статистических клубков, определенных GOR-алгоритмом; последовательность XTEN несет меньше 2% или 3% или 4% или 5% альфа-спиралей; последовательность XTEN несет меньше 2% или 3% или 4% или 5% бета-слоев, определенных алгоритмом Чоу-Фасман; и последовательность XTEN не содержит вычисленных эпитопов Т-клеток при анализе алгоритмом TEPITOPE, в котором расчет алгоритма TEPITOPE для эпитопов в последовательности XTEN основан на значениях -8 или -9 или -10. В другом варианте вышеуказанного осуществления изобретения полипептид XTEN включает последовательность, обладающую по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблицах 2, 3, 4 и 22-25.

[0007] В других вариантах осуществления изобретения композиции в основном гомогенного полипептида XTEN содержат один или большее количество аффинных маркеров. В одном варианте осуществления в изобретении предложено композицию в основном гомогенного полипептида XTEN, содержащего первый аффинный маркер, в которой первый аффинный маркер имеет связывающую аффинность к хроматографическому носителю, выбранному из группы, состоящей из носителей для хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (HIC), катионобменной, анионобменной, аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (IMAC) и иммобилизованными антителами. В одном варианте вышеуказанного осуществления изобретения первый аффинный маркер обладает по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или по меньшей мере около 95% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблице 7. В другом варианте вышеуказанного полипептида XTEN и аффинного маркера композиция дополнительно содержит одну или больше вспомогательных последовательностей. В одном варианте вспомогательная последовательность, содержит последовательность, обладающую по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблице 10. В другом варианте вспомогательная последовательность выбирается из группы, состоящей из последовательностей: KNPEQAEEQX1EET, в которой X1 является независимо S или R; ANPEQAEEQX1EET, в которой X1 – независимо S или R; KNPEQAEEQAEEQX1EET, в которой X1 – независимо S или R; KX2X3EQAEEQAEEQX1EET, в которой X1 – независимо S или R, X2 – независимо K или N и X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; $KX2(X3)_{10}QX1EET$, в которой X1 – независимо S или R, X2 – независимо K или N и X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; $KX2(X3)_7AEEQX1EET$, в которой X1 – независимо S или R, X2 K или N и X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; $KX2X3EQE(X3)_3AEEQREET$, в которой X2 – независимо K или N и X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; $KX2X3EQE(X3)_3AEE(X3)_5$, в которой X2 – независимо K или N и X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; $KKQEQEKEQAEEQ(X4X5)_2REET$, в которой X4 – независимо A или S и X5 – независимо K, Q или E; $KKQEQEKEQAEEQ(X4X5)_4REET$, в которой X4 – независимо A или S и X5 – независимо K, Q или E; $KKQEQEKEQAEEQ(Z)_4REET$, в которой Z – любая встречающаяся в природе L-аминокислота; $KX2(X3)_n$, в которой n – целым числом в пределах 10-40 и X2 – независимо K или N и X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S; $(X3)_n$, в которой n – целое число в пределах 10-50 и X3 – независимо K, N, T,

Q, H, P, E, D, A, R или S; $KX2QEQEKEQAEEQ(X4X5)_nX1EET$, в которой n равно нулю или целому числу в пределах 1-10 и X1 – независимо S или R, X2 – независимо K или N, X4 – независимо A или S и X5 – независимо K, Q или E; $KX2(X3)_n(X4X5)_mX1EET$, в которой n является целым числом в пределах 5-20, m равно нулю или целому число в пределах 1-10, X1 – независимо S или R, X2 – независимо K или N, X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S, X4 – независимо A или S и X5 – независимо K, Q или E и $KX2(X3)_n(Z)_mX1EET$, в которой n является целым числом в пределах 5-20, m равно нулю или целому число в пределах 1-10, X1 – независимо S или R, X2 – независимо K или N, X3 – независимо K, N, T, Q, H, P, E, D, A, R или S, и Z – любая встречающаяся в природе L-аминокислота и любая гомологичная последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с последовательностью вышеуказанных последовательностей при оптимальном выравнивании.

[0008] В другом варианте вышеуказанных композиций в основном гомогенного полипептида XTEN, аффинного маркера и вспомогательной последовательности, эта композиция дополнительно содержит первую расщепляемую последовательность. Если требуется, расщепляемая последовательность выбирается из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблицах 8 и 9. В одном варианте вышеизложенного композиция обладает конфигурацией согласно формуле I:

(HS)-(AT1)-(CS1)-(XTEN) I

где: HS – вспомогательная последовательность; AT1 – первый аффинный маркер; CS1 – первая расщепляемая последовательность и XTEN – расширенный рекомбинантный полипептид. В другом варианте вышеуказанных композиций, композиция дополнительно содержит вторую расщепляемую последовательность. Если требуется, первая и вторая расщепляемые последовательности способны расщепляться теми же протеазами и для которых композиция обладает конфигурацией согласно формуле II:

(HS)-(CS1)-(XTEN)-(CS2)-(AT1) II

где: HS – вспомогательная последовательность; AT1 – первый аффинный маркер; CS1 – первая расщепляемая последовательность, CS2 – вторая расщепляемая последовательность и XTEN – расширенный рекомбинантный полипептид. В другом варианте вышеуказанных композиций, первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR, HHHHHH или любой аффинный маркер, известный в этой области или раскрываемый в данном тексте.

[0009] В других вариантах осуществления композиций в основном гомогенных полипептидов XTEN, эти композиции включают первый и второй аффинный маркер, первую и вторую расщепляемую последовательность и вспомогательную последовательность, в которых второй аффинный маркер отличается от первого аффинного маркера и обладает связующей аффинностью к другому хроматографическому носителю отличному от первого аффинного

маркера, при этом хроматографический носитель выбирается из множества, состоящего из HIC, катиоонобменной, анионобменной, IMAC и хроматографии с иммобилизованными антителами и, при этом первая и вторая расщепляемую последовательность способны расщепляться той же протеазой и, при этом аффинный маркер обладает по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или по меньшей мере около 95% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблице 7. В одном варианте вышеизложенной композиции, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле III:

(HS)-(AT1)-(CS1)-(XTEN)-(CS2)-(AT2) III

[0010] где: HS – вспомогательная последовательность; AT1 – первый аффинный маркер; CS1 – первая расщепляемая последовательность, CS2 – вторая расщепляемая последовательность, XTEN – расширенный рекомбинантный полипептид и AT2 – второй аффинный маркер. В другом варианте вышеуказанной композиции, первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR, а второй аффинный маркер содержит последовательность HHHHHH. В другом варианте вышеуказанной композиции, первый аффинный маркер содержит последовательность HHHHHH, а второй аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR. В другом варианте вышеуказанной композиции, первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, а второй аффинный маркер содержит последовательность HHHHHHHH.

[0011] В другом аспекте в данном изобретении предложены композиции, содержащие в основном гомогенную популяцию полипептида, полученного в технологическом процессе. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции получают в процессе, включающем: культивирование клеток-хозяина, которые содержат вектор, кодирующий полипептид в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии данного полипептида путем экспрессии неочищенного продукта клеткой-хозяином, при которой кодированный полипептид включает полипептид XTEN, первую расщепляемую последовательность и первый аффинный маркер; адсорбцию полипептида неочищенного продукта экспрессии на первом хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания первого аффинного маркера на первом хроматографическом носителе; элюирование полипептида и выделение полипептида. В некоторых вариантах по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% полипептидов полученной популяции имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель выбирается из множества, состоящего из HIC, катионобменной, анионобменной и IMAC-хроматографии. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции аффинный маркер выбирается из группы, состоящей из аффинных

маркеров Таблице 7. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является катионобменным и первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является и IMAC носителем и первый аффинный маркер содержит последовательность HHHHHHHH. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции кодирующий вектор кодирует любые варианты осуществления полипептида XTEN, описанные в данном тексте, содержащие по меньшей мере аффинный маркер, по меньшей мере первую расщепляемую последовательность, вспомогательную последовательность и, в некоторых случаях вторую расщепляемую последовательность. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции вектор дополнительно кодирует вторую расщепляемую последовательность и второй аффинный маркер, в которых первая и вторая расщепляемая последовательность способны расщепляться той же протеазой и, при этом второй аффинный маркер обладает связующей аффинностью ко второму другому хроматографическому носителю отличному от первого аффинного маркера, при этом композиция получается в процессе дополнительно включающем: адсорбцию полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания второго аффинного маркера на втором хроматографическом носителе; элюирование полипептида и выделение полипептида, в котором по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% популяции полипептидов обладают идентичной длиной последовательности. В одном варианте осуществления первый хроматографический носитель отличается от второго хроматографического носителя и каждый из первого и второго хроматографического носителя независимо выбираются из множества, состоящего из HIC, катионобменной, анионобменной и IMAC-хроматографии. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является катионобменным, а первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, и второй хроматографический носитель является IMAC-носителем, а первый аффинный маркер содержит последовательность HHHHHHHH или HHHHHHHH. В другом варианте вышеуказанной композиции первый хроматографический носитель является IMAC-носителем, а первый аффинный маркер содержит последовательность HHHHHHHH или HHHHHHHH, и второй хроматографический носитель является катионобменным, а первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR. В другом варианте вышеуказанные композиции содержат первый или первый и второй аффинные маркеры, которые в дальнейшем процессируют обработкой композиции протеазой в условиях эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности(ей), при этом высвобождая полипептид XTEN от аффинного(ых) маркера(ов); адсорбцией XTEN на

хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания полипептида XTEN, но не аффинного(ых) маркера(ов) или протеазы; элюирования XTEN и выделения полипептид XTEN. В получаемой композиции по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных XTEN-молекул имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способны расщепляться протеазой, выбранной из множества протеаз в Таблице 9. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способна(ы) расщепляться трипсином и протеаза является трипсином. В другом варианте вышеуказанной композиции хроматографический носитель является анионобменным. Анионобменный носитель может быть носителем, выбранном из группы, состоящей из носителей: macrocap Q, capto Q, superQ-650M и poros D. Альтернативно, вышеуказанные композиции содержат один аффинный маркер или два аффинных маркера, которые в дальнейшем процессируют обработкой композиции в условиях эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности(ей), при этом высвобождая полипептид XTEN от одного или двух аффинных маркеров; адсорбцией XTEN на хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания протеазы и аффинных маркеров, но не полипептида XTEN и выделением полипептида XTEN из элюата. В некоторых вариантах в получаемой элюате по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных XTEN-молекул имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способна(ы) расщепляться протеазой, выбранной из множества протеаз в Таблице 9. В другом варианте осуществления вышеуказанной композиции расщепляемая(ые) последовательность(и) способна(ы) расщепляться трипсином и используемая протеаза является трипсином. Хроматографический носитель может выбираться из одного или более носителей для катионобменной, HIC или IMAC-хроматографии.

[0012] В другом аспекте данное изобретение относится частично к полипептидным композициям, которые могут расщепляться на сегменты XTEN равной длины и одинаковой последовательности. В одном варианте осуществления изобретения предлагается композиция, включающая последовательность XTEN, в которой последовательность XTEN дополнительно содержит одну или большее количество расщепляемых последовательностей способных разрушаться трипсином, и при этом обработка трипсином в условиях, эффективных для разрушения всех расщепляемых последовательностей, приводит к получению XTEN-фрагментов, при чем каждый XTEN-фрагмент обладает по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью с любым другим фрагментом этого препарата. В одном варианте осуществления композиции расщепляемая последовательность обладает по меньшей

мере 86% идентичности последовательности или является идентичной последовательности SASRSA или SASKSA. В другом варианте композиции расщепляемая последовательность включает последовательность RX или KX, в которых X является какой-либо L-аминокислотой, но не пролином. В одном варианте вышеуказанного осуществления композиций XTEN-композиция обладает последовательностью по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностями, выбранными из множества последовательностей, отраженными в Таблице 6.

[0013] В другом аспекте данное изобретение относится частично к способам получения XTEN-фрагментов в основном равной длины и одинаковой последовательности. В одном варианте изобретение предоставляет способ получения в основном гомогенной популяции полипептида XTEN, данный способ включает обработку популяции, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 6, трипсином в условиях эффективных для разрушения всей(х) расщепляемой(ых) последовательности(ей), что приводит к получению в основном гомогенной популяции полипептидов XTEN, в которой по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул XTEN-фрагментов имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте вышеуказанного способа данный способ дополнительно включает адсорбцию XTEN-фрагментов на хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания XTEN-фрагментов, но не протеазы; элюирование XTEN-фрагментов и выделение XTEN-фрагментов, при этом по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул популяции имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте вышеуказанного способа хроматографический носитель является анионобменным. Носитель может быть выбран из группы, состоящей из носителей: macrocap Q, capto Q, superQ-650M и poros D. В другом варианте реализации вышеуказанного способа полипептид XTEN обладает последовательностью по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99% идентичности с последовательностью к последовательностям, выбранным из множества последовательностей, отраженных в Таблице 6. В другом варианте реализации вышеуказанного способа получаемый XTEN-фрагмент обладает последовательностью по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 или 3. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает композиции полипептидов XTEN полученные в процессе вышеуказанных способов его осуществления.

[0014] В другом аспекте данное изобретение относится частично к способам получения высокого выхода экспрессии в клетке-хозяине полипептидов XTEN. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предлагает способ, включающий культивирование клетки-

хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и вспомогательную последовательность в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии полипептида, как компонента неочищенного продукта экспрессии в концентрации больше чем около 2 грамм/литр (г/л), или около 3 г/л, или около 4 г/л, или около 5 г/л, или около 6 г/л, или около 7 г/л упомянутого полипептида. В одном варианте вышеуказанного способа вышеизложенные выходы экспрессии достигаются, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 100 или по меньшей мере 130 или по меньшей мере 150 при длине волны 600 нм. В другом варианте реализации данное изобретение предлагает способ, включающий культивирование клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и вспомогательную последовательность в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии полипептида, как компонента неочищенного продукта экспрессии в концентрации больше чем около 10 миллиграмм/литр сухой массы клеток-хозяев (мг/л), или по меньшей мере около 15 мг/л, или по меньшей мере около 20 мг/л, или по меньшей мере около 25 мг/л, или по меньшей мере около 30 мг/л, или по меньшей мере около 40 мг/л, или по меньшей мере около 50 мг/л упомянутого полипептида. В одном варианте вышеуказанного способа вышеизложенные высокие выходы экспрессии достигаются, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 100, или по меньшей мере 130, или по меньшей мере 150 при длине волны 600 нм. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает способ, включающий культивирование клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и вспомогательную последовательность в реакции ферментации в условиях, эффективных для экспрессии полипептида, как компонента неочищенного продукта экспрессии в концентрации больше чем около 10 миллиграмм/литр сухой массы клеток-хозяев (мг/л), или по меньшей мере около 250 микромоль/л, или по меньшей мере около 300 микромоль/л, или по меньшей мере около 350 микромоль/л, или по меньшей мере около 400 микромоль/л, или по меньшей мере около 450 микромоль/л, или по меньшей мере около 500 микромоль/л упомянутого полипептида. В одном варианте вышеуказанного способа вышеизложенные выходы экспрессии достигаются, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 100, или по меньшей мере 130, или по меньшей мере 150 при длине волны 600 нм. В одном варианте вышеуказанной реализации изобретения вспомогательная последовательность экспрессируемого полипептида является N-концевым полипептидом, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью последовательности или является идентичной последовательности, выбранной из множества, состоящего из последовательностей,

отраженных в Таблице 10. В другом варианте осуществления вышеуказанных способов вектор экспрессии дополнительно кодирует первый аффинный маркер и расщепляемую последовательность между аффинным маркером и полипептидом XTEN и данный способ дополнительно включает выделение неочищенного продукта экспрессии из реакционной смеси ферментации клеток-хозяев; адсорбцию полипептида неочищенного продукта экспрессии на первом хроматографическом носителе, при которой первый хроматографический носитель выбирается из группы, состоящей из носителей HIC, катионобменной, анионобменной и IMAC-хроматографии; элюирование и выделение полипептида, в котором по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% полипептидов обладают идентичной длиной последовательности. В другом варианте осуществления вышеуказанных способов вектор экспрессии дополнительно кодирует первый аффинный маркер и второй аффинный маркер, отличный от первого аффинного маркера и расщепляемой последовательности между каждым аффинным маркером и полипептидом XTEN и данный способ дополнительно включает выделение неочищенного продукта экспрессии из реакционной смеси ферментации клеток-хозяев; адсорбцию полипептида на хроматографическом носителе, при этом первый хроматографический носитель выбирается из группы, состоящей из носителей HIC, катионобменной, анионобменной и IMAC-хроматографии; элюирование полипептида; адсорбцию полипептида на втором хроматографическом носителе выбираемом из группы, состоящей из носителей HIC, катионобменной, анионобменной и IMAC-хроматографии; элюирование полипептида и выделение полипептида, в котором по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% полипептидов обладают идентичной длиной последовательности. В одном варианте вышеуказанных способов данные способы дополнительно включают обработку полипептида протеазой в условиях эффективных для разрушения расщепляемой(ых) последовательности (ей), таким образом из полипептида высвобождается XTEN; адсорбцию полипептида XTEN на анионном хроматографическом носителе в условиях эффективных для захватывания XTEN; элюирование XTEN и выделение XTEN, при этом по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных XTEN-молекул имеют идентичную длину последовательностей. В вышеуказанных способах анионобменный носитель может быть носителем, выбранным из группы, состоящей из носителей: macrocap Q, capto Q, superQ-650M и poros D. В одном варианте осуществления вышеуказанных способов расщепляемая (ые) последовательность (и) способны расщепляться трипсином и протеаза является трипсином. В другом варианте вышеуказанных способов данный способ дополнительно включает обработку полипептида протеазой в условиях эффективных для разрушения расщепляемой (ых) последовательности (ей), таким образом из полипептида высвобождается XTEN; адсорбцию протеазы на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания протеазы и

аффинных маркеров, но не XTEN, и выделение XTEN из элюата, в котором по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% полипептида XTEN обладает идентичной длиной последовательности. В одном варианте осуществления вышеуказанного способа расщепляемая последовательность способна расщепляться трипсином и используемая протеаза является трипсином. В вышеуказанном способе для захватывания протеазы и аффинного маркера хроматографический носитель может выбираться из одного или более носителей для катионобменной, HIC или IMAC-хроматографии.

[0015] В другом аспекте данное изобретение частично относится к твердой подложке, содержащей иммобилизованную на ней популяцию в основном идентичных молекул полипептида XTEN. В одном варианте реализации в данном изобретении предлагается твердая подложка, содержащая иммобилизованную на ней популяцию в основном идентичных молекул полипептида, при этом твердая подложка содержит иммобилизованную на ней популяцию в основном идентичных молекул полипептида, при этом твердая подложка содержит хроматографический носитель, иммобилизованные полипептиды, каждый включающий XTEN, первый аффинный маркер и второй аффинный маркер, при этом первый аффинный маркер присоединен к полипептиду XTEN расщепляемой последовательностью к N-концу XTEN и второй аффинный маркер присоединен к полипептиду XTEN расщепляемой последовательностью к С-концу и при этом второй аффинный маркер отличается от первого аффинного маркера, при этом хроматографический носитель способен связываться с упомянутым первым или вторым аффинным маркером, но не с обеими и при этом по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% иммобилизированных молекул полипептида имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте вышеуказанного осуществления изобретения полипептид XTEN включает последовательность, обладающую по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблицах 2, 3, 4 и 22-25, первый и второй аффинный маркер каждый независимо обладает по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или по меньшей мере около 95% идентичностью последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, отображенных в Таблице 7 и расщепляемая последовательность выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отображенных в Таблицах 8 и 9. В одном варианте вышеуказанного осуществления расщепляемая последовательность обладает по меньшей мере около 86% идентичности с последовательностью или является идентичной последовательности SASRSA или SASKSA. В

одном варианте вышеуказанной реализации расщепляемая последовательность включает последовательность RX или KX, в которых X является какой-либо L-аминокислотой, но не пролином. В одном варианте вышеуказанного осуществления твердая подложка выбирается из множества, состоящего из хроматографической смолы HIC, катионобменной хроматографической смолы, анионобменной хроматографической смолы и хроматографической смолы IMAC. В одном варианте вышеуказанного осуществления первый аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, а второй аффинный маркер содержит последовательность HHHHHH или HHHHHHHH. В другом варианте вышеуказанного осуществления первый аффинный маркер содержит последовательность HHHHHH или HHHHHHHH, а второй аффинный маркер содержит последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR.

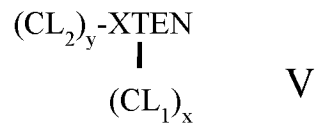
[0016] В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям полипептидов XTEN конъюгационно связанных к кросс-линкерам. В некоторых вариантах в данном изобретении представлены композиции любых полипептидов XTEN, описанных в данном тексте, которые ковалентно связаны с одной или более молекул по меньшей мере первого кросс-линкера, в которых кросс-линкер выбирается из группы, содержащей кросс-линкеры, отображенные в Таблице 13, алкиновые реактанты, отображенные в Таблице 15 и азидные реактанты, отображенные в Таблице 15. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции первый кросс-линкер присоединен к по меньшей мере первому полипептиду XTEN в положении, выбранном из множества, состоящего из: альфа-аминогрупп N-концевого аминокислотного остатка полипептида XTEN; эпсилон-аминогрупп каждого остатка лизина полипептида XTEN и тиоловой группы каждого остатка цистеина полипептида XTEN. При необходимости полипептид XTEN этого осуществления обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или на 100% идентичности последовательности к последовательности, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции полипептид XTEN выбирается из группы, состоящей из AE144, AE288, AE432, AE576, AE864, Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199 и кросс-линкера, конъюгационно присоединенного к альфа-аминогруппе N-концевой аминокислоты полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции полипептид XTEN выбирается из группы,

состоящей из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отображенных в Таблице 3 и кросс-линкера, конъюгационно присоединенного к тиоловой группе каждого цистеинового остатка полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции первый кросс-линкер выбирается из множества, состоящего из N-малеинимида, йодацетила, пиридилдисульфида и винилсульфона, 3-пропаргилоксипропановой кислоты, (оксиэтил)$_n$-ацетилена, где n равно 1-10, дибензилциклооктина (ДБЦО), циклооктина (ЦОТ), 3-азид-пропионовой кислоты, 6-азид-гексановой кислоты и (оксиэтил)$_n$-азида, где n равно 1-10. В вышеизложенных в этом параграфе вариантах реализации данный конъюгат имеет конфигурацию согласно формуле IV:

$$\begin{array}{c}(CL_1)_x \\ | \\ XTEN\end{array} \qquad IV$$

где независимо в случае каждого появления: CL_1 является кросс-линкером; x равно целому число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1. При необходимости полипептид XTEN этого осуществления включает последовательностью, обладающей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы IV, CL1 является кросс-линкером, выбранным из Таблицы 13. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций XTEN-кросс-линкер данные композиции дополнительно включают одноатомный остаток первого нагрузочного вещества присоединенного к каждому первому кросс-линкеру, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В одном варианте осуществления вышеуказанного первое нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций XTEN-кросс-линкер данные композиции дополнительно включают нагрузочное вещество, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11 и 12, присоединенных к каждому первому кросс-линкеру.

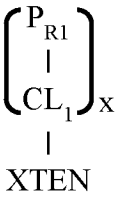
[0017] В других вариантах конъюгационных композиций XTEN-кросс-линкер в данном изобретении представлены композиции осуществления полипептидов XTEN, описанных в данном тексте, которые ковалентно связаны с одной или более молекул первого кросс-линкера, присоединенного к тиоловой группе каждого остатка цистеина XTEN или эпсилон-аминогруппе любого остатка лизина XTEN, а второй кросс-линкер присоединен к альфа-аминогруппе N-концевой аминокислоты XTEN, при этом каждый кросс-линкер независимо выбирается из группы, содержащей кросс-линкеры, отображенные в Таблице 13, алкин-реагенты, отображенные в Таблице 15 и азидные реагенты, отображенные в Таблице 15. В вышеизложенном осуществлении данная композиция обладает конфигурацией согласно формуле V:



V

где независимо в случае каждого появления: CL1 является первым кросс-линкером, присоединенным к остаткам цистеина XTEN; CL2 – второй кросс-линкер, присоединенный к XTEN на N-конце; x – целое число от 1 до около 10; y – целое число от 1 с ограничением x + y ≥ 2; а XTEN является цистеином сконструированного полипептида XTEN, содержащего x остатков цистеина или лизином сконструированного полипептида XTEN, содержащего x остатков лизина. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций XTEN-кросс-линкер данные композиции дополнительно включают одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы, и одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому второму кросс-линкеру, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В одном варианте осуществления вышеуказанного первое нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21 и второе нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть независимо выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21.

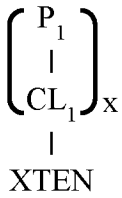
В некоторых вариантах композиции XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле VI:



VI

где независимо в случае каждого появления: P_{R1} является одноатомным остатком нагрузочного вещества, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; CL_1 является кросс-линкером; x равно целому число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 3, или равное 2, или равное 1. При необходимости полипептид XTEN этого осуществления включает последовательностью, обладающей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы VI одноатомный остаток нагрузочного вещества выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте осуществления конъюгата формулы VI CL_1 является кросс-линкером, выбранным из Таблицы 13. В одном варианте реализациионъюгата формулы VI каждый кросс-линкер связан с серой цистеина полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VI каждый кросс-линкер связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VI, x равно 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VI CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы VI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей. В других вариантах осуществления конъюгационных композиций XTEN-кросс-линкер данные композиции дополнительно включают первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому из первых кросс-линкеров, при этом нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21 и второе нагрузочное вещество отличается от первого нагрузочного вещества

присоединением ко второму кросс-линкеру, при этом второе нагрузочное вещество, выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество данная композиция включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому из первых кросс-линкеров, при этом нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из компонентов лекарственных веществ Таблицы 21 и второе нагрузочное вещество отличается от первого нагрузочного вещества, присоединением ко второму кросс-линкеру, при этом второе нагрузочное вещество, выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов из Таблицы 21. В одном варианте осуществления конъюгационной композиции XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество с первым и вторым нагрузочными веществами, одно второе нагрузочное вещество присоединено к N-концу полипептида XTEN через второй кросс-линкер, присоединенный посредством реакции алкинового реактанта и азидного реактанта, выбранных из множества, состоящего из реактантов из Таблицы 15. В некоторых вариантах композиции XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле VII:



VII

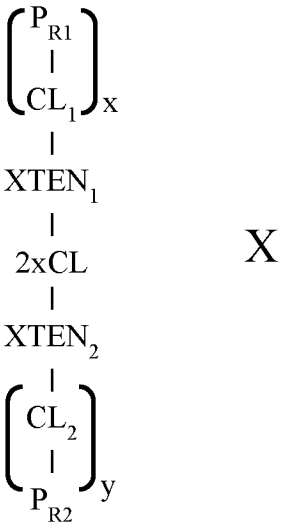
где независимо в случае каждого появления: P_1 – нагрузочное вещество, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21; CL_1 – кросс-линкер; x равно целому число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1 и полипептид XTEN является последовательностью, обладающей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающее 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы VII CL_1 является кросс-линкером, выбранным из Таблицы 13. В одном варианте реализации конъюгата формулы VII каждый кросс-линкер связан с серой цистеина полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VII каждый кросс-линкер связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата

формулы VII x равно 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой полипептида XTEN. В одном варианте осуществления этот конъюгат формулы VII выбирается из группы, состоящей из конъюгатов, отраженных в Таблице 21. В другом варианте осуществления конъюгата формулы VII CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных из Таблицы 15. Для специалиста в этой области знаний понятно, что композиции вышеуказанных осуществлений включают нагрузочное вещество, присоединенное к XTEN-кросс-линкеру с использованием определенных компонентов, представляющих продукты реакции реагирующих веществ и поэтому отличающихся от точной композиции реактантов. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы VII, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей.

[0018] В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям первого и второго полипептидов XTEN, конъюгационно связанных друг с другом. В некоторых вариантах осуществления конъюгационная композиция включает первый и второй полипептиды XTEN, при этом полипептиды XTEN являются одинаковыми или разными и каждый из них независимо обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 3, и при этом первый и второй полипептиды XTEN конъюгационно присоединены друг к другу через N-концы первого и второго полипептида XTEN кросс-линкером, образованным в реакции алкинового реактанта и азидного реактанта, выбранных из группы, состоящей из реагентов Таблицы 15, что приводит к образованию димерного XTEN-конъюгата. В одном варианте осуществления данной димерной XTEN-композиции по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул каждого первого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул любого второго полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей. В одном варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата первый полипептид XTEN обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около

99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, состоящих из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в Таблице 3, а второй полипептид XTEN обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, состоящих из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в Таблице 3. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата первый и второй полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 3. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата первый и второй полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, состоящих из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в Таблице 3. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата каждый из первого и второго полипептида XTEN содержит один или большее количество остатков цистеина и дополнительно включают первый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку цистеина первого полипептида XTEN, а второй кросс-линкер присоединен к каждому остатку цистеина второго полипептида XTEN, при этом первый и второй кросс-линкеры независимо выбраны из набора, состоящего из кросс-линкеров, отраженных в Таблице 13. В другом варианте осуществления данного димерного XTEN-конъюгата любой из первого и второго полипептида XTEN содержат один или большее количество остатков лизина и дополнительно включают первый кросс-линкер, присоединенный к каждому остатку лизина первого и второго XTEN-конъюгата, при этом кросс-линкеры

выбираются из набора, состоящего из кросс-линкеров, отраженных в Таблице 13. В другом варианте реализации димерных полипептидов XTEN присоединенных к кросс-линкерам данный конъюгат дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы, и дополнительно включает одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В вышеуказанном осуществлении первое нагрузочное вещество с одноатомным остатком может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, а второе нагрузочное вещество с одноатомным остатком является нагрузочным веществом, отличным от первого нагрузочного вещества и может быть выбрано из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21. В некоторых вариантах композиции димерных остатков XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле X:

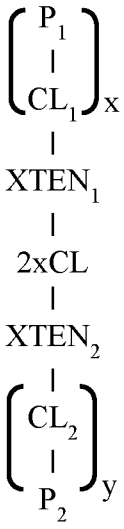


X

где независимо в случае каждого появления: P_{R1} – одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, в котором этот остаток выбирается из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; P_{R2} – одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, в котором этот остаток выбирается из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; CL_1 – кросс-линкер; x – целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1; CL_2 – кросс-линкер, отличный от CL_1; y – целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1 с ограничением $x + y \geq 2$; 2xCL –

альтернативный двухвалентный кросс-линкер или продукт реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных в Таблице 15; $XTEN_1$ – полипептид , обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3 и $XTEN_2$ – полипептид , обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте осуществления конъюгата формулы X CL_1и CL_2 каждый выбирается из группы кросс-линкеров, отраженных в Таблице 13. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X x равно 1, а CL_1связан с N-концевой аминогруппой полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата формулы X, CL_2 является продуктом реакции первого азидного и второго алкинового реактанта клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X каждый CL_1связан с серой цистеина полипептида $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с серой цистеина полипептида $XTEN_2$. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X каждый CL_1связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида $XTEN_2$. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X каждый CL_1связан с серой цистеина полипептида $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида $XTEN_2$. В другом варианте осуществления конъюгата формулы X полипептиды $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются идентичными. В другом варианте реализации конъюгата формулы X полипептиды $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются различными. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы X, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей. В другом варианте осуществления димерного полипептида XTEN, присоединенного к кросс-линкерам, данная композиция дополнительно

включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом первое нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, и дополнительно включает второе нагрузочное вещество, отличающееся от первого нагрузочного вещества, тем что второе нагрузочное вещество присоединено к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом второе нагрузочное вещество, выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21. В другом варианте осуществления димерного полипептида XTEN, присоединенного к кросс-линкерам, данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом первое нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из нацеленных фунциональных частей, отраженных в Таблице 18 или 21, и дополнительно включает второе нагрузочное вещество, отличающееся от первого нагрузочного вещества тем, что второе нагрузочное вещество присоединено к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом второе нагрузочное вещество, выбирается из группы токсинов, отраженных в Таблице 18 или 21. В другом осуществлении димерного полипептида XTEN, присоединенного к кросс-линкерам и первому и второму нагрузочным веществам, первый полипептид XTEN является сегментом Seg 176, отраженным в Таблице 3, а второй полипептид XTEN выбирается из группы, состоящей из Seg 176 и Seg 177, отраженных в Таблице 3. В некоторых вариантах композиции димерных полипептидов XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XI:



XI

где независимо в случае каждого появления: P_1 – первое нагрузочное вещество, выбранное из группы нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21; P_2 – второе нагрузочное вещество, выбранное из группы нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21 и отличающееся от P_1; CL_1 – кросс-линкер; x – целое число от 1 до около 100,

или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1; CL_2 – кросс-линкер, отличный от CL_1; y – целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1 с ограничением $x + y \geq 2$; 2xCL – альтернативный двухвалентный кросс-линкер или продукт реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных в Таблице 15; $XTEN_1$ – первый в основном гомогенный полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 2 и 3 и $XTEN_2$ – второй в основном гомогенный полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата формулы XI CL_1и CL_2 каждый выбирается из группы кросс-линкеров, отраженных в Таблице 13. В другом варианте реализации конъюгата формулы XI x равно 1, а CL_1связан с N-концевой аминогруппой полипептида XTEN. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI, CL_2 является продуктом реакции первого и второго реактанта клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI каждый CL_1связан с серой цистеина полипептида $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с серой цистеина полипептида $XTEN_2$. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI каждый CL_1связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида $XTEN_1$, а каждый CL2 связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида $XTEN_2$. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI каждый CL_1 связан с серой цистеина полипептида $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон-аминогруппой лизина полипептида $XTEN_2$. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI полипептиды $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются идентичными. В другом варианте осуществления конъюгата формулы XI полипептиды $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются различными. В одном варианте осуществления этот конъюгат формулы XI выбирается из группы, состоящей из

конъюгатов, отраженных в Таблице 21. В другом варианте осуществления данное изобретение предлагает получение конъюгата формулы XI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% соответствующих молекул $XTEN_1$ и $XTEN_2$ препарата конъюгата имеют идентичную длину последовательностей.

[0019] В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям первого, второго и третьего полипептида XTEN, конъюгационно связанных друг с другом с получением трехмерных конъюгационных композиций. В некоторых вариантах осуществления конъюгационные композиции включают первый, второй и третий полипептид XTEN, при этом полипептиды XTEN могут быть одинаковыми или могут быть разными и при этом первый, второй и третий полипептид XTEN присоединены друг к другу через N-концы с использованием трехвалентного кросс-линкера, выбранного из набора, состоящего из трехвалентных линкеров, отраженных в Таблице 13 или 14. В одном варианте осуществления данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными или разными и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 2 или 3. В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными или разными и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул любого первого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул каждого второго полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул любого третьего полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей. В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата трехвалентный кросс-линкер выбирается из группы, состоящей из трис-(2-малеинимидоэтил)амина (TMEA) и амин-реакционно-способного трис-(сукцинимидил-аминотриацетата (TSAT). В другом варианте осуществления данного тримерного конъюгата первый, второй и третий полипептиды XTEN являются идентичными и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей

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

$$(CL1)_x\text{-}(XTEN_1)\text{-}3xCL\text{-}(XTEN_2)\text{-}(CL2)_y$$
$$\qquad\qquad\qquad

полипептид XTEN и $XTEN_3$ – третий полипептид XTEN. В другом варианте осуществления тримерных конъюгатов данный конъюгат дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенного к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы и одноатомный остаток третьего нагрузочного вещества, присоединенного к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте осуществления тримерной конъюгационной композиции данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблице 11, 12, 18 и 21; второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN , выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества и третье нагрузочное вещество, присоединенное к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, выбранного из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого или второго нагрузочного вещества. В одном варианте реализации конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в Таблицах 17-19 и 21, а второе и третье нагрузочные вещества являются лекарственным веществом, которое может быть таким же или отличным и, при этом лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из лекарственных веществ, отраженных в Таблицах 11, 18 и 21. В одном варианте осуществления конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество, в котором первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, а второе и третье нагрузочное вещество является лекарственным веществом, нацеленным компонентом выбирается из группы, состоящей из LHRH, фолата и лекарственного вещества, выбранных из группы состоящей из: доксорубицина, паклитакселя, ауристатина, монометилауристатина E (MMAE), монометилауристатина F, майтанзина, доластатина,калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы,

экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В одном варианте осуществления конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, а второе и третье нагрузочное вещество является лекарственным веществом, нацеленным компонентом и компонентом лекарственного вещества, соответствующие какому-либо из конъюгатов 1-290, отраженных в Таблице 21. В другом варианте осуществления конъюгационная композиция тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество, в котором первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, а второе и третье нагрузочное вещество является лекарственным веществом, данный конъюгат несет полипептид XTEN, нацеленный компонент и компонент лекарственного вещества, соответствующие конъюгату 71 из Таблицы 21. В другом варианте конъюгационная композиции тримерного полипептида XTEN-нагрузочное вещество, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XIII:

$$P_1\text{-}(CL1)_x\text{-}(XTEN_1)\text{-}3xCL\text{-}(XTEN_2)\text{-}(CL2)_y\text{-}P_2$$
$$|$$
$$(XTEN_3)\text{-}(CL3)_z\text{-}P_3 \qquad \text{XIII}$$

где независимо в случае каждого появления: 3xCL – трехвалентный кросс-линкер, выбранный из группы трехвалентных кросс-линкеров, отраженных в Таблицах 13 и 14; P_1 является присоединенным к каждому кросс-линкеру первого полипептида XTEN и выбирается из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21; P2 – второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру второго полипептида XTEN и выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом это нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества и P_3 – третье нагрузочное вещество, присоединенное к каждому кросс-линкеру третьего полипептида XTEN и выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом это нагрузочное вещество такое же или отличается от первого или второго нагрузочного вещества; CL_1 – первый кросс-линкер; x – целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1; CL2 – второй кросс-линкер; y – целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1; z – целое число от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 to около 10, или от 1 до около 5, или равное 9, или равное 3, или равное 2, или равное 1 с ограничением $x + y + z \geq 3$; $XTEN_1$ – первый полипептид XTEN , обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%,

или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_2$ – второй полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3; и $XTEN_3$ – третий полипептид XTEN, обладающий по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или обладающий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3, при этом полипептиды $XTEN_1$, $XTEN_2$, и $XTEN_3$ являются одинаковыми или разными XTEN-последовательностями. В другом варианте осуществления данный конъюгат формулы XIII дополнительно включает первое нагрузочное вещество, в котором нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в Таблицах 17-19 и 21, а по меньшей мере любое другое из нагрузочных веществ являются лекарственным веществом, при этом лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из лекарственных веществ, отраженных в Таблицах 11, 19 и 21. В одном варианте вышеуказанной реализации данная нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из LHRH или фолата и лекарственного вещества, выбранных из: доксорубицина, паклитакселя, ауристатина, монометилауристатина E (MMAE), монометилауристатина F, майтанзина, доластатина,калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В другом варианте композиции тримерного XTEN-конъюгата, эта композиция обладает конфигурацией согласно формулы XIV:

$$(CL1)_x\text{-}(XTEN_1)\text{-}3x CL\text{-}(XTEN_2)\text{-}(CL2)_y$$
$$|$$
$$(XTEN_3) \qquad \text{XIV}$$

где независимо в случае каждого появления: 3xCL – трехвалентный кросс-линкер;CL1 – первый кросс-линкер, присоединенный к полипептиду $XTEN_1$; CL2 – второй кросс-линкер, присоединенный к полипептиду $XTEN_2$; x – целое число от 1 до около 10; y – целое число от 1 до около 10 с ограничением $x + y \geq 2$; $XTEN_1$ – первый полипептид XTEN; $XTEN_2$ – второй полипептид XTEN и $XTEN_3$ – третий полипептид XTEN, при этом XTEN выбирается из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в Таблицах 2. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции тримерных полипептидов XTEN формулы XVI данная композиция дополнительно включает одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, присоединенный к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы; и одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, присоединенный к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, в котором этот остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте осуществления конъюгационной композиции тримерных полипептидов XTEN формулы XVI данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN , выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21; и второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества. В другом варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в Таблицах 17-19 и 21, а второе нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбранным из группы, состоящей из лекарственных веществ, отображенных в Таблицах 6, 18 и 21. В другом варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, выбираемой из группы, состоящей из LHRH, фолата и второго нагрузочного вещества, которое является лекарственным веществом, выбранным из группы состоящей из: доксорубицина, паклитакселя, ауристатина, монометилауристатина E (MMAE), монометилауристатина F, майтанзина, доластатина,калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В одном варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбранным из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблицы 11 и белков из Таблицы 12, а второе нагрузочное вещество является

отличным от первого нагрузочного вещества и выбирается из группы нацеленных компонентов, отображенных в Таблице 11 и белков в Таблице 12, а второе нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбранным из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблицы 11 и белков из Таблицы 12. В другом варианте вышеуказанного осуществления первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество является идентичными и выбираются из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблицы 11 и белков из Таблицы 12. В другом варианте конъюгационная композиции тримерного XTEN-конъюгата, эта композиция обладает конфигурацией согласно формуле XV:

$$(CL1)_x\text{-}(XTEN_1)\text{-}3xCL\text{-}(XTEN_2)$$
$$|$$
$$(XTEN_3) \qquad \text{XV}$$

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

[0020] В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям первого, второго, третьего и четвертого полипептидов XTEN, конъюгационно связанных друг с другом с получением тетрамерных конъюгационных композиций. В некоторых вариантах осуществления конъюгационные композиции включают первый, второй, третий и четвертый полипептид XTEN, при этом полипептиды XTEN, выбираются из группы, состоящей из последовательностей, отраженных в Таблице 3, при этом полипептиды XTEN могут быть одинаковыми или могут быть разными и при этом первый, второй, третий и четвертый

полипептид XTEN присоединены друг к другу через N-концы с использованием четырехвалентного кросс-линкера, при этом четырехвалентный кросс-линкер является четырехвалентным малеинимидным кластером. В одном варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN являются идентичными или разными и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 2 или 3. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN являются идентичными или разными и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул каждого первого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул каждого второго полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул каждого третьего полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей и по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% отдельных молекул каждого четвертого полипептида XTEN имеют идентичную длину последовательностей. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгатапервый, второй, третий и четвертый полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый из них обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в Таблице 3. В другом варианте осуществления данного тетрамерного конъюгата первый и второй полипептиды XTEN являются одинаковыми и каждый обладает по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества, состоящего из Seg 174, Seg 175, Seg 176, Seg 177, Seg 186, Seg 187, Seg 188, Seg 189, Seg 190, Seg 191, Seg 192, Seg 193, Seg 194, Seg 195, Seg 196, Seg 197, Seg 198 и Seg 199, отраженных в

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

$$\begin{array}{c} (CL1)_v\text{-}(XTEN_1)\text{-}4xCL\text{-}(XTEN_2)\text{-}(CL2)_x \\ \qquad\qquad\quad / \quad \backslash \\ (CL3)_y\text{-}(XTEN_3) \qquad (XTEN_4)\text{-}(CL4)_z \end{array} \qquad \text{XVI}$$

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

одноатомный остаток третьего нагрузочного вещества, присоединенного к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы и одноатомный остаток четвёртого нагрузочного вещества, присоединенного к каждому четвертому кросс-линкеру четвертого полипептида XTEN, при этом данный остаток выбирается из набора, состоящего из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции данная композиция дополнительно включает первое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому первому кросс-линкеру первого полипептида XTEN , выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21; второе нагрузочное вещество, присоединенное к каждому второму кросс-линкеру второго полипептида XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого нагрузочного вещества; третье нагрузочное вещество, присоединенное к каждому третьему кросс-линкеру третьего полипептида XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого или второго нагрузочного вещества и четвертое нагрузочное вещество, присоединенное к каждому четвертому кросс-линкеру четвертого полипептида XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, отраженных в Таблицах 11, 12, 18 и 21, при этом данное нагрузочное вещество такое же или отличается от первого, второго или третьего нагрузочного вещества. В другом варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции XTEN-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в Таблицах 17-19 и 21, и по меньшей мере одно из второго, третьего и четвертого нагрузочных веществ является лекарственным веществом, при этом это лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из веществ, отображенных в Таблицах 11, 18 и 21. В одном варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции XTEN-нагрузочное вещество первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из: LHRH, фолата и по меньшей мере одного из второго, третьего и четвертого нагрузочного вещества, которое является лекарственным веществом, выбранным из группы состоящей из: доксорубицина, паклитакселя, ауристатина,майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина С, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В другом варианте осуществления тетрамерной конъюгационной композиции XTEN-нагрузочное вещество первое

нагрузочное вещество является нацеленным компонентом со специфической связывающей аффинностью к мишени, при этом нацеленный компонент выбирается из группы, состоящей из нацеленных компонентов, отображенных в Таблицах 17-19 и 21, и по меньшей мере одно из второго, третьего и четвертого нагрузочных веществ является лекарственным веществом, при этом это лекарственное вещество выбирается из группы, состоящей из веществ, отображенных в Таблицах 11, 18 и 21 и при этом полипептид XTEN, нацеленный компонент и компонент лекарственного вещества соответствуют какому-либо из конъюгатов 1-290, отраженных в Таблице 21.

[0021] В другом аспекте данное изобретение относится частично к композициям, содержащим мультимерные XTEN-молекулы с разветвленным видом конфигурации, при этом растворимость такой композиции снижена. В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, включающая раствор, который содержит мультимерные XTEN-молекулы, несущие по меньшей мере три связанных вместе XTEN-фрагмента в разветвленном виде (например, в виде тримера), при этом вязкость этого раствора снижена до по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сП в растворе, содержащем ≧100, 130 или 150 мг/мл тримерного полипептида XTEN по сравнению с раствором, содержащим ≧100, 130 или 150 мг/мл соответствующего линейного полипептида XTEN равной молярной концентрации. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, включающая раствор, который содержит мультимерные XTEN-молекулы, несущие по меньшей мере четыре связанных вместе XTEN-фрагмента в разветвленном виде (например, в виде тетрамера), при этом композиция имеет вязкость меньше чем у раствора, содержащего соответствующий линейный полипептид XTEN, обладающий таким же количеством аминокислот и такой же молярной концентрацией, при этом вязкость этого раствора снижена до по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сП в растворе, содержащем ≧100, 130 или 150 мг/мл тримерного полипептида XTEN по сравнению с раствором, содержащим ≧100, 130 или 150 мг/мл соответствующего линейного полипептида XTEN равной молярной концентрации. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, включающая раствор, который содержит мультимерные XTEN-молекулы, несущие по меньшей мере пять связанных вместе XTEN-фрагментов в разветвленном виде (например, в виде пентамера), при этом композиция имеет вязкость меньше чем у раствора, содержащего соответствующий линейный полипептид XTEN, обладающий таким же количеством аминокислот и такой же молярной концентрацией, при этом вязкость этого раствора снижена до по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сП в растворе, содержащем ≧100, 130 или 150 мг/мл тримерного полипептида XTEN по сравнению с раствором, содержащим ≧100, 130 или 150 мг/мл соответствующего линейного полипептида XTEN равной молярной концентрации. В вышеуказанных осуществлениях этого параграфа

отдельная XTEN-молекула мультимерных конфигураций выбирается из множества, состоящего из последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3.

[0022] В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются композиции полипептида, обладающего по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 52.

[0023] В другом варианте реализации данного изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат какого-либо из осуществлений конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, описанного в данном тексте, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления вышеуказанная фармацевтическая композиция применяется для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в Таблице 16. В другом варианте осуществления вышеуказанная фармацевтическая композиция применяется для использования в фармацевтическом режиме лечения пациента, упомянутый режим включает назначение этой фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления вышеуказанный фармацевтический режим дополнительно содержит этап определения количества фармацевтической композиции, необходимого для достижения благоприятного эффекта у пациента в болезненном состоянии, выбранном из болезненных группы состояний, отраженных в Таблице 16. В другом варианте осуществления вышеуказанный фармацевтический режим, используемый для лечения пациента, включает назначение пациенту фармацевтической композиции двух или более эффективных доз, при этом результаты такого назначения на по меньшей мере 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60% или 70% или 80% или 90% повышают улучшение по меньшей мере одного, двух или трех параметров, связанных с болезненным состоянием у не лечившегося пациента.

[0024] В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается конъюгат какого-либо из осуществлений конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, описанного в данном тексте для применения при получении лекарственного препарата для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в Таблице 16.

[0025] В некоторых реализациях в данном изобретении предлагаются способы выбора комбинации нагрузочных веществ, присоединенных к полипептиду XTEN как лечебные агенты, этот метод включает использование библиотеки полипептидов XTEN, содержащую множество последовательностей XTEN, в которой каждая из упомянутых XTEN-

последовательностей присоединена по меньшей мере к первому нагрузочному веществу и по меньшей мере ко второму нагрузочному веществу, которое отличается от первого нагрузочного вещества; из упомянутой библиотеки выбирается XTEN-последовательность как лечебный агент, если он вызывает улучшение параметров in vitro или in vivo, по сравнению с такими комбинациями: (1) последовательность XTEN присоединена только к первому нагрузочному веществу; и (2) последовательность XTEN присоединена только ко второму нагрузочному веществу. В другом варианте осуществления данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество являются терапевтически эффективными для облегчения общего заболевания (например, заболевания, против которого нацелены оба первое и второе нагрузочные вещества). В одном варианте осуществления данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество являются терапевтически эффективными для лечения разных симптомов общего заболевания. В одном варианте осуществления данного способа общее заболевание выбирается из таких: рак, противораковая поддерживающая терапия, кардиоваскулярное заболевания, заболевание центральной нервной системы, эндокринное заболевание, желудочно-кишечное заболевание, заболевание мочеполовой системы, заболевание системы крови, ВИЧ-инфекция, гормональное заболевание, воспаление, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, заболевание обмена веществ, заболевание костно-мышечной системы, нефрологические расстройства, офтальмологические заболевания, боли и респираторные заболевания. В одном варианте реализации данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество проявляют свой терапевтический эффект через обычный биологический механизм. В одном варианте данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество является разными лекарственными веществами и выбираются из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблиц 11, 18 и 21. В одном варианте данного способа первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество является разными биологически активными белками и выбираются из группы, состоящей из белков из Таблиц 12, 18 и 21.В одном варианте данного способа первое нагрузочное вещество является лекарственным веществом, выбираемом из группы, состоящей из лекарственных веществ, отображенных в Таблицах 11, 18 и 21, а второе нагрузочное вещество является биологически активным белком, выбранным из группы, состоящей из белков, отображенных в Таблицах 12, 18 и 21.

[0026] В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается изолированный полипептид, содержащий расширенный рекомбинантный полипептид, который присоединен к маркеру аффинной очистки через сайт протеолитического расщепления, имеющий последовательность, выбранную из SASRSA или SASXSA, где X является R или K.

[0027] В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается изолированный полипептид, содержащий полипептид, включающий XTEN, который присоединен своим N-концом к первому маркеру аффинной очистки через сайт протеолитического расщепления, имеющий последовательность выбранную из SASRSA или SASXSA, где X является R или K, а C-концом присоединен ко второму маркеру аффинной очистки через сайт протеолитического расщепления, имеющий последовательность выбранную из SASRSA или SASXSA, где X является R или K.

[0028] В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения болезненного состояния пациента с помощью конъюгационной композиции XTEN-нагрузочное вещество. В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается способ лечения болезненного состояния субъекта, включающий назначение эффективного количества данного конъюгата какого-либо из осуществлений XTEN-нагрузочного вещества, описанных в данном тексте, нуждающемуся в нем пациенту. В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается способ лечения болезненного состояния пациента, включающий назначение эффективного количества данного конъюгата из набора конъюгатов, отраженных в Таблице 21 нуждающемуся в нем пациенту. В вышеуказанных осуществлениях данного параграфа болезненное состояние, которое требует лечения, включает помимо прочих, болезненные состояния, отраженные в Таблице 13. В другом варианте реализации в данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат какого-либо из осуществлений конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, описанных в данном тексте, и фармацевтически приемлемый носитель для применения в режиме лечения, данный режим включает назначение двух и более последовательных доз этой фармацевтической композиции.

[0029] В одном варианте осуществления в данном изобретении предлагается использовать конъюгат какого-либо из осуществлений полипептида XTEN-нагрузочное вещество, описанных в данном тексте, для применения при получении лекарственного препарата для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в Таблице 16. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается фармацевтическая композиция для лечения болезненного состояния, выбранного из группы болезненных состояний, отраженных в Таблице 16, которая включает эффективное количество конъюгата какого-либо из осуществлений полипептида XTEN-нагрузочное вещество, описанных в данном тексте.

[0030] В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагается композиция, обладающая структурой, отображенной на ФИГ. 117.

[0031] Специально предусмотрено, что осуществления конъюгатов могут выражать одну или большее количество любых комбинаций свойств, раскрытых в данном тексте. Кроме того,

какая-либо из композиций XTEN, раскрытых в данном тексте, могут быть использованы в любом из способов, раскрытых в данном изобретении.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0032] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были бы указаны конкретно и отдельно для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ.

[0033] Характерные черты и преимущества изобретения могут быть дополнительно разъяснены ссылкой на последующее подробное описание и сопровождающие графические материалы, которые отражают иллюстративные осуществления изобретения.

[0034] ФИГ. 1 показывает схему XTEN-молекулы, подходящей для конъюгации с нагрузочными веществами. ФИГ. 1A показывает немодифицированную XTEN-молекулу. ФИГ. 1B показывает цистеин-сконструированную XTEN-молекулу с внутренним цистеином и боковой тиоловой цепью; ниже – XTEN-молекулу с реакционно-способной N-концевой аминогруппой; ниже – XTEN-молекула с N-концевым цистеином с тиоловой реакционно-способной группой. ФИГ. 1C показывает цистеин-сконструированную XTEN-молекулу с многочисленными внутренними остатками цистеина. ФИГ. 1D показывает две вариации цистеин-сконструированных XTEN-молекул с внутренним цистеином и боковой тиоловой цепью; и реакционно-способной N-концевой аминогруппой; внизу показано цистеин- и лизин-сконструированные XTEN-молекулы с внутренними остатками цистеина и лизина.

[0035] ФИГ. 2 показывает реакцию конъюгации с использованием NHS-эфиров и их водорастворимых аналогов сульфо-NHS-эфиров), реагирующих с первичной аминогруппой с получением стабильного амидного продукта XTEN-нагрузочное вещество.

[0036] ФИГ. 3 показывает реакцию конъюгации с использованием тиоловых групп и N-малеинимида. Малеинимидная группа специфически реагирует с сульфгидрильными группами при pH реакционной смеси между pH 6,5 и 7,5, с образованием стабильной тиоэфирной связи, которая не вращается.

[0037] ФИГ. 4 показывает реакцию конъюгации с использованием галогенацетилов. Чаще всего используются галогенацетильные реагенты, содержащие йодацетильную группу, которая реагирует с сульфгидрильными группами при физиологическом значении pH. Реакция йодацетильной группы с сульфгидрильной проходит путем нуклеофильного замещения йода с образованием стабильной тиоэфирной связи в молекуле XTEN-нагрузочное вещество.

[0038] ФИГ. 5 показывает реакцию конъюгации с использованием пиридилдисульфидных соединений. Пиридилдисульфидные соединения реагируют с сульфгидрильными группами в широком диапазоне pH (оптимальное pH составляет 4-5) с образованием дисульфидных связей, соединяющих XTEN с нагрузочными веществами.

[0039] ФИГ. 6 показывает реакцию конъюгации с использованием кросс-линкеров нулевой длины, в которой кросс-линкеры используются для непосредственного конъюгирования с карбоксильными функциональными группами одной молекулы (такой как нагрузочное вещество) с первичным амином другой молекулы (такой как XTEN).

[0040] ФИГ. 7 показывает различные типы конъюгирования XTEN-предшественников, которые являются мультифункциональными (или многовалентными) веществами, включая дендримеры. Примеры, не ограничивающие варианты применения трифункциональных линкеров, представляют "Y-форму" сульфгидрильного реакционно-способного TMEA (трис-(2-малеинимидоэтил)амина) и амин-реакционно-способного TSAT (трис-(сукцинимидиламинотриацетата). Для мультиваленого образования может быть разработана любая комбинация рекционно-способных функциональных групп с использованием поддерживающего полимера, линейного (с образованием конфигурации "гребенка") или разветвленного (с образованием конфигурации "дендримера").

[0041] ФИГ. 8 показывает реакцию конъюгации с использованием 1,3-диполярного циклоприсоединения алкинов с азидами Хьюсгена с образованием 1,4-дизамещенных-1,2,3-триазолов, как показано на фиг.

[0042] ФИГ. 9 показывает реакцию конъюгации с использованием клик-химии на основе тиоеновых соединений, которая может проходить с помощью свободно-радикальной реакции, названной тиоленовой реакцией или анионной реакцией, названной присоединением тиолов по Михаэлю.

[0043] ФИГ. 10 показывает реакцию конъюгации с использованием методов клик-химии на основе реакций между гидразидами и альдегидами, которые приводят к проиллюстрированному образованию гидразоновой связи в молекуле XTEN-нагрузочное вещество.

[0044] ФИГ. 11 показывает реакцию между а С-концевым ацилазидом и первичной аминогруппой, приводящей к образованию амидной связи.

[0045] ФИГ. 12 показывает реакцию конъюгации с использованием нативного химического лигирования (NCL), вовлекающего С-концевой тиоэфир как электрофильное соединение и N-концевой цистеин как нуклеофильное соединение. Результатом этой реакции является образование нативной амидной связи в сайте лигирования композиции XTEN-нагрузочное вещество.

[0046] ФИГ. 13 показывает реакцию конъюгации с использованием метода лигирования экспрессированного белка (EPL). Метод EPL базируется на сплайсинге белков – процессе, в котором белок претерпевает внутримолекулярную перегруппировку, приводящую к выбрасыванию внутренней последовательности (интеина) и соединению латеральных последовательностей (экстеинов). В этом методе белок слияния претерпевает N-S-сдвиг, при котором боковая цепь первого цистеинового остатка части интерина белка-предшественника нуклеофильно атакует пептидную связь остатка, находящего рядом в восходящем направлении цепи (такую как, например, концевой остаток полипептида XTEN) с образованием промежуточного линейного тиоэфира с последующей перегруппировкой с образованием амидной связи между XTEN-кросс-линкером и нагрузочным веществом.

[0047] ФИГ. 14 показывает реакцию конъюгации с использованием бесследового лигирования Штаудингеру, подобное нативному химическому лигированию (NCL), приводящую к образованию в сайте лигирования нативной амидной связи.

[0048] ФИГ. 15 показывает реакцию конъюгации с использованием ферментного лигирования. Трансглютаминаза являются ферментами, которая катализирует образование изопептидной связи между γ-карбоксамидной группой глютамина нагрузочного пептида или белка и ε-аминогруппы лизина в лизин-содержащей молекуле XTEN (или N-концевой аминогруппы), при этом образуются внутри- и межмолекулярные перекрестные связи между молекулой XTEN и нагрузочным веществом.

[0049] ФИГ. 16 показывает образованные ферментами композиции XTEN-нагрузочное вещество с использованием транспептидазный фермент сортазу A из Staphylococcus aureus для катализирования реакции расщепления последовательности распознавания коротких 5-аминокислот LPXTG между остатками треонина и глицина Белка1, который впоследствии переносит ацильный фрагмент на нуклеофильное соединение N-концевой олигоглицин Белка1. Путем функционализации Белка2 включением олигоглицина проводится ферментативная конъюгация двух белков сайт-специфическим связыванием, которое приводит к получению желаемой композиции XTEN-нагрузочное вещество.

[0050] ФИГ. 17 показывает различные сегменты предшественников XTEN-кросс-линкеров, которые используются как реактанты для связывания с нагрузочными веществами или другими реагирующими с XTEN веществами. ФИГ. 17A предназначена для демонстрации того, что группа 1B представляет собой оставшуюся реакционно-способную группу предшественников, расположенных справа. ФИГ. 17B показывает подобные реакционно-способные предшественники с множественными (слева) или единственной (справа) молекулами нагрузочного вещества A, конъюгированно связанными с полипептидом XTEN.

[0051] ФИГ. 18 показывает примерные перестанавливаемые сегменты предшественников XTEN-кросс-линкеров с двумя реакционно-способными группами в кросс-линкерных молекулах или реакционно-способными группами внедренных аминокислот, которые используются как реактанты для связывания с нагрузочными веществами или другими реагирующими с XTEN веществами. Обозначения 1B и 2B представляют реакционно-способные группы, которые будут в других фигурах вступать в реакции с реакционно-способными с такими же номерами: 1 с 1 и 2 с 2, и т.д.

[0052] ФИГ. 19 предназначена для демонстрации примеров разных реактантов и перечня конфигураций, показанных в графических материалах. ФИГ. 19A показывает разные формы предшественников реакционно-способных XTEN-сегментов, каждый с другой реакционно-способной группы на N-конце. ФИГ. 19B показывает разные кросс-линкеры с 2, 3 или 4 реакционно-способными группами. В первом случае двухвалентный кросс-линкер является гетерофункциональным линкером, который реагирует с двумя разными типами реакционно-способных групп, представленных под номерами “2” и “1”. В случае трехвалентых и четырехвалентных кросс-линкеров, каждый реагирует только с одним типом реакционно-способной группы, представленной под номером “1”. ФИГ. 19C иллюстрирует перечень продуктов реакции двух предшественников XTEN-сегментов. В верхней версии 1A прореагировал с 1B для образования димерной молекулы XTEN, связанной по N-концам, с остатком кросс-линкера, указанного как 1AR-1BR, в то время как нижняя версия также является димерной молекулой XTEN, связанной по N-концам, с остатком кросс-линкера, указанного как $2A_R$-$2B_R$.

[0053] ФИГ. 20 иллюстрирует получение разных сегментов XTEN-предшественников. ФИГ. 20A показывает этапы создания XTEN-полипептида с последующей реакцией его N-конца с кросс-линкером с 2B-1A реакционно-способными группами 1A реагирует с N-концом 1B (например, альфа-аминокислотой) для получения XTEN-предшественника 2 с реакционно-способной группой 2B. ФИГ. 20B показывает последовательное добавление двух кросс-линкеров с реакционно-способными группами 2A к реакционно-способным группам 2B полипептидов XTEN, приводящее к получению XTEN-предшественника 4, который затем реагирует с кросс-линкером на N-конце между реакционно-способной группой 1B и группой 1A кросс-линкера, приводящее к получению XTEN-предшественника 5 с реакционно-способными группами 4B и 3B. В таком случае XTEN-предшественники 5 служат потом в качестве реактантов с двумя различными нагрузочными веществами или полипептидом XTEN.

[0054] ФИГ. 21 иллюстрирует примеры многомерных конъюгатов. ФИГ. 21A иллюстрирует каким образом три XTEN-молекулы с конъюгированным нагрузочным веществом A могут быть присоединены к трехмерному кросс-линкеру, что в результате приводит к образованию

трехмерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество с тремя нагрузочными веществами A. ФИГ. 21B иллюстрирует каким образом три молекулы полипептида с нагрузочным веществом A могут быть присоединены к трехмерному кросс-линкеру, что в результате приводит к образованию трехмерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество с тремя полипептидами с нагрузочными веществами A.

[0055] ФИГ. 22 иллюстрирует примеры многовалентных XTEN-конъюгатов, которые происходят из XTEN-предшественников с одним цистеином. Аминогруппа XTEN-предшественника действует как реакционно-способная группа 2B, а тиоловая группа – как реакционно-способная группа 1B. XTEN-предшественник с помощью кросс-линкера, который может реагировать с группой 1B, может участвовать в прекрестном связывании. Валентность кросс-линкера ограничивает валентность получаемого промежуточного соединения. Это промежуточное соединение с кросс-линкером может реагировать с нагрузочным веществом, несущим реакционно-способную группу 2A, которая может реагировать с аминогруппой с образованием конъгационной связи 2A-BR. ФИГ. 22A представляет XTEN-предшественник с одной тиоловой группой. ФИГ. 22B представляет двухвалентный конъюгат. ФИГ. 22C представляет трехвалентный конъюгат. ФИГ. 22D представляет тетрамерный конъюгат.

[0056] ФИГ. 23 иллюстрирует примеры многовалентных XTEN-конъюгатов, которые происходят из XTEN-предшественников с одним цистеином. Аминогруппа XTEN-предшественника действует как реакционно-способная группа 1B, а тиоловая группа – как реакционно-способная группа 2B. XTEN-предшественник с помощью кросс-линкера, который может реагировать с группой 1B может участвовать в прекрестном связывании. Валентность кросс-линкера ограничивает валентность получаемого промежуточного соединения. Это промежуточное соединение с кросс-линкером может реагировать с нагрузочным веществом, несущим реакционно-способную группу 2A, которая может реагировать с тиоловой группой с образованием конъгационной связи 2A-BR. ФИГ. 23A иллюстрирует тиоловою группу, расположенную возле C-конца полипептида XTEN. В результате нагрузочное вещество располагается в конечном тримерном конъюгате дистально. ФИГ. 23B иллюстрирует тиоловою группу, расположенную возле N-конца полипептида XTEN. В результате нагрузочное вещество располагается в конечном тримерном конъюгате проксимально, приводя к увеличению нагрузочного вещества, закрываемого XTEN-полипептидом.

[0057] ФИГ. 24 иллюстрирует пример получения конфигурации “гребенка”. ФИГ. 24A представляет предшественник молекулы XTEN-нагрузочное вещество, включающую линкерную реакционно-способную группу 1A. Нагрузочное вещество может быть рекомбинантно соединено с полипептидом XTEN или соединено при конъюгировании. ФИГ. 24B иллюстрирует XTEN-предшественник с гребенко-подобными кросс-линкерами. Это может

быть молекула XTEN, которая несет множественные реакционно-способные группы B. ФИГ. 24C показывает конечный продукт конфигурации “гребенка”, с пятью нагрузочными веществами A. Валентность ограничивается количеством реакционно-способных групп гребенко-подобного предшественника.

[0058] ФИГ. 25 иллюстрирует разные конфигурации биспецифических конъюгатов с двумя нагрузочными веществами. ФИГ. 25A иллюстрирует конфигурации с одной молекулой, каждого из двух нагрузочных веществ, тогда как ФИГ. 25B иллюстрирует разные конфигурации с множественными копиями одного или обоих нагрузочных веществ.

[0059] ФИГ. 26 иллюстрирует разные примеры конъюгатов с высокой валентностью. Сайты конъюгации нагрузочных веществ могут быть сгруппированы (ФИГ. 26A) или распределены (ФИГ. 26B).

[0060] ФИГ. 27 иллюстрирует получение биспецифических конъюгатов из XTEN-предшественников, несущих обе амино- и тиоловые группы, в которых могут использоваться много химических веществ, для того, чтобы можно было варьировать присоединение нагрузочных веществ. Каждый может создавать линкер-конъюгат как предшественник. ФИГ. 27A показывает создание одного XTEN-предшественника, к которому присоединены два разных нагрузочных вещества. ФИГ. 27B показывает сегментарный подход, начинающийся из двух молекул XTEN-предшественников. Этот подход позволяет за один подход присоединить оба нагрузочных вещества к полипептиду XTEN с использованием одного типа линкерной химической реакции. В этом случае на фигуре показано тиол, как группу, к которой присоединяются нагрузочные вещества, после чего N-конец каждого сегмента модифицируется кросс-линкером, для обеспечения возможности конъюгации сегментов голова-к-голове, которая приводит к получению димерного биспецифического конъюгированного конечного продукта.

[0061] ФИГ. 28 показывает примеры многовалентных конъюгатов, объединяющих антитело, полипептид XTEN и нагрузочное вещество. Такие конструкции могут обладать разными валентностями и представлять много преимуществ, в которых полипептид XTEN может нести расщепляемый линкер. Полипептид XTEN может обеспечивать растворимость такой композиции и он может позволить регулировать ввод лекарственных веществ посредством IgG и, для упрощения производства, XTEN может быть предварительно связан с лекарственным веществом. ФИГ. 28A иллюстрирует две молекулы XTEN, присоединенные к IgG по Cys-остаткам в шарнирной области. ФИГ. 28B иллюстрирует четыре молекулы XTEN, присоединенные к IgG с использованием цистеина в шарнирной области. ФИГ. 28C иллюстрирует полипептид XTEN присоединенный за пределами шарнирной области. Что

может быть получено вставкой Cys для контроля сайта конъюгации или случайной конъюгацией с боковыми цепями лизина.

[0062] ФИГ. 29 показывает примеры конструкций конъюгатов, объединяющих антитело, полипептид XTEN и нагрузочное вещество. Такое антитело может обладать одной или многими реакционно-способными группами 1B. Молекула XTEN может быть конъюгирована с одним или многими нагрузочными веществами A. Кроме того молекула XTEN может нести реакционно-способную группу 1A, которая преимущественно реагирует с реакционно-способной группой 1B антитела. Расположение реакционно-способных групп 1B в антителе контролируется количеством и расположением молекул XTEN, которые присоединяются к этому антителу, что приводит к образованию конечного продукта.

[0063] ФИГ. 30 показывает примеры конъюгатов, объединяющих компонент мишени, полипептид XTEN и нагрузочное вещество. Компоненты мишени могут быть пептидами, пептоидами или лигандами рецепторов. ФИГ. 30A показывает конъюгат 1x(1x3). ФИГ. 30B показывает конъюгат 1x2(1x3). ФИГ. 30C показывает конъюгат 3x1(1x3).

[0064] ФИГ. 31 показывает примеры конъюгатов, объединяющих множественные разные компоненты мишени, полипептид XTEN и нагрузочное вещество. Компоненты мишени могут быть пептидами, пептоидами, лигандами рецепторов.

[0065] ФИГ. 32 показывает примеры конъюгатов, объединяющих компонент мишени, полипептид XTEN и множественные нагрузочные вещества.

[0066] ФИГ. 33 показывает примеры комбинированных XTEN-конъюгатов. Нагрузочные вещества A, B, C и D могут нести реакционно-способную группу 2A, которая реагирует с реакционно-способной группой 2B XTEN-предшественника. На следующем этапе нагрузочные вещества E и F несут реакционно-способную группу 1A, которая реагирует с реакционно-способной группой 1B молекулы XTEN, что приводит к получению библиотеки разных комбинаций биспецифических конъюгатов. В этом случае реакционно-способные группы 1B и 2B являются соответственно тиоловымим и аминогруппами.

[0067] ФИГ. 34 иллюстрирует пример создания комбинационной библиотеки XTEN-конъюгатов. Нагрузочные вещества A, B, C соединяются с молекулой XTEN, несущей реакционно-способную группу 1A, что приводит к получению одного набора сегментов XTEN-предшественников. Нагрузочные вещества E, F и G соединяются с молекулой XTEN, несущей реакционно-способную группу 1B, что приводит к получению второго набора сегментов XTEN-предшественников. Эти сегменты подвергают комбинационной конъюгации и после нее очищаются от реактантов. Это дает возможность получать комбинационные продукты, на которые могут непосредственно проводиться *in vitro* и *in vivo* испытания. В этом случае реакционно-способные группы 1A и 1B являются альфа-аминогруппами молекулы XTEN с или

без биспецифического кросс-линкера. В одном примере группа 1A является азидом, а группа 1B – алкином, или наоборот, в то время как нагрузочные вещества присоединяются к молекуле XTEN через тиоловые группы полипептида XTEN.

[0068] ФИГ. 35 иллюстрирует пример создания комбинационной библиотеки XTEN-конъюгатов, в которой оптимизированно соотношение между двумя нагрузочными веществами. Каждый член библиотеки несет разное соотношение между нагрузочным веществом A и нагрузочным веществом E.

[0069] ФИГ. 36 иллюстрирует пример создания комбинационной библиотеки XTEN-конъюгатов, в которой создаются комбинации компонентов мишеней и нагрузочных веществ. Компоненты мишеней 1,2 и 3 соединяются с молекулой XTEN, несущей реакционно-способную группу 1A. Нагрузочные вещества E, F и G соединяются с молекулой XTEN, несущей реакционно-способную группу 1B. Эти сегменты подвергаются комбинационной конъюгации, обеспечивая возможность образования комбинационных продуктов, при чем каждый элемент библиотеки включает компоненты мишеней и нагрузочные вещества. Все XTEN-сегменты, несущие нагрузочные вещества и конъюгационые группы могут быть очищены как комбинационные продукты, на которые могут непосредственно проводиться *in vitro* и *in vivo* испытания.

[0070] ФИГ. 37 показывает пример XTEN-конъюгата, включающего нацеленные компоненты и нагрузочные вещества, которые оказывают избирательное действие на поверхность клетки-мишени, такой как раковая клетка. Специальная конструкция димерного XTEN-конъюгата содержит молекулы LHRH (рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона) и доксорубицина. Этот конъюгат связывается с LHRH-рецептором, который сверхэкспрессируется во многих раковых клетках. Связывание рецептора приводит к интернализации комплекса с последующим протеолитическим расщеплением и внутриклеточным высвобождением доксорубицина, который является токсичным для клетки.

[0071] ФИГ. 38 представляет схематическую блок-схему характерных этапов сборки, синтеза и оценивания молекулы XTEN.

[0072] ФИГ. 39 представляет схематическую блок-схему характерных этапов сборки конструкции полинуклеотида XTEN, кодирующего белок слияния. Отдельные олигонуклеотиды **501** ренатурируют в мотивы последовательностей **502**, такие как мотив из 12 аминокислот (“12-мер”), которые лигируется с дополнительными мотивами последовательностей из библиотеки для получения пула, который охватывает требуемую длину XTEN **504**, а также соединяется с меньшей концентрацией олигонуклеотидов, содержащих сайты рестрикции BbsI и KpnI **503**. Результирующий пул продуктов лигирования прогодит очитску гель-фильрацией, при которой вырезается полоса с требуемой длиной XTEN, что

приводит к изолированию XTEN-гена с стоп-последовательностью **505**. XTEN-ген клонируют в спейсерном (лямбда) векторе. В этом случае вектор кодирует добавочную CBD-последовательность **506** и GFP-ген **508**. Потом с помощью фермента BbsI/HindIII проводят расщепление для удаления последовательностей **507** и **508** и вставки стоп-кодона. Затем полученный продукт клонируют в расщепленном ферментом BsaI/HindIII векторе, что приводит к получению гена **500** , кодирующего XTEN-последовательность.

[0073] ФИГ. 40 представляет схематическую блок-схему характерных этапов гена, кодирующего XTEN-последовательность, ее экспрессию, конъюгацию с нагрузочным веществом и выделение в виде полипептида XTEN-нагрузочное вещество и его оценку в качестве вероятного препарата.

[0074] ФИГ. 41 показывает обобщенные XTEN-полипептиды, в которых N- или C-концевые маркеры или N- и C-концевые последовательности оптимизированы для облегчения очистки с применением методов, показанных на ФИГ. 42.

[0075] ФИГ. 42 показывает обобщенную схему очистки молекул XTEN, в этом иллюстративном осуществлении, с двумя маркерами, для которых используется двухстадийная методика очистки для удаления первого маркера, потом второй маркер может быть использован для удаления укороченного XTEN-полипептида, полученного при ферментации, что в результате приводит к получению высокоочищенного целевого вещества XTEN.

[0076] ФИГ. 43 показывает анализ в геле ПААГ с ДСН конструкций XTEN_AE864 с сайтом CBD-TEV и XTEN_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV, экспрессированным в клетках E. coli BL21 DE3 rne-131 и E. coli BL21 DE3 в культурах на встряхиваемы колбах, как описано в Примере 10. Гелевые дорожки образцов с маркерами ММ и экспрессированными белками из конструкций такие: 1) маркер ММ; 2-5) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на E. coli BL21 DE3 экспрессировался гибридный белок XTEN_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV; 6-9) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на E. coli BL21 DE3 rne-131 экспрессировался гибридный белок XTEN_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV; 10-13) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на E. coli BL21 DE3 экспрессировался гибридный белок CXTEN_AE864 с сайтом CBD-TEV; 14-17) лизаты из 4 отдельных колб, в которых на *E. coli* BL21 DE3 rne-131 экспрессировался гибридный белок CXTEN_AE864 с сайтом CBD-TEV. Пятна с полноразмерными белками проявились в пределах очерченного прямоугольника. Полосы с меньшей молекулярной массой являются белками клетки-хозяина.

[0077] ФИГ. 44 показывает относительную флуоресценцию белка GFP конструкции XTEN_AE864-GFP с сайтом CBD-TEV, экспресиированной в клетках *E. coli* BL21 DE3 rne-131 и E. coli BL21 DE3 в культурах на встряхиваемы колбах, как описано в Примере 10.

[0078] ФИГ. 45 показывает анализ в геле ПААГ с ДСН конструкций CBD-R-C-XTEN_AE864-RH8 (EC682) и CBD-R-XTEN_AE864-RH8 (EC683), экспрессированным при ферментации *E. coli*, как описано в Примере 17. Гелевые дорожки образцов с маркерами ММ и экспрессированными белками из конструкций такие: 1) маркер ММ; осветленные растворимые лизаты ферментации №EC682 *E. coli* в разные временные интервалы после инокулирования – 2) 16 часов, 3) 24 часа, 4) 40 часов, 5) 45 часов; осветленные растворимые лизаты ферментации №EC683 E. coli в разные временные интервалы после инокулирования – 6) 16 часов, 7) 24 часа, 8) 40 часов, 9) 45 часов; очищенный CBD-R-XTEN_AE864-RH8 референсный стандарт – 10) 1 микрограмм, 11) 2 микрограмма и 12) 4 микрограмма. В отношении осветленных растворимых лизатов ферментации *E. coli*, на каждую дорожку помещали 3 микролитра ферментированной культуры. Пятна с полноразмерными белками проявились в пределах очерченного прямоугольника. Полосы с меньшей молекулярной массой являются белками клетки-хозяина.

[0079] ФИГ. 46 показывает данные хроматографии с гидрофобным взаимодействием на носителе Toyopearl Phenyl 650 M, как описано в Примере 18.

[0080] ФИГ. 47 показывает данные анализа в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций, полученных в ходе хроматографии с гидрофобным взаимодействием на носителе Toyopearl Phenyl 650 M, как показано на этой фигуре и описано в Примере 18. Вещества, расположенные на дорожках, такие: Дорожка 1: Маркер; Дорожка 2: Загрузка 7,5 мкл; Дорожка 3: Элюат 1; Дорожка 4: Элюат 2; Дорожка 5: Фракция элюирования E1; Дорожка 6: Фракция элюирования E2; Дорожка 7: Фракция элюирования E3; Дорожка 8: Фракция элюирования E4; Дорожка 9: Фракция элюирования E5; Дорожка 10: Фракция элюирования E6; Дорожка 11: Фракция элюирования E7; Дорожка 12: Фракция элюирования E8.

[0081] ФИГ. 48 показывает данные анализа 4 – 12% в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях в растворе Бис-Трис элюатов, промывок (ФИГ. 48A) и фракций элюирования (ФИГ. 48B) (невосстанавливающие условия) хроматографии IMAC на носителе Toyopearl , как описано в Примере 18.

[0082] ФИГ. 49 показывает данные анализа в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях расщепленного трипсином пула элюирования хроматографии IMAC, описанной в Примере 18.

[0083] ФИГ. 50 показывает профиль элюирования хроматографии MacroCap Q, описанной в Примере 18.

[0084] ФИГ. 51 показывает данные анализа в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в Примере 18. ФИГ. 51A, элюат, окрашивание Кумасси. ФИГ. 51B, фракции элюирования, окрашивание Кумасси. ФИГ. 51C, фракции элюирования, окрашивание серебром.

[0085] ФИГ. 52 показывает данные ОФ ВЭЖХ на носителе C18 фракций элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в Примере 18.

[0086] ФИГ. 53 показывает данные ОФ ВЭЖХ на носителе C18 пула элюирования хроматографиина носителе MacroCap Q, описанной в Примере 18.

[0087] ФИГ. 54 показывает данные анализа в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций, полученных в ходе хроматографии с гидрофобным взаимодействием на носителе Toyopearl Phenyl 650 M, как описано в Примере 19.

[0088] ФИГ. 55 показывает данные анализа в ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях фракций, полученных в ходе хроматографии IMAC на носителе Toyopearl, как описано в Примере 19.

[0089] ФИГ. 56 показывает данные анализа в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН в невосстанавливающих условиях/окрашивание серебром фракций элюирования хроматографии MacroCap Q, описанной в Примере 19.

[0090] ФИГ. 57 показывает данные анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 фракций элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в Примере 19.

[0091] ФИГ. 58 показывает данные анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 пула элюирования хроматографии на носителе MacroCap Q, описанной в Примере 19.

[0092] FIG. 59 shows an SDS-PAGE analysis of XTEN constructs with experimental tags after expression in *E.coli* as described in Example 20. Растворимые лизаты были внесены в 4-12% Бис-Трис полиакриламидном геле в количествах нанесения на одну дорожку эквивалентным 36 мкл суспензии клеточной культуры. Гель был окрашен красителем Кумасси синим, используя стандартные методики.

[0093] ФИГ. 60 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН RP11-XTEN-His8-конструкций, экспрессированных в клетках E.coli, как описано в Примере 20. Обработанные нагреванием растворимые лизаты были внесены в 4-12% Бис-Трис полиакриламидном геле в количествах эквивалентным 1 или 2 мкл суспензии клеточной культуры, соответственно. Гель был окрашен красителем Кумасси синим. Анализ геля продемонстрировал, что в основном весь экспрессированный белок RP11-XTEN-His8 находился в фракции клеток.

[0094] ФИГ. 61 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН очищенного с помощью хроматографии на носителе MacroCap SP полипептида RP11-XTEN-His8, описанного в Примере 21. Фракции были проанализированы в 4-12% ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием Кумасси.

[0095] ФИГ. 62 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН очищенного с помощью хроматографии IMAC полипептида RP11-XTEN-His8, описанного в Примере 21. Фракции были проанализированы в 4-12% ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием Кумасси.

[0096] ФИГ. 63 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН трипсинового расщепления белка RP11-XTEN-His8, очищенного двумя стадиями хроматографии (SP + IMAC), опсанные в Примере 21. Препараты были проанализированы в 4-12% ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием Кумасси (ФИГ. 63A) и серебром (ФИГ. 63B).

[0097] ФИГ. 64 показывает результаты анализа реакции конъюгации белка ДБЦО-Mal с полипептидом 3хТиол-XTEN, как описано в Примере 23. ФИГ. 64A показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 реакционной смеси. Образец с белками 20 мкг, был введен в колонку Phenomenex Jupiter C18 5мкм 300A 4,6 мм x 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой. ФИГ. 64B показывает очистку с помощью хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (HIC) продукта реакции ДБЦО-XTEN. ФИГ. 64C показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 очищенного с помощью HIC продукта реакции ДБЦО-XTEN.

[0098] ФИГ. 65 показывает результаты анализа расщепления трипсином дважды маркированного предшественника XTEN, как описано в Примере 24. ФИГ. 65A показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН при нагрузке 2 мкг на дорожку. Гель был окрашен красителем SimplyBlue SafeStain компании Invitrogen. ФИГ. 65B показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН при нагрузке 0,5 мкг на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain.

[0099] ФИГ. 66 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН очищенного с помощью хроматографии на носителе MacroCap Q расщепленного трипсином дважды маркированного предшественника, как описано в Примере 24. ФИГ. 66A показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН при нагрузке 3 мкг на дорожку. Гель был окрашен красителем SimplyBlue SafeStain компании Invitrogen. ФИГ. 66B показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН при нагрузке 0,5 мкг на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain. ФИГ. 66C показывает результаты анализа образцов белков в 4-12% Бис-Трис ПААГ с ДСН при нагрузке 0,5 мкг на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain.

[00100] ФИГ. 67 показывает результаты испытаний с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 для определения остаточной активности трипсина. ФИГ. 67A представляет данные анализа синтетического [G2]GLP2-пептида в интактной форме. ФИГ. 67B представляет данные анализа синтетического [G2]GLP2-пептида расщепленного бычьим трипсином. ФИГ. 67C представляет данные анализа белка XTEN_AE869_Am1,C2 с добавлением [G2]GLP2 и инкубированием в течение ночи при 37°C, как описано в Примере 24.

[00101] ФИГ. 68 показывает процесс приготовления конъюгата GLP2-XTEN из GLP2-Cys-пептида и 1хАмино-XTEN-полипептида, как описано в Примере 26. Образцы с белками по 20

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

[00102] ФИГ. 69 показывает процесс приготовления конъюгата GLP2-XTEN из GLP2-Mal-пептида и 1xТиол-XTEN-полипептида, как описано в Примере 27. Образцы с белками по 20 мкг были введены в колонку Phenomenex Jupiter C18 5мкм 300A 4,6 мм x 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой и детектировали по поглощению при 214 нм (изображения слева A, B). Образцы с белками по 100 мкг были обессолены с использованием устройств для центрифугирования NanoSep 3K Omega (Pall Corp.). Растворы белков в 50% ацетонитриле и 0,5% муравьиной кислоты были введены в масс-спектрометр высокого разрешения при скорости потока 10 мкл/мин. Были получены спектры масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) в диапазоне 800-1600 а.е.м. и трансформированы в спектры нулевого заряда с использованием Программы для байесовой реконструкции белков (изображения справа A, B). ФИГ. 69A: начальный белок 1xТиол-XTEN. ФИГ. 69B: продукт реакции между белком GLP2-Mal и 1xThiol-XTEN.

[00103] ФИГ. 70 показывает результаты анализа очистки белка GLP2-XTEN с использованием препаративной ОФ ВЭЖХ на носителе C4, как описано в Примере 27. ФИГ. 70A показывает хроматограмму препаративной ОФ ВЭЖХ. Фракция на 56-62 минутах собирали и выпаривали под вакуумом. ФИГ. 70B показывает анализ очищенного GLP2-XTEN с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18.

[00104] ФИГ. 71 показывает результаты конъюгации белка ДБЦО-Mal с полипептидом 1xТиол-XTEN, как описано в Примере 28. ФИГ. 71A показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 реакционной смеси. Образец с белками 20 мкг был введен в колонку Phenomenex Jupiter C18 5 мкм 300A 4,6 мм x 150 мм. Белки элюировали 5-50% градиентом ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой. ФИГ. 71B показывает очистку с помощью HIC белка ДБЦО-

XTEN. ФИГ. 71C показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 очищенного с помощью HIC белка ДБЦО-XTEN.

[00105] ФИГ. 72 показывает результаты аналитических исследований полипептида XTEN связанного через кросс-линкер с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), как описано в Примере 31. ФИГ. 72A показывает совместную миграцию белков в геле, выявленную с помощью УФ-света, которая демонстрирует большую кажущуюся ММ FITC-содержащих конъюгированных белков, также обнаруженных методом ЭХ при ОП214 (поглощение белков) и ОП495 (поглощение FITC) на колонке для ЭХ, что указывает на успешную маркировку XTEN с минимальной контаминацией свободным красителем. Расположение веществ по дорожкам (слева направо, после стандартов ММ такие: меченный белок FITC-CL-CBD-XTEN; меченный белок FITC-CL-XTEN; очищенный белок FITC-CL-XTEN; очищенный белок FITC-CL-XTEN и очищенный белок FITC-CL-XTEN. Гель проявили в УФ-свете для демонстрации кажущейся ММ FITC в FITC-содержащих белках. ФИГ. 72B показывает результаты анализа с помощью ЭХ полипептидов XTEN, конъюгированных с FITC, показывающих перекрывание получаемых веществ при ОП214 и ОП495 и также обладающих кажущимися большими молекулярными массами.

[00106] ФИГ. 73 показывает результаты анализа с помощью ЭХ пиков фракций элюирования конъюгатов белка GFP, связанных через кросс-линкер с полипептидом XTEN и свободным белком GFP, как описано в Примере 32. Кросс-линкерное связывание было подтверждено совместной миграцией белка с поглощением при ОП214 и GFP с поглощением при ОП395 в колонке ЭХ.

[00107] ФИГ. 74 показывает результаты фармакокинетического анализа белков GFP-X-XTEN и FITC-X-XTEN испытанных на яванских макаках, как описано в Примере 33.

[00108] ФИГ. 75 показывает фармакокинетический профиль (концентрации в плазме) у яванских макак после однократных доз разных композиций с зеленым флуоресцентным белком (GFP), присоединенных к неструктурированным полипептидам различной длины, назначенные подкожно или внутривенно, как описано в Примере 33. Этими композициями были GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-Y576 и XTEN_AD836-GFP. Были проанализированы образцы крови, отобранные в разное время после инъекции, и измерена концентрация белка GFP в плазме методом ИФА с использованием антител против GFP для улавливания и приготовления с помощью биотинилирования таких же поликлональных антител для выявления композиций. Результаты анализов представлены в виде зависимости концентрации в плазме от времени (ч) после дозирования, из которых видно, что особенно значительное увеличение периода полувыведения отмечено для белка XTEN_AD836-GFP – композиции с

наибольшей длиной последовательности XTEN. У конструкции с наименьшей длиной последовательности – GFP-L288 был наименьший период полувыведения.

[00109] ФИГ. 76 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН образцов испытания на стабильность гибридного белка XTEN_AE864, соединенного с N-концом белка GFP. Белок GFP-XTEN инкубировали в плазме яванских макак и лизате крыс длительностью до 7 суток при 37°C, как описано в примере 55. Кроме того, также оценивали белок GFP-XTEN при его введении яванским макакам. Образцы отбирали на 0, 1 и 7-е сутки и анализировали с помощью ПААГ с ДСН с последующим детектированием с использованием вестерн-анализа и с применением антител против белка GFP.

[00110] ФИГ. 77 показывает УФ-спектр кругового дихроизма белка Ex4-XTEN_AE864, проведенный как описано в Примере 56.

[00111] ФИГ. 78 показывает результаты анализа эксклюзионной хроматографии образцов конструкции глюкагон-XTEN, выполненные с применением белков-стандартов с известной молекулярной массой и графическим представлением результатов в виде зависимости поглощения от времени удерживания, как описано в Примере 58. Конструкции глюкагон-XTEN следующие: 1) глюкагон-Y288; 2) глюкагон-Y144; 3) глюкагон-Y72 и 4) глюкагон-Y36.

[00112] Результаты, приведенные на ФИГ. 79, являются схематическим изображением логической блок-схемы алгоритма SegScore (пример 59). На фигуре приведена следующая легенда: i, j - счетчики, использованные в контрольных циклах, которые проходят по всей подпоследовательности; HitCount – эта переменная является счетчиком, который подсчитывает сколько раз счетчики подпоследовательности учитывают количество идентичных подпоследовательностей в блоке; SubSeqX – эта переменная запоминает подпоследовательность, которая проверяется на избыточность; SubSeqY – эта переменная запоминает подпоследовательность, по сравнению с которой проверяется переменная SubSeqX; BlockLen – эта переменная запоминает определенную пользователем длину блока; SegLen – эта переменная запоминает длину сегмента. Программа жёстко настроена для получения количеств подпоследовательностей с длинами 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; Block – эта переменная запоминает строковое значение длины BlockLen. Строковое значение состоит из букв входной XTEN-последовательности и определяются положением i-счетчика; SubSeqList – это список, в котором запоминаются полученные количества подпоследовательностей.

[00113] ФИГ. 80 описывает применение алгоритма SegScore к гипотетической XTEN-последовательности из 11 аминокислот для определения повторяемости. XTEN-последовательность, состоящая из N-аминокислот, разделяется на N-S+1 подпоследовательностей длиной S (в данном случае S=3). Выполняется попарное сравнение

всех подпоследовательностей и в результате рассчитывается среднее количество идентичных подпоследовательностей, в данном случае, число подпоследовательностей составляет 1,89.

[00114] ФИГ. 81 представляет результаты количественного измерения флуоресцентного сигнала клонов RP11 от pSD0107 до pSD0118), как описано в Примере 12. Результаты включают один положительный контроль (pLCW970) и два отрицательных контроля (pBr322 и pLCW970+10 мМ раствор фосфата). Уровень экспрессии белка GFP измерялся с использованием образцов, полученных на 2-3 колбах встряхивания на одну конструкцию.

[00115] ФИГ. 82 показывает результаты скрининга библиотек LCW1157-1159. ФИГ. 82A-C представляет гистограммы флуоресценции образцов LCW1157-1159, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала, как описано в в Примере 12. Средние значения флуоресценции отмечены на фигурах для отрицательного контроля (черная стрелка) и для положительного pSD0116 (белая стрелка). ФИГ. 82D-F представляет корреляцию между значениями флуоресценции в исходного испытания и повторных испытаний выбранных клонов.

[00116] ФИГ. 83 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН 8 продуктов и контролей конструкций с наибольшей экспрессией в невосстанавливающих условиях, как описано в Примере 12. Желаемый конечный продукт полноразмерного белка RP11-XTEN-GFP показан стрелкой, и полоса с большей массой является димером этого белка. Дорожки: 1-8: 8 конструкций с наибольшей экспрессией (уровни экспрессии расположены от большей к меньшей, основанные на данных определения флуоресценции при повторных испытаниях), 1. LCW1159.004, 2. LCW1159.006, 3. LCW1158.004, 4. LCW1157.040, 5. LCW1158.003, 6. LCW1157.039, 7. LCW1157.025, 8. LCW1157.038; C1-C3: Контроли: C1. pSD0114, C2. pSD0116, C3. pCW1146 (Отрицательный контроль).

[00117] ФИГ. 84 показывает результаты анализа в ПААГ с ДСН эффективности связывания с носителем MacroCap SP 4 продуктов конструкций с наибольшей экспрессией в невосстанавливающих условиях, как описано в Примере 12. Дорожки 1-4: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1159.004, 2. Дорожки 5-8: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1159.006. Дорожки 9-12: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1158.004. Дорожки 13-16: загрузка, элюат, промывка и элюирование LCW1157.040. Дорожки 17-20 1-4: загрузка, элюат, промывка и элюирование отрицательного контроля. Неотмеченные дорожки принадлежат стандартам молекулярных масс.

[00118] ФИГ. 85 показывает обобщенные результаты скрининга библиотеки LCW1163 со сравнением флуоресцентного сигнала 4 продуктов и контролей с наибольшей экспрессией при повторных испытаниях, как описано в Примере 12. Каждый образец исследован в 4 повторностях, представленных на фигуре 4 отдельными точками.

[00119] ФИГ. 86 показывает обобщенные результаты скрининга библиотеки LCW1160, как описано в Примере 12. На фигурах показаны гистограммы флуоресценции образцов LCW1157-1159, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала; и отмечены средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка), pSD0116 (белая стрелка) и LCW1159.004 (кандидаты с высокой экспрессией скрининга LCW1157-1159, серая стрелка).

[00120] ФИГ. 87 показывает данные анализа в 4-12% ПААГ с ДСН с окрашиванием серебром фракций хроматографии на носителе MacroCap Q, как описано в Примере 14.. ФИГ. 87A: Серия 2, дорожка 1: стандарт молекулярной массы; дорожки 2-5: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-4, соответственно; дорожки 6-16: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-11, соответственно. ФИГ. 87B: Серия 1, дорожка 1: стандарт молекулярной массы; дорожки 2-6: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-5, соответственно; дорожки 7-16: фракции элюата из носителя MacroCap Q 1-10, соответственно.

[00121] ФИГ. 88 показывает результаты анализов промежуточных соединений и конечного продукта во время получения конструкции 1xДБЦО,3xLHRH-XTEN, как описано в Примере 34.

[00122] ФИГ. 89 показывает результаты анализов реакционных смесей при получении конъюгатов с конструкцией 11xАзид,3xMMAE-XTEN, проанализованных с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 и масс-спектроскопии, как описано в Примере 35. ФИГ. 89A представляет анализ исходного реактанта 1xАмино,3xТиол-XTEN. ФИГ. 89B представляет анализ модификации белка MMAE-малеинимидом, демонстрирующий увеличение массы, которое соответствует модификации трех цистеинов фрагментами MMAE-Mal. ФИГ. 89C показывает результаты анализа модификации белка эфиром Азид-ПЭГ4-NHS (N-гидроксилсукцимид) с увеличением массы, соответствующем добавлению одного компонента азид-ПЭГ4.

[00123] ФИГ. 90 показывает результаты анализов продуктов реакции конъюгатов 3xLHRH,3xMMAE-XTEN, как описано в Примере 36. ФИГ. 90A: Результат анализа в ПААГ с ДСН клик-конъюгата. На пластину 12% Бис-Трис NuPAGE минигеля (Life Technologies) было нанесено 0,5 мкг белков на дорожку. Гель был окрашен с помощью набора для окрашивания Pierce Silver Stain (Thermo Scientific, № 24612 по каталогу). Дорожка 1, 1xАзид,3xMMAE-XTEN; дорожка 2, 1xДБЦО,3xLHRH-XTEN; дорожка 3, продукты клик-реакции. Полоса продукта конъюгации указана стрелкой. ФИГ. 90B: Результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C4 реактантов и продуктов клик-конъюгации: (1) 1xДБЦО,3xLHRH-XTEN; (2) 1xАзид,3xMMAE-XTEN; (3) продукты клик-реакции.

[00124] ФИГ. 91 показывает блок-схему реакции во время получения конъюгатов 1xLHRH,3xMMAE-XTEN, как описано в Примере 37. ФИГ. 91A: начальная конструкция

1хАмино,3хТиол-XTEN; ФИГ. 91B: модификация белка 2,2'-дипиридил-дисульфидом; ФИГ. 91C: модификация белка ДБЦО-сульфо-NHS; ФИГ. 91D: снятие защиты цистеиновых остатков с помощью TCEP; ФИГ. 91E: модификация трех цистеиновых остатков с помощью MMAE-Mal; ФИГ. 91F: конъюгация LHRH-азида с N-концевым ДБЦО.

[00125] ФИГ. 92 показывает блок-схему реакции во время получения конъюгатов реактантов 1хMal,3хPTX-XTEN, как описано в Примере 41. ФИГ. 92A: начальная конструкция 1хАмино,3хТиол-XTEN; ФИГ. 92B: модификация белка с помощью PTX-Mal; ФИГ. 92C: модификация белка с помощью сульфо-СМЦК.

[00126] ФИГ. 93 показывает результаты анализов реакционных смесей при получении производных йодацетил-XTEN, как описано в Примере 42. ФИГ. 93A: Результаы анализа с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 реакции 1хАмино-XTEN перед и после инкубации с 10х избытком SIA. ФИГ. 93B: МС с ИЭР анализ конструкции 1хАмино-XTEN, модифицированной SIA. ФИГ. 93C: Образцы проанализированные с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18: Нижняя хроматограмма – HCKFWW-пептид. Средний график – IA-XTEN. Верхняя хроматограмма – реакция IA-XTEN с 5х избытком HCKFWW-пептида.

[00127] ФИГ. 94 показывает результаты скрининга библиотек образцов LCW1171, 1172, 1203и 1204, как описано в Примере 14. ФИГ. 94A-D: Гистограммы флуоресценции образцов LCW1171, 1172, 1203, 1204, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала. При скрининге образцов LCW1171-1172 на ФИГ. 94A и B были отмечены: средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка), pSD0116 (белая стрелка). При скрининге образцов LCW1203-1204 на ФИГ. 94C и D были отмечены: средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка), pSD0116 (белая стрелка) и контроль CBD (серая стрелка).

[00128] ФИГ. 95 показывает результаты скрининга библиотек образцов LCW1208-1210, как описано в Примере 12. ФИГ. На фигурах 95A-C показаны гистограммы флуоресценции образцов LCW1208-1210, отражающие количество колоний, идентифицированных для каждой области флуоресцентного сигнала; и отмечены средние значения флуоресценции отрицательного контроля (черная стрелка) и контроль CBD (серая стрелка).

[00129] ФИГ. 96 иллюстрирует получение XTEN-сегментов из предшественника, содержащего три повторяющиеся копии полипептида XTEN с идентичной длиной и последовательностью. На ФИГ. 96A XTEN-предшественник включает три идентичные копии XTEN, которые фланкированы на концах идентичными сайтами расщепления протеазами. На ФИГ. 96B XTEN-предшественник дополнительно включает N- и C-концевые маркеры для аффинной очистки для облегчения процесса очистки полноразмерных молекул предшественников. После очистки предшественник расщепляется протеазами, которые действуют на внедренные

расщепляемые последовательности для высвобождения из полипептида XTEN маркеров, которые при последующей очистке отделяются от отдельных молекул XTEN, что облегчает получение полипептидов XTEN с высоким выходом с отделением молекул с короткой и средней длинами от длинно-цепочечных молекул предшественников.

[00130] ФИГ. 97 иллюстрирует разные варианты осуществления тримерных разветвленных конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, в которых показано, что все конъюгаты могут быть получены из идентичных XTEN-молекул посредством конъюгации с их N-концевой аминогруппой и функциональной группой, такой как тиол цистеина, локализованный близко к С-концу. ФИГ. 97A и B иллюстрирует конъюгаты, несущие одну молекулу нагрузочного вещества, на ФИГ. 97A используется 4-концевой кросс-линкер со всеми концами которого связаны полипептиды XTEN с близким расположением нагрузочного вещества, что приводит к значительному экранированию взаимодействия нагрузочного вещества с другими молекулами. ФИГ. 97B иллюстрирует конфигурацию, в которой нагрузочное вещество конъюгационно связано с одним концом молекулы XTEN, которая с другого конца разветвляется, что приводит к снижению экранирования нагрузочного вещества по сравнению с конфигурацией ФИГ. 97A. ФИГ. 97C иллюстрирует конъюгат с двумя нагрузочными веществами, что приводит к увеличению авидности или увеличению активности конструкций. ФИГ. 97D и E иллюстрируют конфигурации с тремя идентичными нагрузочными веществами, что приводит к дальнейшему увеличению активности и/или авидности. ФИГ. 97F иллюстрирует конфигурацию с одним нагрузочным веществом A и двумя идентичными копиями нагрузочного вещества B для сильного авидного связывания или взаимодействия. ФИГ. 97G иллюстрирует конфигурацию с 3 разными нагрузочными веществами, что позволяет включить в один XTEN-конъюгат три различные функции.

[00131] ФИГ. 98 иллюстрирует схему синтеза конъюгата из разветленного полипептида XTEN и одной молекулы нагрузочного вещества. В начале тиоловая группа полипептида XTEN блокируется при реакции с йодацетамидом (в другом варианте синтез может начинатьсяс использованием полипептида XTEN, с недостающей тиоловой группой). Далее к альфа-аминогруппе XTEN добавляется ДБЦО-группа, после чего проходит реакция с тетрафункциональным кросс-линкером, который содержит йодацетильную группу и три азидные группы. Полученная молекула XTEN далее реагирует с нагрузочным веществом, которое несет свободную тиоловую группу, что приводит к получению конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00132] ФИГ. 99 иллюстрирует схему синтеза конъюгата из разветвленного полипептида XTEN и одной молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получается при реакции полипептида XTEN с трифункциональным линкером, включающем две фунционирующие

азидные группы и функционирующую NHS-группу, с последующим добавлением нагрузочного вещества A, связываемом через тиоловую группу посредством реакции с малеинимидом (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается при реакции цистеина полипептида XTEN с йодацетамидом, что блокирует свободные тиоловые группы, с последующим добавлением ДБЦО к альфа-аминогруппе, активированной NHS (порядок этих двух стадий может быть обратным). В дальнейшем две молекулы промежуточного вещества связываются с использованием клик-реакции, приводя к получению конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00133] ФИГ. 100 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид XTEN и две идентичные молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получают добавлением ДБЦО-группы к альфа-аминогруппе полипептида XTEN с помощью реакции с NHS. Второе промежуточное вещество получается при блокировании свободных тиоловых групп полипептида XTEN йодацетамидом добавлением трехфункционального кросс-линкера (2 N-малеинимидные группы и карбоксильная группа, активированная NHS) к альфа-аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Две молекулы промежуточного вещества реагируют с образованием разветвленного конъюгата, после чего с использованием клик-реакции присоединяются две молекулы нагрузочного вещества A, приводя к получению конечного продукта – конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00134] ФИГ. 101 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветленный полипептид XTEN и три идентичные молекулы нагрузочного вещества. Промежуточное вещество получают добавлением ДБЦО-группы к альфа-аминогруппе полипептида XTEN с помощью реакции с NHS. Другое промежуточное вещество получают связыванием нагрузочного вещества A посредством N-малеинимидной функциональной группы с тиоловой группой полипептида XTEN. Три молекулы соединяются вместе посредством трехфункционального кросс-линкера, содержащего три азидные функциональные группы, приводя к получению конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00135] ФИГ. 102 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид XTEN и три идентичные молекулы нагрузочного вещества Промежуточное вещество получают добавлением ДБЦО-группы к тиоловой группе полипептида XTEN с помощью реакции с N-малеинимидом. На следующей стадии нагрузочное вещество A связывается с альфа-аминогруппой промежуточного вещества XTEN с помощью реакции с NHS. Три молекулы полученной молекулы XTEN соединяются посредством трехфункционального кросс-линкера, содержащего три азидные функциональные группы, приводя к получению конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00136] ФИГ. 103 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид XTEN и две молекулы нагрузочного вещества A и одной молекулы нагрузочного вещества B в конъюгате. Промежуточное вещество получается при добавлении нагрузочного вещества A к тиоловым группам полипептида XTEN с использованием N-малеинимидной функциональной группы, с последующим добавлением трехфункционального кросс-линкера (две азидные группы и карбоксильная группа, активированная NHS) к альфа-аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к альфа-аминогруппам полипептида XTEN посредством NHS-активации с последующим добавлением нагрузочного вещества B свободным тиоловым группам полипептида XTEN с использованием N-малеинимидной группы (порядок этих двух стадий может быть обратным). Две молекулы второго промежуточного вещества реагируют с одной молекулой первого промежуточного вещества с образованием конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00137] ФИГ. 104 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид XTEN и три различных нагрузочных вещества. Промежуточное вещество получается при добавлении нагрузочного вещества A к тиоловым группам полипептида XTEN с использованием N-малеинимидной функциональной группы, с последующим добавлением трехфункционального кросс-линкера (одна азидная группа, одна N-малеинимидная группа и одна карбоксильная группа, активированная NHS) к альфа-аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается присоединением нагрузочного вещества B к альфа-аминогруппе полипептида XTEN посредством реакции с NHS. Третье промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к альфа-аминогруппам полипептида XTEN посредством NHS-активации с последующим добавлением нагрузочного вещества C к свободной тиоловой группе полипептида XTEN с использованием N-малеинимидной группы (порядок этих двух стадий может быть обратным). Три молекулы промежуточных веществ реагируют друг с другом с образованием конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00138] ФИГ. 105 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего димерный или тетрамерный разветвленный полипептид XTEN и молекулы нагрузочного вещества Промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к тиоловым группам полипептида XTEN с использованием N-малеинимидной функциональной группы с последующим добавлением нагрузочного вещества A к аминогруппам полипептида XTEN, используя NHS-группу (порядок этих двух стадий может быть обратным). Впоследствии промежуточное вещество мультимеризуется при добавлении азидсодержащих кросс-линкеров. Использование двухвалентного кросс-линкера обеспечивает обеспечивает димерную

конфигурацию, а четырехвалентный кросс-линкер – тетрамерную конфигурацию конечного продукта.

[00139] ФИГ. 106 иллюстрирует схему синтеза конъюгата, несущего разветвленный полипептид XTEN и три различных нагрузочных вещества. Промежуточное вещество получается при добавлении нагрузочного вещества A к тиоловым группам полипептида XTEN с использованием N-малеинимидной функциональной группы, с последующим добавлением трехфункционального кросс-линкера (одна азидная группа, одна N-малеинимидная группа и одна карбоксильная группа, активированная NHS) к альфа-аминогруппе (порядок этих двух стадий может быть обратным). Второе промежуточное вещество получается присоединением нагрузочного вещества B к свободной тиоловой группе полипептида XTEN посредством N-малеинимидной функциональной группы. Третье промежуточное вещество получается при добавлении ДБЦО-группы к альфа-аминогруппам полипептида XTEN посредством NHS-активации с последующим добавлением нагрузочного вещества C к свободной тиоловой группе с использованием N-малеинимидной группы (порядок этих двух стадий может быть обратным). Три молекулы промежуточных веществ реагируют друг с другом с образованием конечного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00140] ФИГ. 107 показывает результаты анализов реакционных смесей при получении конъюгатов с конструкцией 1xДБЦО,3xFA(γ)-XTEN, проанализованных с помощью ОФ ВЭЖХ на носителе C18 и масс-спектроскопии, как описано в Примере 38. ФИГ. 107A представляет анализ исходного реактанта 1xАмино,3xТиол-XTEN. ФИГ. 107B представляет анализ модификации белка с фолат-гамма-малеинимидом, демонстрирующий увеличение массы, которое соответствует модификации трех цистеинов фрагментами FA(γ)-Mal. ФИГ. 107C показывает результаты анализа модификации белка эфиром ДБЦО-сульфо-NHS с увеличением массы, соответствующем добавлению одной функциональной части ДБЦО.

[00141] ФИГ. 108 показывает результаты анализов ОФ ВЭЖХ на носителе C4 реактантов и продукта клик-конъюгата 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN, как описано в Примере 39. (1) 1xДБЦО,3xFA(γ)-XTEN; (2) 1xАзид,3xMMAE-XTEN; (3) продукты клик-реакции.

[00142] ФИГ. 109 показывает результаты анализов конечного продукта 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN, очищенного с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ, как описано в Примере 39. ФИГ. 109A показывает результаты анализа эксклюзионной хроматографии (колонка Phenomenex BioSep-SEC-s4000 600 x 7,80 мм, буферный раствор 50 мМ фосфат натрия pH 6,5 и 300 мМ NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, изократическое элюирование 70 минут). ФИГ. 109B показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ (колонка Phenomenex Jupiter C18 5μM 300Å 150 x 4,60 мм, буферный раствор A: 0,1% TFA в H2O, буферный раствор B: 0,1% TFA в CAN, скорость потока 1 мл/мин, градиент 5% -50% B в течение 45 мин). ФИГ. 109C показывает

результаты анализа МС с ИЭР (QSTAR-XL, рассчитанная ММ 85085,4 Да, экспериментальная ММ 85091 Да).

[00143] 110 показывает результаты определения мобилизационной активности рецептора GPCR Ca^{2+} при действии рекомбинантного белка GLP2-2G-XTEN (закрашенные квадраты) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (закрашенные круги), выполненные как описано в Примере 62.

[00144] ФИГ. 111 показывает результаты определения стабильности в плазме человека in vitro рекомбинантного белка GLP2-2G-XTEN (закрашенные квадраты) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (закрашенные треугольники) в разные периоды времени при 37°C, выполненные как описано в Примере 63.

[00145] ФИГ. 112 показывает результаты определения у крыс фармакокинетических профилей рекомбинантного белка GLP2-2G-XTEN (закрашенные квадраты) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (закрашенные треугольники), выполненные как описано в Примере 64.

[00146] ФИГ. 113. ФИГ. 113A показывает результаты ЭХ-ВЭЖХ анализа продуктов реакции между трис-[2-малеинимидоэтил]амином и 1хАмино,1хТиол-XTEN432: ФИГ. 113A – конъюгационная смесь: пик 1 – тримерный XTEN, пик 2 – димерный XTEN, пик 3 – непрореагировавший мономерный XTEN; ФИГ. 113B – контроль-линейный XTEN_1296; ФИГ. 113C – контроль-линейный XTEN_864; ФИГ. 113D – контроль-линейный XTEN_432.

[00147] ФИГ. 114. ФИГ. 114A показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ конъюгации ДБЦО-сульфо-NHS с полипептидом 1хАмино-XTEN_288, как описано в Примере 65. Непрореагировавший полипептид XTEN элюировался на 19 минуте. 1хДБЦО-XTEN_288 элюировался на 27 минуте. Реагент ДБЦО-сульфо-NHS и продукт его гидролиза элюировались на 41,5 минуте и 38,5 минуте, соответственно. ФИГ. 114B показывает результаты анализа ОФ ВЭЖХ на носителе C18 конъюгации эфира Азидо-ПЭГ4-NHS с трис(2-аминоэтил)амином. 3хАзид-ПЭГ4-TAEA был идентифицирован методами МС с детектированием MALDI-TOF и МС с ЭИР как продукт с ММ 966 Да.

[00148] ФИГ. 115 показывает результаты ЭХ-ВЭЖХ анализа, как описано в Примере 66, продуктов реакции между 3хАзид-ПЭГ4-TAEA и 1хДБЦО-XTEN_288: (кривая A) конъюгационная смесь: пик 1 – тримерный XTEN, пик 2 – димерный XTEN, пик 3 – непрореагировавший мономерный XTEN; пик 4 – вещества с низкой молекулярной массой; (кривая B) – контроль-линейный XTEN_864; (кривая C) – контроль-линейный XTEN576; (кривая D) – контроль-линейный XTEN_288.

[00149] ФИГ. 116 показывает результаты киллинг-анализа, демонстрирующий избирательную цитотоксичность белка 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN для KB-клеток, как описано в Примере 69. Кривая отклика на ингибирующие дозы показаны для групп без MMAE (закрашенные круги); 3xMMAE-XTEN (закрашенные перевернутые треугольники) и 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN в

присутствии (закрашенные треугольники) и отсутствии (заполненные квадраты) конкурента фолиевой кислоты в KB-клетках.

[00150] ФИГ. 117 показывает структуру XTEN-нагрузочное вещество конъюгата 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN. ФИГ. 117A показывает два полипептида XTEN, связанные реакцией азида 1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-овой кислоты, N-гидроксисукцинимидного эфира и алкина 6-(11,12-дидегидродибензо[b,f]азоцин-5(6H)-ил)-6-оксогексановой кислоты, N-гидроксисукцинимидного (или N-гидроксисульфосукцимидного) эфира. ФИГ. 117B показывает остаток X модифицированного Cys с помощью фолат-γ-аминопентил-малеинимида. FIG. 117B показывает остаток X модифицированного Cys с помощью фолат-γ-аминопентил-малеинимида. ФИГ. 117C показывает остаток Z модифицированного Cys с помощью малеинимидокапроил-валин-цитруллин-p-аминобензолоксикарбонил-монометилауристатин E

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00151] Перед описанием вариантов реализации настоящего изобретения, следует понимать, что такие варианты реализации представлены только в качестве примера, и что описанные различные альтернативы вариантов реализации настоящего изобретения могут быть использованы при практическом осуществлении настоящего изобретения. Специалистам в данной области многочисленные варианты, изменения и замещения, которые будут встречаться в данном описании, понятны без отклонения от идеи настоящего изобретения.

[00152] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при осуществлении или проверке данного изобретения могут использоваться подобные, или эквивалентные описанным в этом документе, материалы и методы, ниже описаны приемлемые материалы и методы. В случае возникновения конфликта, будет проверятся описание патента, включая определения. Кроме того, материалы, методы и примеры приводятся только с иллюстративной целью и не подразумеваются как ограничивающие реализацию данного изобретения. Специалистам в данной области многочисленные варианты, изменения и замещения, которые будут встречаться в данном описании, понятны без отклонения от идеи настоящего изобретения.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00153] В контексте данной заявки на патент, следующие термины несут значения, приписываемые им, если не указано иное.

[00154] Как используется во всем описании патента и формуле изобретения, термины в единственном и множественном числе используются в значении, которое обозначает "по меньшей мере один", "по меньшей мере первый", "один или более" или "множество" упоминаемых компонентов или стадий, за исключением случаев, в которых после этого специально устанавливается верхний предел. Поэтому термин "нагрузочное вещество", в использовании в настоящем документе, значит "по меньшей мере первое нагрузочное вещество", но включает множество нагрузочных веществ. Действующие пределы и параметры комбинаций, в отношение количеств какого-либо одного агента, будут известны специалисту в данной области в свете настоящего раскрытия изобретения.

[00155] Термины “полипептид”, “пептид” и “белок” используются в данном документе взаимозаменяемо в отношении полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться вставками из неаминокислот. Термины также охватывают аминокислотные полимеры, которые были модифицированы, например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, присоединением липидов, ацетилированием, фосфорилированием или какой-либо другой манипуляцией, такой как конъюгация с меченным компонентом.

[00156] Как используется в этом документе, термин “аминокислота” относится к природным и/или не встречающимся в природе или синтетическим аминокислотам, включая помимом прочего: D- или L-оптическими изомеры, аналоги аминокислот и белковоподобные вещества. Для обозначения аминокислот используется стандартные одно- или трёхбуквенные кодовые обозначения.

[00157] “Фармакологически активный” агент включает любое лекарственное средство, вещество, состав или смесь, которые необходимо назначить субъекту, например, лекарственные агенты, диагностические агенты или агенты для доставки лекарственных средств, которые обладают или ожидаемо обладают фармакологическим, зачастую благоприятным, действием, которое можно продемонстрировать в условиях in vivo или in vitro. Такие агенты могут включать пептиды, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, олигонуклеотиды и небольшие молекулы синтетических веществ или их аналоги.

[00158] Термин “природные L-аминокислоты” обозначает оптические изомерные L-формы глицина (G), пролина (P), аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), метионина (M), цистеина (C), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), лизина (K), аргинина (R), глютамина (Q), аспарагина (N), глютаминовой кислоты (E), аспарагиновой кислоты (D), серина (S) и треонина (T).

[00159] Термин “не встречающиеся в природе,” применимо к последовательностям и используемо в настоящей заявке, обозначает полипептидные или полинуклеотидные

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

[00160] Термины “гидрофильный” и “гидрофобный” относятся к степени аффинности, которой обладает вещество по отношению к воде. Гидрофильное вещество обладает сильную аффинность к воде, с тенденцией к растворению, смешиванию или смачиванию водой, в то время как гидрофобное вещество в основном обладает недостатком аффинности к воде, с тенденцией к к отталкиванию и отсутствию абсорбции воды и с тенденцией не растворяться, не смешиваться и не смачиваться водой. Аминокислоты могут быть охарактеризованы на основе их гидрофобности. Было разработано несколько классификаций. Примером классификации является разработанная автором Levitt M. et al., J Mol Biol (1976) 104:59, которая приведена в статье Hopp T.P. et al. Proc Natl Acad Sci U S A (1981) 78:3824. Примерами “гидрофильных аминокислот” являются аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин и глютамин. Особый интерес имеют гидрофильные аминокислоты аспарагиновая, серин и глицин. Примерами “гидрофобных аминокислот” являются триптофан, тирозин, фенилаланин, метионин, лейцин, изолейцин и валин.

[00161] Термин “фрагмент” при применении к биологически активному белку, является сокращенной формой биологически активного белка, которая сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. Термин “вариант” при применении к биологически активному белку, является белком с последовательностью, гомологичной к природному биологически активному белку, который сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. Например, вариант белка может разделять по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с референсный биологически активным белком. Как используется в данном тексте, термин “вариант биологически активного белка” включает белки специально модифицированные, например, в сайте, определяющем мутагенез, синтез кодирующего гена, инсерций или случайно измененные вследствие мутаций и сохраняющие активность.

[00162] Термин “вариант последовательности” обозначает полипептиды, которые были модифицированы по сравнению с их нативной или оригинальной последовательностью путем одной или более инсерций, делеций или замен. Инсерции могут быть локализованы на одном или обоих концах белка и/или могут быть размещены в пределах внутренних участков

аминокислотной последовательности. Не ограничивающий реализацию этого изобретения пример, представляет инсерцию XTEN-последовательности в последовательность биологически активного нагрузочного белка. Другой не ограничивающий пример представляет замену аминокислоты XTEN-последовательности другой аминокислотой. В вариантах с делециями один или более аминокислотных остатков удалены как описано в данном тексте. Поэтому варианты с делециями включают все фрагменты несущей полипептидной последовательности. В вариантах с заменами один или более аминокислотных остатков удалены или замещены альтернативными остатками. В одном варианте замены являются консервативными по природе и консервативные замены такого вида хорошо известны в этой области знаний.

[00163] Термин " компонент" обозначает составляющую часть большей композиции или такую часть, которая подразумевает включение в большую композицию, такая как функциональная группа молекулы лекарственного вещества или нацеленного пептида, соединенного с большим полипептидом.

[00164] Как используется в данном тексте, "концевая XTEN-последовательность " относится к XTEN-последовательностям, которые соединены с N- или С-концом несущей молекулы, при этом несущей молекулой является пептид или полипептид.

[00165] Термин "сайт высвобождения XTEN" относится к расщепляемой последовательности в молекуле, несущей XTEN, который может распознаваться и расщепляться протеазой, осуществляя высвобождение XTEN или части XTEN из полипептида XTEN-нагрузочного вещества. Как используется в данной заявке, "протеаза млекопитающих" обозначает протеазу, которая в нормальном состоянии присутствует в жидкостях организма, клетках или тканях млекопитающих. Сайты высвобождения XTEN могут быть сконструированы таким образом, чтобы расщепляться различными протеазами млекопитающих (известных как "высвобождающие XTEN протеазы") такие как трипсин, FXIa, FXIIa, калликреин, FVIIIa, FVIIIa, FXa, FIIa (тромбин), эластаза-2, MMP-12, MMP13, MMP-17, MMP-20 или любая протеаза, присутствующая у субъекта. Могут использоваться другие эквивалентные протеазы (эндогенные или экзогенные), которые способны распознавать определенные сайты расщепления. Сайты расщепления могут быть изменены и скорректированы к используемой протеазе.

[00166] Термин "в пределах", в отношении первого полипептида, связанного со вторым полипептидом, охватывает связывание, которое соединяет N-конец первого или второго полипептида с С-концом второго или первого полипептида, соответственно, а также инсерцию первого полипептида в последовательность второго полипептида. Например, когда полипептид XTEN связан "в пределах" несущего полипептида, XTEN может быть связан с N-концом, С-

концом или может быть вставлен между любыми двумя аминокислотами несущего полипептида.

[00167] Термин “активность” применяется к форме(ам) композиции XTEN-нагрузочное вещество, представленной в данном тексте, относится к действию или эффекту, включающему, не ограничиваясь: рецепторное связывание, антагонистическую активность, агонистическую активность, клеточный или физиологический ответ или эффект, обычно известный для области применения нагрузочного вещества, при количественном измерении *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* или при определении клинического действия.

[00168] Как используется в данной заявке, термин "ELISA" относится к твердофазному иммуноферментному анализу как описано в заявке или как иначе известно в этой области.

[00169] Термин “клетка-хозяина” включает индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была реципиентом для векторов субъекта, какие описаны в данной заявке. Клетки-хозяина включают потомство единственной клетки-хозяина. Потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по геному всей ДНК) оригинальной родительской клетке из-за природной, случайной или намеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки после трансфекции в условиях in vivo с помощью вектора данного изобретения.

[00170] Термин “изолированный” используемый для описания различных полипептидов, раскрываемых в данной заявке, обозначает полипептид, который был идентифицирован и выделен и/или восстановлен из составляющего его природного окружения. Контаминирующие компоненты его природного окружения – это вещества, которые как правило могут мешать диагностическому или терапевтическому использованию данного полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворимые вещества. Для специалистов в этой области очевидно, что не встречающийся в природе полинуклеотид, пептид, белок, антитело или их фрагменты не требуют “изоляции” для отделения их от от их встречающихся в природе аналогов. Кроме того, “концентрированный”, “выделенный” или “разбавленный” полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты являются отделяемыми от их природно встречающихся аналогов в том, что концентрация или количество молекул в единице объема обычно больше, чем эти величины для встречающихся в природе аналогов. В общем, полипептид, созданный рекомбинантными методами и экспрессированный в клетке хозяина считается “изолированным”.

[00171] “Изолированная” нуклеиновая кислота – это молекула нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и выделена по меньшей мере от одной контаминирующей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциируется в природном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Например, изолированная нуклеиновая

кислота, кодирующая полипептид, отличается о форме или свойствам от найденной в природном состоянии. Поэтому, молекулы изолированных кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот отличаются от специфических молекул кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот, которые содержатся в природных клетках. Тем не менее, молекула изолированной кодирующей полипептид нуклеиновой кислоты включает молекулы кодирующих полипептиды нуклеиновых кислот, содержащихся в клетках, которые обычно экспрессируют полипептиды, и в которых, например, молекула нуклеиновой кислоты является хромосомной или внехромосомной локализации, отличного от такой в природных клетках.

[00172] "Химерный" белок содержит по меньшей мере один гибридный полипептид, содержащий по меньшей мере один участок в другом расположении последовательности, чем встречается в природном состоянии. Участки могут обычно размещаться в отдельных белках и соединяются вместе в гибридном полипептиде или они могут естественно размещаться в одном и том же белке, но в гибридном полипептиды размещаться в другом расположении. Химерный белок может быть сконструирован, например, химическим синтезом или созданием и трансляцией полинуклеотида, в котором пептидные участки кодируются в желаемой взаимосвязи.

[00173] "Гибридный белок" и "белок слияния" используются в данной заявке взаимозаменяемо и относятся к соединению двух и более пептидных или полипептидных последовательностей рекомбинантными методами.

[00174] "Функционально связанные" обозначает, что ДНК-последовательности связаны последовательно и находятся в состоянии, доступном для считывания, или в рамке считывания. "Гибридный белок в рамке считывания" относится к двум и более открытых рамок считывания (ОРС) для образования непрерывной большей ОРС, способом, который обеспечивает правильную рамку считывания с оригинальными ОРС. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью полипептида, если они влияют на транскрипцию полипептидной последовательности. Таким образом, результирующий рекомбинантный белок слияния – это один белок, содержащий два или более сегментов, которые соответствуют полипептидам, кодированным оригинальными ОРС (в которых сегменты соединяются не так, как обычно соединяются в природе).

[00175] "Сшивание", "конъюгирование", "связь", "связывание" и "соединение" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и относятся к ковалентному связыванию двух различных молекул с помощью химической реакции. Сшивание может происходить в результате одной или более химических реакций, как подробнее описано ниже.

[00176] Термин "конъюгационный участник" как используется в данной заявке, относится к отдельным компонентам, которые могут быть связаны в реакции конъюгации.

[00177] Термин “конъюгат” предполагается касается гетерогенной молекулы, образованной в результате ковалентного связывания конъюгационных участников друг с другом, например, биологически активное нагрузочное вещество ковалентно связана с XTEN-молекулой или ковалетно присоединена кросс-линкером к реакционно-способной XTEN-молекуле.

[00178] “Кросс-линкер”, “линкер” и “поперечно-сшивающий агент” используются взаимозаменяемо и в их самом широком значении для обозначения химического вещества, которое используется для ковалентного соединения двух или более веществ. Например, кросс-линкер соединяет два, три, четыре или больше XTEN-молекул или соединяет нагрузочное вещество с XTEN, как и вещества, определенные в данном тексте. Кросс-линкер включает, но не ограничивается: продуктом реакции малой молекулы нулевой длины, кросс-линкерными гомо- или гетеро-бифунциональными и мультифункциональными веществами, продуктом реакции взаимодействия двух реактантов клик-реакции. Специалистом в этой области понятно, что кросс-линкер может относится к продукту реакции ковалентного связывания, остающегося после поперечного сшивания реактантов. Кросс-линкер может также состоять из одного или более реактантов, которые еще не прореагировали, но способны реагировать с другим веществом.

[00179] В контексте с полипептидами, “линейная последовательность” или “последовательность” является порядком аминокислот в полипептиде в направлении амино- или карбоксильного конца, в котором остатки, соседствующие в последовательности друг с другом, являются последовательной первичной структурой полипептида. “Частичная последовательность” – это линейная последовательность части полипептида, который известен как содержащая дополнительные остатки в одном или двух направлениях.

[00180] Термин “гетерологичное” обозначает вещество, происходящее из генотипически отличного объекта, отличающегося от остальных компонентов этого объекта, с которыми оно сравнивается. Например, обогащенная глицином последовательность, удаленная из природной кодирующей последовательности и функционально связанная с кодирующей последовательностью, отличной от природной последовательности, является гетерологичной последовательностью, обогащенной глицином. Термин “гетерологичный”, как применяется к полинуклеотиду, полипептиду, обозначает, что полинуклеотид или полипептид происходит из генотипически отличного объекта, отличающегося от остальных компонентов этого объекта, с которыми он сравнивается.

[00181] Термины “полинуклеотиды”, “нуклеиновые кислоты”, “нуклеотиды” и “олигонуклеотиды” используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их аналогов. Полинуклеотиды могут обладать трехмерной структурой и могут выполнять какую-либо роль,

известную или неизвестную. Существуют следующие, не имеющие ограничительного характера, примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие участки гена или фрагмент гена, локусы (локус), определенные при анализе групп сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК с любой последовательностью, изолированная РНК с любой последовательностью, нуклеиновые кислоты-зонды и праймеры. Полинуклеотид может включать модифицированный нуклеотид, такой как метилированные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов. Модификации нуклеотидной структуры, если есть, могут быть внесены до или после образования полимера. Нуклеотидная последовательность может содержать ненуклеотидные компоненты. Полинуклеотид после полимеризации может быть дополнительно модифицирован, в частности конъюгированием с компонентом-маркером.

[00182] Термин “комплементарный полинуклеотид” обозначает полинуклеотидную молекулу, обладающую последовательностью или обращенной последовательностью из комплементарных оснований при сравнении с референсной последовательностью, таким образом, что может с полным соответствием гибридизироваться с референсной последовательностью.

[00183] “Рекомбинантный”, применимо к полинуклеотиду, обозначает, что полинуклеотид является продуктом разных комбинаций рекомбинантных методов, которые могут включать этапы клонирования, рестрикции и/или лигирования и другие операции, которые в результате приводят к экспрессии рекомбинантного белка в клетке-хозяине.

[00184] Термины “ген” и “фрагмент гена” используются в данной заявке взаимозаменяемо. Они относятся к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания, который после транскрипции и трансляции способен кодировать индивидуальный белок. Ген или фрагмент гена может быть геномным или кДНК, при условии, что полинуклеотид содержит по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая может охватывать весь кодирующий участок или его сегмент. “Гибридный ген” – это ген состоящий по меньшей мере из двух гетерологичных полинуклеотидов, которые соединены вместе.

[00185] “Гомологичность” или “гомологичный” или “идентичность последовательности” относится к сходству последовательностей или взаимозаменяемости двух или более полинуклеотидных последовательностей или двух или более полипептидных последовательностей. Для определения идентичности, сходства или гомологичности двух разных аминокислотных последовательностей при использовании такой программы как BestFit, для оптимизации подсчета идентичности, сходства или гомологичности последовательностей могут использоваться настройки по умолчанию или соответствующая матрица подсчета , такая

как blosum45 или blosum80. Предпочтительно, чтобы гомологичными полинуклеотидами были те, которые в строгих условиях, описанных в данной заявке, гибридизируются и обладают по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно 95%, более предпочтительно 97%, более предпочтительно 98% и даже более предпочтительно 99% идентичности при сравнении с такими последовательностями. Гомологичные полипептиды преимущественно обладают идентичностью последовательностей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, даже более предпочтительно по меньшей мере 90% и даже более предпочтительно по меньшей мере на 95-99% идентичны.

[00186] "Лигирование", применительно к нуклеиновым кислотам, относится к процессу образования фосфодиэфирных связей между фрагментами двух нуклеиновых кислот или генов, обеспечивающему их связывание. Для лигирования ДНК-фрагментов генов концы ДНК должны быть совместимыми. В некоторых случаях концы после эндонуклеазного расщепления непосредственно совместимыми. Тем не менее, сначала может потребоваться превратить смещенные концы, обычно образующиеся после эндонуклеазного расщепления, в тупые концы, чтобы сделать их совместимыми для лигирования.

[00187] Термины “строгие условия” или “строгие условия гибридизации” включают ссылку ссылку на условия, в которых полинуклеотид гибридизируется со своей последовательностью-мишенью, в измеримо большей степени чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере с 2-кратным превышением фонового уровня). Обычно указывается точность условий гибридизации, частично с ссылкой на температуру и концентрацию соли, при которых выполняется стадия промывки. В основном, строгие условия должны быть такими, при которых концентрация соли составляет меньше чем около 1,5 M раствор Na-ионов, обычная концентрация 0,01-1,0 M Na-ионов (или других солей) при pH 7,0-8,3 и температура составляет по меньшей мере около 30°C для коротких полинуклеотидов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для длинных полинуклеотидов (например, больше 50 нуклеотидов). Например, “строгие условия” могут обеспечивать гибридизацию в растворе 50% формамида, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C и три промывки, каждая в течение 15 минут в растворе 0,1×SSC/1% SDS от 60°C до 65°C. Альтернативно могут использоваться температуры около 65°C, 60°C, 55°C или 42°C. Концентрация раствора SSC может варьировать от около 0,1 до 2×SSC с добавлением SDS в концентрации около 0,1%. Температура для промывок, в основном, выбирается такой, чтобы быть около от 5°C до 20°C ниже, чем температура плавления для данной последовательности при определенной ионной силе и pH раствора. Tm – это температура (при определенной ионной силе и pH раствора), при которой 50% последовательности-мишени гибридизируется с идеально соответствующим зондом.

Уравнение для расчета Tm и условий для гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны и могут быть найдены в публикации Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Как правило, для блокирования неспецифической гибридизации используют блокирующие агенты. Такие блокирующие агенты к примеру включают расщепленную и денатурированную ДНК спермы лосося в концентрации около 100-200 мкг/мл. В особых условиях, таких как РНК:ДНК гибридизации, также могут использоваться такие органические растворители как формамид в концентрации около 35-50% об./об. Для специалистов в этой области будут совершенно очевидными подходящие вариации таких условий промывки.

[00188] Термины "процентная идентичность", "процент идентичности последовательности" и "% идентичности", применимо к полинуклеотидным последовательностям, относится к проценту совпадений остатков между по меньшей мере двумя полинуклеотидными последовательностями, выровненными с использованием стандартизированного алгоритма. Такой алгоритм может вставлять стандартизированным и воспроизводимым способом пропуски в сравниваемые последовательности для того, чтобы оптимизировать выравнивание двух последовательностей и, таким образом, достичь более значимого сравнения этих двух последовательностей. Процентная идентичность может быть измерена для всей длины целой определенной полинуклеотидной последовательности или может быть измерена для меньшей длины, например, для длины фрагмента, взятого из большей определенной последовательности, к примеру, фрагмент по меньшей мере 45, по меньшей мере 60, по меньшей мере 90, по меньшей мере 120, по меньшей мере 150, по меньшей мере 210 или по меньшей мере 450 последовательных остатков. Такие величины длины представлены исключительно для примера и понятно, что любая длина фрагмента подкреплена последовательностями представленными в данном тексте, в таблицах, фигурах или перечне последовательностей, они могут использоваться для описания длины, для которой может измеряться процент идентичности. Процент идентичности последовательности рассчитывается сравнением двух оптимально выравненных последовательностей в окне сравнения, определяющем количество совпавших положений (в котором идентичные остатки встречаются в обеих полипептидных последовательностях), разделяя количество совпавших положений на общее количество положений в окне сравнения (т.е. в размере окна) и умножая результат на 100, что в результате дает значение процента идентичности производительности. Когда необходимо сравнить последовательности различной длины, то меньшая последовательность определяет окно сравнения. При расчете идентичности последовательности консервативные замены не учитываются.

[00189] “Процент (%) идентичности последовательности” применительно к полипептидным последовательностям, представленным в данном тексте, определен как процент аминокислотных остатков в запрашиваемой последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам второй референсной полипептидной последовательности или ее части после выравнивания последовательностей с внесенными вставками, если необходимо для достижения максимального процента идентичности внесения и, не учитывая какие-либо консервативные замены в качестве части идентичности последовательности, при этом приводя в результате к получению оптимального выравнивания. Выравнивание, проводимое с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности, может быть проведено различными способами, которые определены специальными знаниями, к примеру, используя общедоступные компьютерные программы, такие как BLAST, BLAST-2, ALIGN или программное обеспечение Megalign (DNASTAR). Специалисты в этой области знаний могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, требуемые для достижения оптимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Процентная идентичность может быть измерена для всей длины целой определенной полипептидной последовательности или может быть измерена для меньшей длины, например, для длины фрагмента, взятого из большей определенной полипептидной последовательности, к примеру, фрагмент по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 150 последовательных остатков. Такие величины длины представлены исключительно для примера и понятно, что любая длина фрагмента подкреплена последовательностями представленными в данном тексте, в таблицах, фигурах или перечне последовательностей, они могут использоваться для описания длины, для которой может измеряться процент идентичности.

[00190] “Повторяемость”, используемая в контексте полинуклеотидных последовательностей, относится к степени внутренней гомологичности таких последовательностей как, например, частота идентичных нуклеотидных последовательностей данной длины. Повторяемость может, например, быть измерена анализом частоты встречаемости идентичных последовательностей.

[00191] “Вектор” – это молекула нуклеиновой кислоты, преимущественно самореплицирующаяся в подходящем хозяине, которая переносит внедренную молекулу нуклеиновой кислоты в/или между клетками-хозяев. Этот термин включает внедрение векторов, которое главным образом обеспечивает функцию внедрения ДНК или РНК в клетку, репликацию векторов, которая главным образом обеспечивает функцию репликации ДНК или РНК и экспрессию векторов, которая главным образом обеспечивает функции транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также термином охвачены векторы, которые обеспечивают

поддержание более одной из вышеперечисленных функций. “Вектор экспрессии” – это полинуклеотид, который после введения в подходящую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться в полипептид(ы). “Система экспрессии” обычно подразумевает подходящую клетку-хозяина, содержащую вектор экспрессии, который может функционировать, синтезируя желаемый продукт экспрессии.

[00192] “Устойчивость к деградации в сыворотке”, применительно к полипептиду, относится к способности полипептидов противостоять деградации в крови или в ее компонентах, которые как правило содержат протеазы в сыворотке или плазме. Устойчивость к деградации в сыворотке может измеряться соединением данного белка с сывороткой или плазмой человека (или мыши, крысы, обезьяны, если необходимо), обычно в течение нескольких дней (например 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 дней), обычно при температуре около 37°C. Образцы этих временных точек могут анализироваться методом вестерн-блоттинга, а белок определяться с помощью антитела. Это антитело может быть маркером белка. Если для белка обнаруживается одна полоса в вестерн-анализе, при этом размер белка идентичен размеру введенного белка, то деградация не происходит. В этом приведенном в качестве примера методе, временная точка, в которой, по результатам вестерн-блоттинга или эквивалентных методик деградировало 50% белка, является периодом деградации данного белка в сыворотке или “периодом нахождения в сыворотке”.

[00193] Термины “$t_{1/2}$”, “период”, “конечный период”, “период полувыведения” и “период циркуляции” взаимозаменяемо используются в данном тексте и, применимо к данной заявке, обозначают конечный период, рассчитываемый как $\ln(2)/K_{el}$. K_{el} – константа конечной скорости элиминации, рассчитываемая с помощью линейной регрессии по конечному линейному участку кривой логарифмическая концентрация - время. Период обычно относится к времени, требуемом для того, чтобы половина назначенного количества вещества, внесенного в живой организм метаболизировалась или элиминировалась в результате естественных биологических процессов.

[00194] “Активный клиренс” обозначает механизмы, с помощью которых белок удаляется из русла циркуляции, отличные от фильтрации и которые включают удаление из русла циркуляции, опосредованное клетками, рецепторами, метаболизмом или деградацией белка.

[00195] “Коэффициент кажущейся молекулярной массы” и “кажущаяся молекулярная масса” – связанные термины, относящиеся к измерению относительного увеличения или уменьшения кажущейся молекулярной массы, определяемой индивидуальной аминокислотной или полипептидной последовательностью. Кажущаяся молекулярная масса определяется с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ) или подобными методами, сравнением со стандартами глобулярных белков, и измеряется в единицах “кажущихся кДа”. Коэффициент

кажущейся молекулярной массы – это соотношение между кажущейся молекулярной массой и действительной молекулярной массой. Последняя вычисляется сложением на основании аминокислотного состава, рассчитанной молекулярной массы каждого типа аминокислот в составе или оценкой при сравнении стандартов молекулярной массы в геле для электрофореза с SDS. Определение кажущейся молекулярной массы и коэффициента кажущейся молекулярной массы для представленных белков описано в примерах.

[00196] Термины “гидродинамический радиус” или “радиус Стокса” касаются эффективного радиуса (R_h в нм) молекулы в растворе, измеренного при предположении, что объект движется через раствор и испытывает сопротивление из-за вязкости раствора. При вариантах осуществления данного изобретения измерения гидродинамических радиусов XTEN-полипептидов коррелирует с “коэффициентом кажущейся молекулярной массы”, который является более наглядным показателем. “Гидродинамический радиус” белка влияет на скорость его диффузии в водном растворе, а также на его способности мигрировать в макромолекулярных гелях. Гидродинамический радиус белка определяется его молекулярной массой, а также его структурой, включающей форму и компактность. Методы определения гидродинамических радиусов хорошо известны в этой области знаний, такие как методы с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ), описанные в патентах США №№ 6 406 632 и 7 294 513. Большинство белков имеет глобулярную структуру, которая является наиболее компактной трехмерной структурой, которой может обладать белок с наименьшим гидродинамическим радиусом. Некоторые белки принимают случайную и открытую неструктурированную или ‘линейную’ конформацию, что в результате приводит получению намного большего гидродинамического радиуса по сравнению с типичными глобулярными белками сходной молекулярной массы.

[00197] “Физиологические условия” относятся к набору условий в живом хозяине, а также в условиях in vitro, включающем температуру, концентрацию солей, pH, которые имитируют условия живого субъекта. Для использования при анализах в условиях *in vitro* были установлены соответствующие физиологические условия. Как правило, физиологический буферный раствор содержит физиологическую концентрацию солей и pH, скорректированное до нейтрального, в диапазоне от около 6,5 до около 7,8 и предпочтительно от около 7,0 до около 7,5. Разнообразные физиологические буферные растворы перечислены в книге Sambrook et al. (2001). Диапазоны температур, соответствующие физиологическим условиям, находятся в пределах от около 25^0C до около 38^0C и предпочтительно от около 35^0C до около 37^0C .

[00198] “Одноатомный остаток нагрузочного полипептида” обозначает нагрузочного полипептида, который химически связан с XTEN после прохождения реакции с испытуемым XTEN или с XTEN-линкерными композициями, обычно это атом серы, кислорода, азота или

углерода. Например, атомный остаток нагрузочного вещества может быть серосодержащим остатком цистеин-триоловой реакционно-способной группы нагрузочного полипептида, азотсодержащая молекула реакционно-способной аминогруппы пептида или полипептида или небольшой молекулы нагрузочного вещества, углерод- или кислородсодержащим остатком или реакционно-способной карбоксильной или альдегидной группой пептида, белка или небольшой молекулы или синтетическим органическим лекарственным веществом.

[00199] "Реакционно-способная группа" – это химическое соединение, которое может связываться со второй реакционно-способной группой. Примерами реакционно-способных групп являются аминогруппы, карбоксильные группы, сульфгидрильные группы, гидроксильные группы, альдегидные группы и азидные группы. Некоторые реакционно-способные группы для облегчения конъюгации со второй реакционно-способной группой могут быть активированы непосредственно или через перекрестный линкер. Как используется в данном тексте, реакционно-способная группа может быть частью молекулы XTEN, кросс-линкером, азидных/алкиновым реактантом клик-химии или нагрузочным веществом, при условии, что оно обладает способностью принимать участие в химической реакции. После завершения реакции конъюгационное взаимодействие связывает остатки нагрузочного вещества, кросс-линкера или веществ, реагирующих с полипептидами XTEN.

[00200] "Агент контролируемого высвобождения", "агент медленного высвобождения", "образование депо" и "агент замедленного высвобождения" используются взаимозаменяемо в отношении агента, способного продлевать длительность высвобождения полипептида данного изобретения относительно длительности высвобождения полипептида, назначаемого в отсутствии этого агента. Разные варианты осуществления настоящего изобретения могут иметь разные скорости высвобождения, приводящие к применению разных терапевтических дозировок.

[00201] Термин "нагрузочное вещество" используется в данном тексте относительно любого белка, пептидной последовательности, небольшой молекулы, лекарственного вещества или композиции веществ, которые обладают биологической, фармакологической или терапевтической активностью или благоприятным действием при назначении пациенту или при демонстрации в условиях *in vitro*. Нагрузочное вещество также включает молекулу, которая может быть использована для визуализации при диагностических исследованиях *in vivo*. Примеры нагрузочного вещества включают, но не ограничиваются веществами: цитокинами, ферментами, гормонами, факторами свертывания крови и ростовыми факторами, химиотерапевтическими агентами, противовирусными веществами, токсинами, противораковыми лекарственными веществами, радиоактивными веществами и контрастирующими агентами, а также пептидами-мишенями, белками, антителами,

фрагментами антител или веществами, используемыми для связывания рецепторов или лигандов.

[00202] Термины “антиген”, “антиген-мишень” и “иммуноген” используются в данном тексте взаимозаменяемо в отношении такой структуры или детерминанта связывания, что фрагмент антител или лекарственное средство на основе фрагментов антител обеспечивает с ним связывание или специфично к нему.

[00203] Термин “антагонист”, как используется в данном тексте, включает любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида, раскрываемого в данном тексте. Методы идентификации антагонистов могут включать контакт нативного полипептида с молекулой вероятным антагонистом и измерение выявляемого изменения одного или более видов биологической активности обыкновенно связанной с данным нативным полипептидом. В контексте настоящего изобретения антагонисты могут включать белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, антитела или какие-либо другие молекулы, которые снижают действие биологически активного полипептида.

[00204] “Среда определенного состава” относится к среде, отвечающей питательным и гормональным требованиям, необходимым для выживания и/или роста клеток в культуре, таким что компоненты данной среды являются известными. По традиции, среда определенного состава разрабатывается добавлением питательных и ростовых факторов, необходимых для роста и/или выживания. Как правило, среда определенного состава обеспечивает содержание по меньшей мере одного или более компонентов из следующих категорий: a) все незаменимые аминокислоты и, обычно основной набор двадцати аминокислот плюс цистеин; b) источник энергии, обычно в форме такого углевода как глюкоза; c) витаминов и/или других органических веществ, требуемых в низких концентрациях; d) свободные жирные кислоты; и e) микроэлементы, при этом микроэлементы определяются как неорганические вещества или встречающиеся в природе элементы, которые, как правило, требуются в очень низких концентрациях, обычно микромолярного диапазона содержания. Среда определенного состава может также дополнительно содержать один или большее количество компонентов из следующих категорий: a) один или большее количество митогенных агентов; b) соли и буферные вещества как, например, кальция, магния и фосфатов; c) нуклеозиды и азотистые основания например, такие как аденозин и тимидин, гипоксантин и d) белок и гидролизаты тканей.

[00205] Термин “антагонист”, используется в широком контексте и включает любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида, раскрываемого в данном тексте. Подходящие молекулы-агонисты в частности включают антитела-агонисты или

фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотных последовательностей нативных полипептидов, небольших органических молекул и т.д. Методы идентификации агонистов могут включать контакт нативного полипептида с молекулой вероятным агонистом и измерение выявляемого изменения одного или более видов биологической активности обыкновенно связанной с данным нативным полипептидом.

[00206] "Константа ингибирования" или "Ki" используются взаимозаменяемо и обозначают константу диссоциации фермент-ингибиторного комплекса или обратную величину аффинности связывания ингибитора с ферментом.

[00207] Как используется в данном тексте понятия "лечение" или "получение лечения" или "ослабление симптомов" или "улучшение состояния" используются взаимозаменяемо и обозначают назначение лекарства или биологического препарата с целью достижения терапевтической пользы, для устранения или снижения тяжести существующего болезненного состояния или достижения профилактической пользы, предупреждения или снижения вероятности проявления или тяжести возникновения болезненного состояния. По терапевтической пользе определяют ликвидацию или улучшение причины, которая подлежит лечению, или один или большее количество физиологических симптомов, связанных с причиной, при которых у субъекта наблюдается улучшение, несмотря на то, что субъект все еще может находиться под влиянием причины заболевания.

[00208] "Терапевтическое действие" или "терапевтическая польза" как используется в данном тексте, относится к физиологическому действию, включающему не ограничиваясь: смягчение, ослабление или предупреждение заболевания у людей и животных или иное улучшение физического или ментального благополучия людей или животных, получаемого в результате назначения полипептида этого изобретения, отличного от возможности индуцирования образование антител против антигенного эпитопа, который несет биологически активный белок. Для профилактической пользы эти композиции могут назначаться субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома заболевания (например, кровотечение у субъекта с диагностированной гемофилией А) или субъекту с жалобой на один или большее количество физиологических симптомов заболевания даже в том случае, когда не мог быть поставлен диагноз этого заболевания.

[00209] Термины "терапевтически эффективная дозировка" и "терапевтически эффективная доза", как используется в данном тексте, относится к количеству лекарственного вещества или биологически активного белка, самого по себе или как части полипептидной композиции, которая обеспечивает получение какого-либо обнаруживаемого полезного действия на какой-либо симптом, аспект, измеряемый параметр или особенности свойства или состояния болезни после назначения субъекту одной или повторных доз. Для проявления пользы такой эффект не

должен быть окончательным. Определение терапевтически эффективной дозировки полностью находится в пределах квалификации специалистов в этой области, особенно в свете подробного раскрытия информации, представленного в данном документе.

[00210] Термин “режим терапевтически эффективного дозирования”, как используется в данном тексте, относится к графику последовательного многократного приема доз (т.е. по меньшей мере двух и более) биологически активного белка, самого по себе или как части полипептидной композиции, при котором дозы применяются при терапевтически эффективных дозировках, в результате приводящем к устойчивому благоприятному действию на какой-либо симптом, аспект, измеряемый параметр или особенности свойства или состояния болезни.

I). ОБЩИЕ МЕТОДИКИ

[00211] Применение на практике настоящего изобретения вовлекает, если не указано иное, общепринятые методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, геномики и методов рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах возможностей специалиста в этой области. *Смотрите* публикацию Sambrook, J. *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual,” 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; “Current protocols in molecular biology”, F. M. Ausubel, *et al.* eds.,1987; the series “Methods in Enzymology,” Academic Press, San Diego, CA.; “PCR 2: a practical approach”, M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., Oxford University Press, 1995; “Antibodies, a laboratory manual” Harlow, E. and Lane, D. eds., Cold Spring Harbor Laboratory,1988; “Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics,” 11th Edition, McGraw-Hill, 2005; и Freshney, R.I., “Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique,” 4th edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000 содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00212] Клетки-хозяев могут культивироваться в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дюльбекко среда Игла (DMEM, Sigma) пригодны для культивирования эукариотических клеток. Кроме того, клетки животных могут выращиваться на среде определенного состава без сыворотки, но с добавлением гормонов, ростовых факторов и других факторов, необходимых для выживания и/или роста определенного типа клеток. Поскольку среда определенного состава, поддерживая выживание клеток, обеспечивает способность к размножению, морфологию, способность к обмену веществ и, потенциально, способность клеток дифференцироваться, среда определенного состава, стимулируя рост клеток, обеспечивает всеми химическими веществами, необходимыми для пролиферации и размножения клеток. Основные параметры, регулирующие выживание и рост клеток млекопитающих в условиях in vitro хорошо обоснованы в этой области знаний. Физико-

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

[00213] Питательная среда для выращивания прокариотических клеток-хозяев включает питательные бульоны (жидкая питательная среда) или среду ЛБ (Лурия-Бертани). Подходящая среда включает среду определенного и неопределенного составов. Как правило, среда содержит источник углерода, такой как глюкоза, необходимый для роста бактерий, воду и соли. Среда также может содержать источник аминокислот и азота, например, экстракт говяжьего мяса или дрожжей (в среде неопределенного состава) или определенные количества аминокислот (в среде определенного состава). В некоторых осуществлениях изобретения питательная среда является бульоном ЛБ, например бульон ЛБ Миллера или ЛБ бульон Леннокса. Бульон ЛБ содержит пептон (продукт ферментативного расщепления казеина), экстракт дрожжей и хлорид натрия. В некоторых осуществлениях изобретения используется селективная среда, которая содержит антибиотик. В этой среде будут расти только требуемые клетки, обладающие устойчивостью к данному антибиотику.

II). БЕЛКОВЫЙ ПОЛИМЕР XTEN И КОНЪЮГАЦИОННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

[00214] Настоящее изобретение частично относится к в основном гомогенным композициям, содержащим расширенные рекомбинантные полипептиды (XTEN). В первом аспекте данного

изобретения предложены XTEN-композиции, которые в основном гомогенны по длине молекул. Такие композиции пригодны как реагирующие конъюгационные участники для получения промежуточных веществ XTEN-кросс-линкер и композиций XTEN-нагрузочное вещество. Кроме того, объектом настоящего изобретения является предоставление способов получения в основном гомогенных XTEN-композиций. Настоящее изобретение также представляет способы получения таких в основном гомогенных XTEN-композиций с высоким выходом.

[00215] Во втором аспекте данное изобретение предлагает полипептид XTEN. Например, полипептиды XTEN способны связываться с одним или более участников конъюгации - нагрузочных веществ, приводя к получению конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, которые специально сконструированы для включения определенного количества реакционно-способных аминокислот для присоединения к нагрузочным веществам непосредственно, через кросс-линкеры или азидные/алкиновые реактанты. Настоящее изобретение также предлагает способы получения таких сконструированных полимеров XTEN, которые используются в получении конъюгатов с интересующими нагрузочными агентами в виде композиций с расширенными фармацевтическими свойствами, включающими расширенные фармакокинетические и фармакологические свойства, а также пониженную токсичность.

[00216] В другом аспекте, в данном изобретении предложены в основном гомогенные XTEN-полимеры, состоящие из определенных количеств кросс-линкеров или азидных/алкиновых реактантов в виде реагирующих участников конъюгации в мономерных и мультимерных конъюгациях и методы получения таких реактантов. XTEN-производные, содержащие кросс-линкеры или азидных/алкиновых реактантов используются как реактанты для конъюгации с агентами нагрузочных веществ для получения конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, проявляющего требуемые физические, фармацевтические и фармакологические свойства.

[00217] В другом аспекте, в данном изобретении предложены композиции XTEN-нагрузочное вещество, в которых один или больше полипептидов XTEN химически присоединены к одному или большему количеству нагрузочных веществ, включая комбинации различных нагрузочных веществ, в определенных количествах в мономерных или мультимерных конфигурациях для образования композиций с расширенными фармацевтическими, фармакокинетическими и фармакологическими свойствами. Эти композиции присоединенные к таким нагрузочным веществам могут применяться при назначении пациенту для предупреждения, лечения или облегчения течения заболеваний или болезненных состояний, благодаря фармакологическому или биологическому действию нагрузочного вещества.

1. XTEN: расширенные рекомбинантные полипептиды

[00218] В одном аспекте в данном изобретении предложены композиции в основном гомогенных полипептидов XTEN, которые используются как участники конъюгации для присоединения к одному или большему количеству нагрузочных веществ непосредственно или через кросс-линкер реактанта, обеспечивая получение конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00219] XTEN – полипептиды с невстречающимися в природе в основном неповторяющимися последовательностями, обладающими низкой степенью структурирования или без вторичной или четвертичной структуры в физиологических условиях. Обычно полипептид XTEN содержит от около 36 до около 3000 аминокислот, из которых большинство или полностью все являются небольшими гидрофильными аминокислотами. Как используется в данном документе, в полипептиде "XTEN" специально исключены целые антитела или фрагменты антител (например, одноцепочечное антитело или Fc-фрагмент). Полипептиды XTEN применяются как участники конъюгации в том, что они служат в различных ролях, обеспечивающих требуемые свойства при присоединении к нагрузочному веществу. Получаемые конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество обладают расширенными свойствами, такими как расширенные фармакокинетические, физико-химические, фармакологические и фармацевтические свойства по сравнению с соответствующим нагрузочным веществом, не связанным с полипептидом XTEN, что делает их полезными при лечении определенных состояний, в которых, как известно в этой области, это нагрузочное вещество используется.

[00220] Неструктурированные характеристики и физико-химические свойства XTEN частично получаются из: всего набора аминокислот, которые непропорционально ограничены 4-6 типами гидрофильных аминокислот, связывания аминокислот в количественно определяемую конструкцию без повторений и длины полипептида XTEN. Преимущественной чертой, обычной для полипептида XTEN, но не обычной для природных полипептидов является то, что свойства XTEN, раскрываемые в данном тексте, не связаны с основными первичными аминокислотными последовательностями, как свидетельствует разнообразие примерных последовательностей Таблице 2, что во многом из варьирования диапазонов длины, обладания подобных свойств задокументировано в примерах. Поэтому полипептид XTEN обладает свойствами больше сходными с небелковыми гидрофильными полимерами, чем свойствами присущими белкам. Полипептид XTEN настоящего изобретения выявляет одно или большее количество следующих преимущественных свойств: конформационная гибкость, снижение образования или отсутствие вторичной структуры, высокая степень растворимости в воде, высокая степень устойчивости к протеазам, низкая иммунногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающих, определенная степень заряда и увеличенные гидродинамические (или стоксовские) радиусы; свойства, которые сходны со свойствами определенных

гидрофильных полимеров (например, полиэтиленгликоль), что делает их особенно полезными в качестве участников конъюгации.

[00221] Компонент(ы) XTEN представленных конъюгатов, сконструированы для их поведения в физиологических условиях как денатурированные пептидные последовательности, несмотря на увеличенную длину этого полимера. Термин “денатурированный” описывает состояние пептида в растворе, которое характеризуется большой конформационной свободой пептидного остова. Большинство пептидов или белков принимают денатурированные конформации в присутствии высоких концентраций денатурирующих веществ или повышенной температуры. Пептиды в денатурированной конформации обладают, например, характерными спектрами кругового дихроизма (КД) и характеризуются отсутствием дальнодействующих взаимодействий, определяемых методом ЯМР. Термины “денатурированная конформация” и “неструктурированная конформация” используются в данном тексте как синонимы. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены XTEN-последовательности, которые в физиологических условиях напоминают денатурированные последовательности, которые преимущественно лишены вторичной структуры. В других случаях XTEN-последовательности в основном лишены вторичной структуры в физиологических условиях. Термин “преимущественно лишен”, как используется в этом контексте, обозначает, что менее чем 50% аминокислотных остатков XTEN с последовательностью XTEN вносят вклад в создание вторичной структуры, что измерено или определено методами, описанными в данном тексте. Термин “в основном лишен”, как используется в этом контексте, обозначает, что по меньшей мере около 60% или около 70% или около 80% или около 90% или около 95% или около 97% или около 99% аминокислотных остатков XTEN с последовательностью XTEN не вносят вклад в создание вторичной структуры, что измерено или определено методами, описанными в данном тексте.

[00222] В этой области знаний известны методы и анализы для определения физико-химических свойств представленного полипептида XTEN. Такие свойства включают помимо прочего: вторичную или третичную структуру, растворимость, агрегацию белков, стабильность, действительную и кажущуюся молекулярную массу, чистоту и однородность, свойства плавления, загрязнение и содержание воды. Методы измерения таких свойств включают аналитическое центрифугирование, ЭПР, ионнобменную ВЭЖХ, эксклюзионную хроматографию (ЭХ) ВЭЖХ , ВЭЖХ с обращенными фазами, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресценция, ионнобменную ВЭЖХ, эксклюзионную ВЭЖХ, ИК-, ЯМР-, Раман-спектроскопию, рефрактометрию и спектроскопию в УФ/видимом свете. В частности, вторичная структура может быть определена спектрофотометрически, например,

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

[00223] В одном варианте осуществления последовательности XTEN, используемые в предлагаемых конъюгатах, обладают процентным содержанием альфа-спирали в диапазоне от 0% до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана. В другом варианте осуществления последовательности XTEN обладают процентным содержанием бета-слоя в диапазоне от 0% до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана. В одном варианте осуществления последовательности XTEN-конъюгатов обладают процентным содержанием альфа-спирали в диапазоне от 0% до меньше чем около 5% и процентным содержанием бета-слоя в диапазоне от 0% до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана. В одном варианте осуществления последовательности XTEN конъюгатов обладают процентным содержанием альфа-спирали меньше чем около 2% и процентным содержанием бета-слоя меньше чем около 2%. XTEN-последовательности конъюгационных композиций имеют высокую степень процентного содержания статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, XTEN-последовательность обладает по меньшей мере около 80%, преимущественно по меньшей мере около 90%, преимущественно по меньшей мере около 91%,

преимущественно по меньшей мере около 92%, преимущественно по меньшей мере около 93%, преимущественно по меньшей мере около 94%, преимущественно по меньшей мере около 95%, преимущественно по меньшей мере около 96%, преимущественно по меньшей мере около 97%, преимущественно по меньшей мере около 98% и наиболее преимущественно по меньшей мере около 99% статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В одном варианте осуществления XTEN-последовательностей конъюгационных композиций обладают процентным содержанием альфа-спирали в диапазоне от 0% до меньше чем около 5% и процентным содержанием бета-слоя в диапазоне от 0% до меньше чем около 5%, при определении алгоритмом Чоу-Фасмана, и по меньшей мере около 90% статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В другом варианте осуществления XTEN-последовательностей раскрытых композиций обладают процентным содержанием альфа-спирали меньше чем около 2% и процентным содержанием бета-слоя меньше чем около 2% при по меньшей мере около 90% статистического клубка, при определении GOR-алгоритмом. В другом варианте XTEN-последовательностей этих композиций в них в основном отсутствует вторичная структура при измерении методом кругового дихроизма.

[00224] Выбор критериев для присоединения полипептида XTEN к нагрузочному веществу, используемых для получения конъюгационных композиций, обычно относится к атрибутам физико-химических свойств и конформационной структуры полипептида XTEN, который, в свою очередь, используется для сообщения этим композициям расширенных фармацевтических, фармакологических и фармакокинетических свойств.

1. Неповторяющиеся последовательности

[00225] Специально предусмотрено, что предложенные XTEN-последовательности включающие предлагаемые варианты осуществления конъюгационных композиций, в основном не содержат повторов. В общем, повторяющиеся аминокислотные последовательности имеют склонность к агрегации или образованию структур высшего порядка, примерами которых являются природные последовательности с повторениями, такие как коллагены и лейциновые застежки. Эти повторяющиеся аминокислоты также могут стремиться к образованию контактов, которые приводят к формированию кристаллических или псевдокристаллических структур. В противоположность этому низкая склонность не поторяющихся последовательностей к агрегации дает возможность разрабатывать полипептидыы XTEN с длинными последовательностями с относительно низкой частотой встречаемости заряженных аминокислот, которые, наоборот, с большей вероятностью агрегировали, если бы эти последовательности были повторяющиеся. Неповторяющиеся предлагаемые последовательности XTEN могут обнаруживаться оценкой одной или большого количества следующих особенностей. В одном осуществлении в основном неповторяющаяся

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

[00226] Степень повторяемости полипептид или гена может измеряться с помощью компьютерных программ или алгоритмов или с помощью других средств, известных в этой области знаний. Согласно данному изобретению алгоритмы должны использоваться для расчета степени повторяемости отдельных полипептидов, таких как XTEN, раскрываемых в данном тексте и представленных в виде примеров последовательностей, проанализированных с помощью алгоритмов (*смотрите* Примеры ниже). В одном осуществлении повторяемость полипептида определенной длины может рассчитываться (в дальнейшем “число подпоследовательностей”) согласно формулы, отраженной в уравнении I:

$$\text{Число подпоследовательностей} = \frac{\sum_{i=1}^{m} Count_i}{m} \qquad \text{I}$$

где: m = (количество аминокислот полипептида) – (количество аминокислот подпоследовательности) + 1; и

$Count_i$ (Счетчик$_i$) = совокупное количество каждой уникальной подпоследовательности в пределах последовательности$_i$.

[00227] Алгоритм, названный “SegScore”, был разработан для применения вышеуказанного уравнения для количественного учета повторяемости полипептидов, таких как XTEN, обеспечивая получение числа подпоследовательностей. при этом подпоследовательности из определенного количества аминокислот “n” анализируются на повторяемость вычислением количества раз (“счетчик”) встречаемости на установленной длине последовательности уникальной подпоследовательности длиной “s”, деленной на общее число подпоследовательностей в пределах определенной длины последовательности. ФИГ. 79 описывает логическую блок-схему алгоритма SegScore, в то время как ФИГ. 80 изображает схему того, как значение числа подпоследовательностей получается из воображаемого пептида XTEN из 11 аминокислот и длиной подпоследовательности в 3 аминокислотных остатка.

Например определенный полипептид длиной 200 аминокислотных остатков несет 192 перекрывающиеся подпоследовательности из 9 аминокислот и 198 3-мерных подпоследовательности,но это число подпоследовательностей любого полипептида будет зависеть от общего числа уникальных подпоследовательностей и частоты встречаемости каждой уникальной подпоследовательности (в значении разных аминокислотных последовательностей) на определенной длине этой последовательности.

[00228] В контексте настоящего изобретения “число подпоследовательностей” обозначает сумму значений встречаемости каждого уникального 3-мерного блока среди 200 последовательных аминокислот из общего полипептида XTEN, разделенную на общее число уникальных 3-мерных подпоследовательностей в пределах последовательности из 200 аминокислот. Примеры таких чисел подпоследовательностей, полученных для полипептидов с повторениями и без повторений из 200 последовательных аминокислот, представлены в Примере 45. В одном осуществлении в данном изобретении предложены полипептиды XTEN-нагрузочное вещество, содержащие один полипептид XTEN, в котором последовательность XTEN имеет число подпоследовательностей меньше 12, предпочтительно меньше 10, предпочтительно меньше 9, предпочтительно меньше 8, предпочтительно меньше 7, предпочтительно меньше 6 и наболее предпочтительно меньше 5. В другом осуществлении в данном изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер, содержащие полипептид XTEN, в котором последовательность XTEN имеет число подпоследовательностей меньше 10, предпочтительно меньше 9, предпочтительно меньше 8, предпочтительно меньше 7, предпочтительно меньше 6 и наболее предпочтительно меньше 5. В другом осуществлении в данном изобретении предложены конъюгаты XTEN-соединений клик-химии, содержащие полипептид XTEN, в котором последовательность XTEN имеет число подпоследовательностей меньше 10, предпочтительно меньше 9, предпочтительно меньше 8, предпочтительно меньше 7, предпочтительно меньше 6 и наболее предпочтительно меньше 5. В еще одном осуществлении в данном изобретении предложены конъюгационные композиции полипептидов XTEN, содержащие по меньшей мере два соединенных полипептида XTEN, в которых каждая индивидуальная подпоследовательность XTEN имеет число подпоследовательностей меньше 10 или меньше 9 или меньше 8 или меньше 7 или меньше 6 или меньше 5 или меньше. В еще одном осуществлении в данном изобретении предложены конъюгационные композиции полипептидов XTEN, содержащие по меньшей мере три соединенных полипептида XTEN, в которых каждая индивидуальная подпоследовательность XTEN имеет число подпоследовательностей меньше 10 или меньше 9 или меньше 8 или меньше 7 или меньше 6 или меньше 5 или меньше. В этих описанных в данном тексте

композициях XTEN, последовательность XTEN с числом подпоследовательностей равном 10 или меньше (например, 9, 8, 7 и т.д.) характеризуется как в основном неповторяющаяся.

[00229] В одном аспекте особенностью неповторяющихся последовательностей XTEN настоящего изобретения вместе с особыми типами аминокислот, которые доминируют в полипептидах XTEN, более чем полная первичная последовательность обеспечивает одну или большее количество расширенных физико-химических и биологических свойств полипептидов XTEN и приводит к получению конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество. Эти расширенные свойства включают большую степень экспрессии белка XTEN в клетке-хозяине, большую генетическую стабильность гена, кодирующего белок XTEN, большую растворимость, меньшую тенденцию к агрегации и расширенные фармакокинетические свойства полученного конъюгата по сравнению с нагрузочными веществами неприсоединенными к белку XTEN или нагрузочным веществам, присоединенным к белкам с повторяющимися последовательностями. Эти расширенные свойства позволяют проводить более рентабельное производство, большую однородность конечного продукта, сниженную цену продукции и/или облегчение составление рецептуры, XTEN-содержащих фармацевтических препаратов, включающих очень высокие концентрации белка, в некоторых случаях превышающих 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления полипептидные последовательности XTEN-конъюгатов сконструированы для обеспечения низкой степени внутренней повторяемости для того, чтобы снизить или в основном исключить иммуногенность при введении млекопитающим. Полипептидные последовательности составляют из коротких, повторяющихся мотивов, преимущественно ограниченных только тремя аминокислотами, такими как глицин, серин и глютаминовая кислота, что может привести к относительно высоким титрам антител при введении млекопитающим, несмотря на отсутствие расчитанных эпитопов Т-клеток в этих последовательностях. Такой эффект может быть обусловлен природой повторений в полипептидах, так как было показано, что иммуногены с повторяющимися эпитопами, включая белковые агрегаты, перекрестно связанные иммуногены и повторяющиеся углеводы являются высоко иммуногенными и могут, к примеру, привести к перекрестному связыванию рецепторов В-клеток, это приводит к активации В-клеток. (Johansson, J., *et al.* (2007) Vaccine, 25 :1676-82 ; Yankai, Z., *et al.* (2006) Biochem Biophys Res Commun, 345 :1365-71 ; Hsu, C. T., *et al.* (2000) Cancer Res, 60:3701-5); Bachmann MF, *et al.* Eur J Immunol. (1995) 25(12):3445-3451).

2. Типичные мотивы последовательностей

[00230] Настоящее изобретение охватывает полипептиды XTEN, используемые как участники конъюгации, которые содержат многочисленные блоков меньших последовательностей или мотивов, в которых аминокислотные последовательности этих мотивов в основном неповторяющиеся. Свойство последовательности без повторений может достигаться даже при

использовании подхода “строительных блоков” с применением библиотеки мотивов последовательностей, которые мультимеризуются для получения XTEN-последовательностей, как показано на ФИГ. 18-19. Хотя XTEN-последовательность может состоять из многих блоков по крайней мере четырех разных типов мотивов последовательностей, так как эти мотивы сами по себе обычно состоят из неповторяющихся аминокислотных последовательностей, вся XTEN-последовательность сконструирована для получения в в основном неповторяющейся последовательности.

[00231] В одном варианте осуществления полипептид XTEN обладает неповторяющейся последовательностью большей чем от около 36 до около 3000, или от около 100 до около 2000, или от около 144 до около 1000 аминокислотных остатков, при этом по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% или около 100% XTEN-последовательностей содержат неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых каждый из мотивов несет около 9-36 аминокислотных остатков. Как используется в данном тексте, термин “неперекрывающийся” обозначает индивидуальные мотивы, которые не делят аминокислотные остатки, но, в основном, слиты с другими мотивами или аминокислотными остатками в линейной форме. В других осуществлениях по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% или около 100% XTEN-последовательностей содержат неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых каждый из мотивов несет около 9-14 аминокислотных остатков. В оставшихся других осуществлениях по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% или около 100% XTEN-последовательностей содержат неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых каждый из мотивов несет 12 аминокислотных остатков. В этих осуществлениях преимущественно мотивы последовательностей состоят из в основном (например, на 90% или больше) или исключительно небольших гидрофильных аминокислот таких, что вся последовательность обладает неструктурированным и гибким качеством. Примерами аминокислот, которые включаются в полипептид XTEN являются, например, аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин, глютамин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин и глицин. В одном варианте осуществления XTEN-последовательности несут от четырех до шести преобладающих типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) или пролина (P), которые расположены в виде в основном неповторяющейся последовательности, в которой около от 36 до около 3000, или

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

[00232] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предлагаются конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, XTEN-кросс-линкер и XTEN-реактант клик-химии, содержащие один, два, три, четыре или больше в основном неповторяющейся (ихся) XTEN-

последовательности (ей) от около 36 до около 1000 аминокислотных остатков или суммарно от около 100 до около 3000 аминокислотных остатков, при этом от по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99%т или до около 100% этой последовательности состоит из множества блоков из четырех или более неперекрывающихся мотивов последовательностей, выбранных из аминокислотных последовательностей Таблицы 1, при этом вся последовательность остается без повторений. В некоторых вариантах осуществления данный полипептид XTEN включает неперекрывающиеся мотивы последовательностей, в которых около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% или около 100% этой последовательности состоит из множества блоков из неперекрывающихся последовательностей, выбранных из одного семейства мотивов, выбранных из Таблицы 1, что приводит к получению семейственной последовательности. Семейство, применимо к мотивам, обозначает, что XTEN-последовательность несет мотивы, выбранные из одной категории мотивов из Таблицы 1; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD. В других осуществлениях XTEN-последовательность содержит множество блоков мотивов последовательностей из двух или более семейств мотивов из Таблицы 1, выбираемых для достижения требуемых физико-химических характеристик, включающих такие свойства как суммарный заряд, гидрофильность, недостаток вторичной структуры или недостаток повторяемости, которые могут быть обусловлены аминокислотной композицией этих мотивов, более полно описанных ниже. В этих вышеуказанных осуществлениях, описанных в этом параграфе, мотивы или части мотивов, включенных в XTEN-последовательность, могут быть выбраны или подобраны с использованием способов, описанных в данном тексте, для получения полипептида XTEN от около 36, около 42, около 72, около 144, около 288, около 576, около 864, около 1000, около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков или промежуточных веществ любой длины. Не ограничивающие применение примеры семейства XTEN-последовательностей, пригодных для включения в предлагаемые конъюгаты, представлены в Таблице 2. Подразумевается, что определенная последовательность, упомянутая касательно Таблицы 2, имеет последовательность, отраженную в Таблице 2, тогда как обобщенная ссылка, например, на последовательность AE144 подразумевает включение любой последовательности AE, обладающей 144 аминокислотными остатками; например, AE144_1A, AE144_2A, и т.д. или обобщенная ссылка, например, на последовательность AG144 подразумевает включение любой последовательности AG, обладающей 144 аминокислотными остатками; например, AG144_1, AG144_2, AG144_A, AG144_B, AG144_C и т.д.

Таблица 1: Мотивы XTEN-последовательности из 12 аминокислот и семейства мотивов

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

* Отмечены индивидуальные мотивы, которые при использовнии вместе в разных перестановках, приводят к получению “семейства последовательности”.

Таблмца 2: Полипептиды XTEN

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AE42	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS
AE42_2	PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
AE42_3	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP
AG42_1	GAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGP
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP
AG42_3	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AG42_4	SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG
AE48	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS
AM48	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AF144	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTA PGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESST APGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP
AG144_1	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP
AG144_2	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS
AG144_A	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_B	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_C	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
AG144_F	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AG144_3	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_4	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288_1	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
AG288_2	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSXPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSXPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP
AF540	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESG SASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPS GTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSES PSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPS GESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAP
AD576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEG GPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSSESGSSE GGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGS SGSESGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSSES GSSEGGPGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGES PGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGS GGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESG SSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF576	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESG SASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPS GTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSES PSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPS GESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP
AG576	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
AE624	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AD836	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGESPGGSSGS ESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSS GSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGS SEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPG GSSGSESGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSG GEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGS GGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSS GSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESSGSGGEPSESG SSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPG ESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESS GSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGS ESGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSSESGSSE GGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGS SGSESGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGESPG

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	GSSGSESGSGGEPSESGSS
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSAS PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESS TAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSE SPSGTAPGTSTPESGPXXXGASASGAPSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTS PSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPG TSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSAS PGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP
AG864_2	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGS

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG STSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGPEPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASASGAP STGGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTSTPES GSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGST SSTAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP
BC 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTE PSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSG TEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPS EPGSAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEPGTSEP STSEPGAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSG ASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGT STEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTST EPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPT STEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPS EPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTE PSEPGSAGTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTS TEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSG SEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA
BD864	GSETATSGSETAGTSESATSESGAGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGSETATSGS ETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETAT SGSETAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSE TATSGSETAGTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGS ETAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESA TSESGAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSE TATSGSETAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGA GSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGSASGSTAGSETS TEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSTEA SEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSE

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	TATSGSETAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSAS GSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSE SGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSESA TSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSE TATSGSETA
AE948	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGP
AE1044	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTST
AE1140	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGS

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	ETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA
AE1236	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP
AE1332	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTST
AE1428	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSPA
AE1524	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPA
AE1620	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTST
AE1716	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSP

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	TSTEEGTSESATPESGPGTSE
AE1812	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP
AE1908	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEP
AE2004A	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSE

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AG948	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSP
AG1044	GTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST
AG1140	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSST
AG1236	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGS GTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP
AG1332	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGT ASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTP GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG
AG1428	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP
AG1524	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	ASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPG
AG1620	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG
AG1716	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG
AG1812	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	ATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASP
AG1908	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSP
AG2004A	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGT PGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP
AE72B	SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPG
AE72C	TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPG
AE108A	TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS
AE108B	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATS
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSE
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA
AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESAT
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPS
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATS

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEP
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTE
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES
AE792A	EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES AT
AG72A	GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASS
AG72B	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSP
AG72C	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGA
AG108A	SASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASP
AG108B	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS
AG144A	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS
AG144B	PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP
AG180A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGS
AG216A	TGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG
AG252A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPG
AG288A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS
AG324A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP
AG360A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGASPG
AG396A	GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT
AG432A	GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS
AG468A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG
AG504A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP
AG540A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPG
AG576A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG
AG612A	STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS
AG648A	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TP
AG684A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG
AG720A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPG
AG756A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG
AG792A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG
AG828A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTP
AE869	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGR

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AE144_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTESASR
AE288_R1	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
AE432_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTESASR
AE576_R1	SAGSPTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
AE864_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTESASR
AF864_R1	SAGSPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSE SPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTS TPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSAS PGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSA SPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGS ASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESP

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	SGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSSASR
AG864_R1	SAGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASSASR

[00233] В некоторых осуществлениях, в которых в полипептиде XTEN меньше 100% аминокислот состоит из 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных их глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), или меньше 100% последовательности состоит из мотивов последовательностей из Таблицы 1 или XTEN-последовательности из Таблиц 2, 3 и 22-25 других аминокислотных остатков полипептида XTEN выбраны из любых других 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно выбраны из гидрофильных аминокислот таких, что XTEN-последовательность содержит по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Отдельная аминокислота или короткая последовательность аминокислот отличных от глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P) могут быть включены в полипептид XTEN для получения необходимого свойства, такого как обеспечение внедрения в сайт рестрикции путем кодирования нуклеотидов или для облегчения присоединения к компоненту нагрузочного вещества или для внедрения в расщепляемую последовательность. В качестве типичного осуществления, описанного более полно ниже, в данном изобретении предлагается полипептид XTEN, который содержит от 1 до около 20, или от 1 до около 15, или от 1 до около 10, или от 1 до 5 остатков лизина, при этом реакционно-способные лизиновые остатки используются для присоединения к кросс-линкерам или нагрузочным веществам, как описано в данном тексте. В другом осуществлении, описанном более полно ниже, данный полипептид XTEN включает от 1 до около 20, или от 1 до около 15, или от 1 до около 10, или от 1 до 5 остатков цистеина, при этом реакционно-способные цистеиновые остатки используются для присоединения к кросс-линкерам или нагрузочным веществам, как описано в данном тексте. В другом осуществлении данный полипептид XTEN включает от 1 до около 20 остатков цистеина и лизина, при этом

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

3. Цистеин- и лизин-сконструированные XTEN-последовательности

[00234] В другом аспекте в данном изобретении предложены полипептиды XTEN с определенными количествами с внедренными цистеиновыми и лизиновыми остатками соответственно “цистеин- сконструированные XTEN” и “лизин- сконструированные XTEN”. Объектом данного изобретение является предложение полипептидов XTEN с определенными количествами цистеиновых и/или лизиновых остатков для обеспечения конъюгации между

тиоловой группой цистеина или эпсилон-аминогруппы и реакционно-способной группы нагрузочного вещества или кросс-линкера, которые должны присоединяться к остову молекулы XTEN. В одном варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN этого изобретения содержит от около 1 до около 100 лизиновых остатков, или от около 1 до около 70 лизиновых остатков, или от около 1 до около 50 лизиновых остатков, или от около 1 до около 30 лизиновых остатков, или от около 1 до около 20 лизиновых остатков, или от около 1 до около 10 лизиновых остатков, или от около 1 до около 5 лизиновых остатков, или от 1 до около 3 лизиновых остатков или в другом варианте только один лизиновый остаток. В другом варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN этого изобретения содержит от около 1 до около 100 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 70 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 50 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 30 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 20 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 10 цистеиновых остатков, или от около 1 до около 5 цистеиновых остатков, или от 1 до около 3 цистеиновых остатков или в другом варианте только один цистеиновый остаток. В другом варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN этого изобретения содержит от около 1 до около 10 лизиновых остатков и от около 1 до около 10 цистеиновых остатков. С использованием вышеуказанных лизин- и/или цистеин- сконструированных полипетидов XTEN, могут быть сконструированы конъюгаты, которые включают полипетид XTEN, дополнительный кросс-линкер плюс нагрузочное вещество, пригодное для лечения болезненного состояния пациента, при этом максимальное количество молекул агента нагрузочного вещества присоединяется к XTEN-компоненту по определенному количеству остатков лизина, цистеина или других аминокислот с реакционно-способной группой (например, концевая амино- или тиоловая группа), внедренных в полипептид XTEN.

[00235] В одном варианте осуществления в этом изобретении предлагаются цистеин-сконструированные последовательности XTEN, в которых нуклеотиды, кодирующие одну или большее количество аминокислот полипептида XTEN, замещены аминокислотой цистеином для создания цистеин-сконструированного гена XTEN. В другом варианте осуществления в этом изобретении предлагаются цистеин- сконструированные последовательности XTEN, в которых нуклеотиды, кодирующие одну или большее количество аминокислоты цистеина, вставлены в ген, кодирующий полипептид XTEN, для создания цистеин- сконструированного гена XTEN. В других случаях олигонуклеотиды, кодирующие один или большее количество мотивов от около 9 до около 14 кодирующих аминокислоты кодонов, кодирующих один или большее количество цистеиновых остатков, связаны в блоке с другими олигонуклеотидами, кодирующими XTEN-мотивы или полноразмерные XTEN-последовательности для создания цистеин-сконструированного гена XTEN. В одном вышеуказанном осуществлении, в котором

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

GGSPAGSCTSP
GASASCAPSTG
TAEAAGCGTAEAA
GPEPTCPAPSG
GGSPAGSKTSP
GASASKAPSTG

Однако данное изобретение подразумевает для включения в XTEN-последовательности использование мотивов различной длины, такие как описаны в Таблицах 5 и 11.

[00236] В таких случаях, в которых ген, кодирующий полипептид XTEN с одним или более мотивов с цистеином и/или лизином, должен собираться из существующих XTEN-мотивов или сегментов, это ген может быть сконструирован и построен соединением существующих “строительных блоков” полинуклеотидов, кодирующих короткие и длинные полипептиды

XTEN; например, AE48, AE144, AE288, AE432, AE576, AE864, AM48, AM875, AE912, AG864 или нуклеотиды, кодирующие 36-меры из Примеров 1-4, и Таблиц 22-25, которые гибридизируются в блоке с нуклеотидами, кодирующими цистеин- и/или лизинсодержащие мотивы или, альтернативно, эти цистеин- и/или лизинкодирующие нуклеотиды могут быть превращены с помощью ПЦР в имеющуюся XTEN-последовательность (как более полно описано ниже и в примерах), с использованием, к примеру, нуклеотидов, кодирующих группы из Таблиц 4 и 5 для построения сконструированных полипептидов XTEN, в которых реакционно-способные остатки цистеина и/или лизина размещены в одном или большем количестве предусмотренных в последовательности положении в требуемом количестве. Примеры, не ограничивающие осуществление таких сконструированных полипептидов XTEN, представлены в Таблице 3. Таким образом в одном варианте осуществления данного изобретения XTEN-последовательность содержит по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% идентичной последовательности или является идентичной последовательности или фрагменту последовательности, выбранных из Таблицы 3, при проведении оптимального выравнивания. Однако применение методологии с цистеин- или лизин-сконструированными последовательностями для создания полипептидов XTEN, включающих цистеиновые или лизиновые остатки, не означает наложение ограничения на четко определенные композиции или гамму видов композиций вышеуказанных осуществлений. Специалист в этой области оценит выгоду того, что точное расположение и количество внедренных остатков цистеина и лизина в полипептиды XTEN могут варьировать без отступления от сути данного описанного изобретения.

Таблица 3: Цистеин- и лизин-сконструированные XTEN-последовательности

Название	Аминокислотная последовательность
Seg 1	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR

Название	Аминокислотная последовательность
Seg 2	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 3	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 4	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPTA EAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAA GCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR
Seg 5	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEA AGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT

Название	Аминокислотная последовательность
	SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 6	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTETAEAAGCGTAEAAPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSTAEAAGCGTAEAAAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSTAEAAGCGTAEAAPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATTAEAAGCGTAEAAPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 7	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEA AGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEETA EAAGCGTAEAAGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 8	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTAEAAGCGTAEAAESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSTAEAAGCGTAEAAEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSTAEAAGCGTAEAA APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTTAEAAGCGTAEAASTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATAEAAGCGTAEAATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPETAEAAGCGTAEAASGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEA

Название	Аминокислотная последовательность
	AR
Seg 9	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 10	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 11	ATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 12	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTTAEAAGCGTAEAAEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATTAEAAGCGTAEAASGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA

Название	Аминокислотная последовательность
	GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 13	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 14	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPR
Seg 15	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 16	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET

Название	Аминокислотная последовательность
	PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 17	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGGKPGGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 18	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 19	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEGGKP GPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSGGKPGAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGGKPGPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATGGKPGPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG

Название	Аминокислотная последовательность
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 20	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGGKPGG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGGKPGGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 21	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSGGKPGESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSGGKPGEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSGGKPGAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTGGKPGSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAGGKPGTSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPEGGKPGSGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 22	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPR
Seg 23	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS

Название	Аминокислотная последовательность
	TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGGKPGR
Seg 24	AGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 25	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTGGKPGEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATGGKPGSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 26	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 27	AEATTAAGGAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA

Название	Аминокислотная последовательность
	TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 28	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 29	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEA AR
Seg 30	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES

Название	Аминокислотная последовательность
	GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP TAEAAGCGTAEAAR
Seg 31	ATGTATSEGSPEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 32	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 33	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGT AEAAR
Seg 34	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG

Название	Аминокислотная последовательность
	TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APTAEAAGCGTAEAAR
Seg 35	EPTAATTGESAGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 36	EPTAATTGESAGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 37	EPTAATTGESAGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGT

Название	Аминокислотная последовательность
	AEAAR
Seg 38	EPTAATTGESAGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APTAEAAGCGTAEAAR
Seg 39	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 40	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 41	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGS

Название	Аминокислотная последовательность
	EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR
Seg 42	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 43	ATGTATSEGSPEEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 44	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 45	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE

Название	Аминокислотная последовательность
	GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR
Seg 46	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 47	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPRPRPRPRP
Seg 48	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG

Название	Аминокислотная последовательность
	SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAARPRPRPRP
Seg 49	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAARPRPRPRP
Seg 50	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAGCGTAEAARPRPRPRP
Seg 51	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPR
Seg 52	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE

Название	Аминокислотная последовательность
	TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 53	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCG TAEAAR
Seg 54	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 55	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPT

Название	Аминокислотная последовательность
	AEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 56	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTESATPESGPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 57	AEATTAAGGAEEEGGKPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 58	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 59	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP

Название	Аминокислотная последовательность
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 60	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 61	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPTAE AAGCGTAEAAR
Seg 62	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 63	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 64	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 65	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPTAE AAGCGTAEAAR
Seg 66	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 67	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP

Название	Аминокислотная последовательность
	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 68	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 69	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGGK PGR
Seg 70	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 71	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 72	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 73	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGGK PGR
Seg 74	AEATTAAGGAEEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGKPGR
Seg 75	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG

Название	Аминокислотная последовательность
	ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 76	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 77	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 78	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPT AEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEA AGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP

Название	Аминокислотная последовательность
	GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAG CGTAEAAR
Seg 79	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPTAEAAGCGTAE AAGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPTAEAAGCGTAEAAGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 80	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTAEAAGCGTAEAATSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTTAEAAGCGTAEAAGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTTAEAAGCGTAEAAPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSTAEAAGCGTAEAASTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 81	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTA EAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PTAEAAGCGTAEAAGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 82	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASTAEAAGCGTAEAAPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA

Название	Аминокислотная последовательность
	SSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGTAEAAGCGTAEAAATGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGTAEAAGCGTA EAASPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGATAEAAGCGTAEAASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPTAEAAGCGTAEAASGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTAEAAGCGTAEAATGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGC GTAEAAR
Seg 83	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 84	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 85	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 86	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 87	ATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST

Название	Аминокислотная последовательность
	PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 86	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTTAEAAGCGTAEAAPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSTAEAAGCGTAEAAGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 87	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 88	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 89	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS

Название	Аминокислотная последовательность
	SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 90	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 91	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 92	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGGKPGGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGGK PGGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 93	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS

Название	Аминокислотная последовательность
	GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGGG KPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGGKPGGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTGGKPGPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSGGKPGSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 94	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGG KPGGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGGKPGGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 95	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASGGKPGPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGGGKPGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGGGKPGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAGGKPGSPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPGGKPGSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGGGKPGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 96	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS

Название	Аминокислотная последовательность
	PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 97	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 98	AGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 99	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTGGKPGPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGGKPGGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 100	AGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG

Название	Аминокислотная последовательность
	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 101	AEATTAAGGAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 102	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 103	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 103	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGT AEAAR

Название	Аминокислотная последовательность
Seg 104	AEATTAAGGATAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 105	ATGTATSEGSPEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 106	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 107	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 108	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASP

Название	Аминокислотная последовательность
	GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGT AEAAR
Seg 108	ATGTATSEGSPETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 109	EPTAATTGESAGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 110	EPTAATTGESAGTAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 111	EPTAATTGESAGTAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS

Название	Аминокислотная последовательность
	PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGT AEAAR
Seg 112	EPTAATTGESAGTAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 113	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 114	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG

Название	Аминокислотная последовательность
	TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 115	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGC GTAEAAR
Seg 116	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 117	ATGTATSEGSPEEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 118	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS

Название	Аминокислотная последовательность
	SSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 119	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAG CGTAEAAR
Seg 120	ATGTATSEGSPEEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 121	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS

Название	Аминокислотная последовательность
	GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPRPRPRPRP
Seg 122	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAARPRPRPRP
Seg 123	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGC GTAEAARPRPRPRP
Seg 124	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPTAEAAGCGTAEAARPRPRPRP
Seg 125	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS

Название	Аминокислотная последовательность
	STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPR
Seg 126	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 127	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGC GTAEAAR
Seg 128	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS

Название	Аминокислотная последовательность
	ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 129	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP TAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGG KPGR
Seg 130	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGGKPGR
Seg 131	AEATTAAGGAEEEGGKPGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGGKPGGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 132	AEATTAAGGAEEETAEAAGCGTAEAAGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG

Название	Аминокислотная последовательность
	ASPGTSSTGSPGGKPGGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP TAEAAGCGTAEAAGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGG KPGR
Seg 133	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 134	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 135	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 136	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 137	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 138	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP

Название	Аминокислотная последовательность
	SGATGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 139	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAE AAGCGTAEAAR
Seg 140	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPTAEAAGCGTAEAAR
Seg 141	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 142	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 143	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGG KPGR
Seg 144	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 145	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 146	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP

Название	Аминокислотная последовательность
	SGATGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 147	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGG KPGR
Seg 148	AEATTAAGGAEEEGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGGKPGR
Seg 149	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 150	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGA SASCAPSTGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG
Seg 151	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

Название	Аминокислотная последовательность
Seg 152	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGPEPTCPAPS GGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPG
Seg 153	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 154	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGASASCAPST GGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGASASCAPSTGGGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPG
Seg 155	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGGSPAGSCTS PGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT

Название	Аминокислотная последовательность
	GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 156	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGASASCAPST GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGPEPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSTSESPSGTAPGT SPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
Seg 157	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGPEPTCPAPS GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 158	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGPEPTCPAPS GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT

Название	Аминокислотная последовательность
	GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGPEPTCPAPSGGMAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG
Seg 159	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 160	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGA SASKAPSTGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG
Seg 161	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 162	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGASASKAPST GGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE

Название	Аминокислотная последовательность
	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPG
Seg 163	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 164	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGGSPAGSKTS PGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APG
Seg 165	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGGSPAGSKTS PGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG

Название	Аминокислотная последовательность
	SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 166	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGASASKAPST GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGPEPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSTSESPSGTAPGT SPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
Seg 167	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGASASKAPST GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG
Seg 168	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGGASASKAPST GGGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG

Название	Аминокислотная последовательность
	SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGGASASKAPSTGGMAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG
Seg 169	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
Seg 170	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGGSPAGSCTS PGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGG SPAGSCTSPGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSCTSPGGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPG
Seg 171	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGGGSPAGSKTS PGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGG SPAGSKTSPGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGGGSPAGSKTSPGGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPG
Seg 172	SAGSPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT AEAASASR
Seg 173	SAGSPGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAGPTKPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET

Название	Аминокислотная последовательность
	PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPTKPGTSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAG CGTAEAASASR
Seg 174	SAGSPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAASASR
Seg 175	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTAEAAGCGTAEAASTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGC GTAEAASPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEAAGCGTAEAASET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTTAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGTAEAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PTAEAAGCGTAEAASASR
Seg 176	SAGSPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT AEAASASR
Seg 177	SAGSPTAEAAGCGTAEAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTAE AAGCGTAEAASTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGCGTAE AASPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEAAGCGTAEAASETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTTAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE

Название	Аминокислотная последовательность
	PATSGTAEAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAASASR
Seg 178	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
Seg 179	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGR
Seg 180	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGKPGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPK
Seg 181	SAGSPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE

Название	Аминокислотная последовательность
	PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGR
Seg 183	MKNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASRSAHHHHHHHH
Seg 184	MKNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTAEAAGCGTA EAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTAEAAGCGTAEAASTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGCGTAEAASPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEAAGCGTAEAASETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTTAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESTAE AAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGTAEAAGCGTAE AATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAASASRS AHHHHHHHH
Seg 185	MKNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAG CGTAEAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTAEAAGCGTAEAAS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGCGTAEAASPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEAAGCGTAEAASETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTTAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGTAEAAG CGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAA SASRSAHHHHHHHH
Seg 186	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPTAEAAGKPGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP

Название	Аминокислотная последовательность
	TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGK
Seg 187	SAGSPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
Seg 188	SAGSPTEGTSTEPSEGSAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGTAEAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPTAEAAGCGTAEAASASR
Seg 189	SAGSPTPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAE AASASR
Seg 190	SAGSPTGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT AEAASASR
Seg 191	SAGSPTPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGTA EAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGT AEAASASR
Seg 192	SAGSPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGCTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAES PGPGTSTPESGSASPGSTSCSPSGEAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTA PETSPSGESCTAPGSTSASR
Seg 193	SAGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGCAGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTCSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTACSSPGSSSASR
Seg 194	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS

Название	Аминокислотная последовательность
	APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTESASK
Seg 195	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASR
Seg 196	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSCASASR
Seg 197	SAGSPGSCAGSPTSTEEGTSESACPESGPGTSTEPSEGSCPGSPAGSPTSTEEGTCTEPSE GSAPGTSTEPCSGSAPGTSESATPESCPGSEPATSGSETPGSCPATSGSETPGSPAGSCTS TEEGTSESATPESCPGTESASR
Seg 198	SAGSPTGCGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSCTPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSCGSAPSASR
Seg 199	SAGSPTGCGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSCTPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPCSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESCTPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSCTPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGCSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETCGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GCAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSCGSAPSASR

[00237] В другом осуществлении в данном изобретении предложены инсерции, обеспечивающие вставки лизина в виде части более длинной последовательности, определяемой как лизиновый участок. Примеры лизиновых участков показаны в Таблице 4. Преимущество фланкирования всех лизиновых участков в полипептиде XTEN по отношению к подобным или идентичным последовательностям в том, что это приводит к более однородной химической реакционной способности каждого лизинового остатка. Другое преимущество приводит к получению возможности выполнять пептидное картирование для измерения степени связывания нагрузочных веществ. Примеры включают участки I_L6, I_L7 и I_L8 в Таблице 4. Эти участки содержат остатки глутаминовой кислоты, которые облегчают пептидное картирование с использованием GluC-протеазы. В другом осуществлении в данном изобретении предложены инсерции, обеспечивающие вставки цистеина в виде части более

длинной последовательности, определяемой как цистеиновый участок. Примеры цистеиновых участков показаны в Таблице 5. Преимущество фланкирования всех цистеиновых участков в полипептиде XTEN по отношению к подобным или идентичным последовательностям в том, что это приводит к более однородной химической реакционной способности каждого цистеинового остатка. Другое преимущество приводит к получению возможности выполнять пептидное картирование для измерения степени конъюгации нагрузочных веществ. Примеры включают участки I_C4, I_C7, I_C8 и I_C9 в Таблице 5. Эти участки содержат остатки глутаминовой кислоты, которые облегчают пептидное картирование с использованием GluC-протеазы. Эти участки могут быть внедрены в конструкции, кодирующие имеющиеся полипептиды XTEN с помощью традиционных методов ПЦР, как описано выше и в примерах. Олигонуклеотиды, кодирующие эти участки могут быть внедрены в конструкции, кодирующие имеющиеся полипептиды XTEN с помощью традиционных методов ПЦР. Например, в одном осуществлении, в котором имеющийся ген полноразмерного полипептида XTEN, должен быть модифицирован с помощью нуклеотидов, кодирующих один или большее количество остатков цистеина или лизина, олигонуклеотид может быть создан таким, что кодирует цистеин или лизин и таким, который проявляет частичную гомологию и может гибридизироваться с один или более коротких последовательностей полипептида XTEN, что приводит к акту рекомбинации и замещению имеющегося кодона цистеина или лизина данного гена XTEN (см., например, Примеры 6 и 7 касательно описания общих методов). В одном иллюстративном осуществлении такая рекомбинация приводит к замещению в аминокислотной последовательности GGSPAGSCTSP участка I_C1. Тем не менее эти олигонуклеотиды могут быть сконструированы для замещения цистеина (или лизина) в разных положениях мотива или для включения в мотив второго цистеина (или лизин). Цистеин- или лизинкодирующие олигонуклеотиды могут быть сконструированы для гибридизации с заданным сегментом последовательности в разных точках вдоль известной XTEN-последовательности для обеспечения их внедрения в ген, кодирующий полипептид XTEN. Таким образом в данном изобретении подразумевается, что множественные генные конструкции полипептидов XTEN могут быть созданы с помощью внедрения в разные положения в пределах XTEN-последовательности остатков цистеина или лизина путем выбора сайтов рестрикции в пределах XTEN-последовательности и с помощью конструкции олигонуклеотидов, пригодной для получения заданного положения и кодирующей цистеин или лизин, включая использование сконструированных олигонуклеотидов, что приводит к получению многократных инсерций в такие же XTEN-последовательности. Принимая во внимание конструкцию, выбор одного или более таких олигонуклеотидов с известной последовательностью полипептида XTEN и надлежащее применение способов этого изобретения, может быть оценено и потом

подтверждено секвенированием конечного гена полипептида XTEN потенциальное количество замещенных реакционно-способных остатков цистеина или лизина, внедренных в полноразмерный полипептид XTEN.

Таблица 4: Примеры лизиновых участков

Обозначение	Аминокислотная последовательность
I_L1	GGSPAGSKPTSP
I_L2	GASASKPAPSTG
I_L3	PKP
I_L4	PPKPP
I_L5	GGKPG
I_L6	EGGKPGES
I_L7	EGGSPAGSKPTSPE
I_L8	EGASASKPAPSTGE

Таблица 5. Примеры цистеиновых участков

Обозначение	Последовательность
I_C1	GGSPAGSCTSP
I_C2	GASASCAPSTG
I_C3	GPEPTCPAPSG
I_C4	TAEAAGCGTAEAA
I_C5	GECEP
I_C6	GRPCRP
I_C7	GETSPAGSCTSPTET
I_C8	TESGRPCRPSET
I_C9	GPEPTCPAPSEG

[00238] Полипептид XTEN может быть сконструирован так, чтобы включать оба вида остатков лизина и цистеина для конъюгации, показанной на фигуре 1D. Что дает полипептиду возможность для конъюгации двух различных нагрузочных веществ с таким же XTEN-полимером, используя способы конъюгации направленные на реакцию с функциональными группами или линкерами, присоединенными к цистеину или лизину. Такие смешанные нагрузочные вещества могут обладать адитивным и/или синергическим фармакологическим действием при назначении пациенту в виде одной композиции. Альтернативно, смешанные нагрузочные вещества могут быть комбинацией нацеленного компонента и активным нагрузочным веществом для того, чтобы доставить фармакофор в требуемую зону у пациента. Контролируя количество и положение остатков лизина и цистеина каждый разработчик может контролировать количество и положение присоединенных нагрузочных веществ. Это дает возможность разработчику регулировать относительную активность и селективность нагрузочных веществ в получаемом конъюгате XTEN-нагрузочное вещество.

[00239] Структура, выбор и способы получения веществ данного изобретения дают возможность создания сконструированных полипептидов XTEN, которые проявляют

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

4. Длина последовательности

[00240] В другом аспекте в данном изобретении предлагаются XTEN-последовательности различной длины для внедрения в эти композиции, при этом длина XTEN-последовательности (ей) выбирается на основе определенных свойств или функций, которые требуется достичь для этой композиции. В зависимости от предполагаемого свойства или функции, эти конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество включают XTEN-последовательности короткой или промежуточной длины или более длинные XTEN-последовательности, или мультимеры коротких, промежуточных или длинных полипептидов XTEN, которые могут служить переносчиками. В то же время не предполагая ограничений, данный полипептид XTEN или фрагменты полипептида XTEN состоят из коротких сегментов из от около 6 до около 99 аминокислотных остатков, промежуточные длины от около 100 до около 399 аминокислотных остатков и большие длины от около 400 до около 1000 и вплоть до около 3000 аминокислотных остатков. Поэтому данные полипептиды XTEN, используемые как участники конъюгации для внедрения в предложенные конъюгаты, включают полипептиды XTEN или фрагменты полипептидов XTEN с длинами около 6, или около 12, или около 36, или около 40, или около 48, или около 72 или около 96, или около 144, или около 288, или около 400, или около 432, или около 500, или около 576, или около 600, или около 700, или около 800, или около 864, или около 900, или около 1000, или около 1500, или около 2000, или около 2500, или вплоть до около 3000 аминокислотных остатков по длине. В других случаях данные XTEN-последовательности могут быть от около 6 до около 50, от около 50 до около 100, от около 100 до 150, от около 150 до 250, от около 250 до 400, от около 400 до около 500, от около 500 до около 900, от около 900 до 1500, от около 1500 до 2000, или от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков по длине. Точная длина XTEN-последовательностей, внедренных в

предложенные конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, могут варьировать без негативного влияния на биологическую активность таких конъюгатов. В одном осуществлении один или большее количество последовательностей XTEN могут быть выбраны из одного из семейств XTEN-последовательностей; например, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD. В некоторых вариантах осуществления изобретения данные последовательности XTEN, используемые для создания предложенных конъюгатов, включают последовательности XTEN, выбранные из каких-либо последовательностей из Таблиц 2, 3 и 22-25, которые могут быть присоединены к компоненту нагрузочного вещества непосредственно или через кросс-линкеры, раскрытые в данном тексте. В других вариантах один или большее количество последовательностей XTEN, используемые для создания предложенных конъюгатов, включают XTEN-последовательность, обладающую по меньшей мере около 80% идентичностью последовательности или в других случаях 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностями XTEN, выбранными из Таблиц 2, 3, 22-25 или их фрагментов при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В некоторых вариантах осуществления, предложенные конъюгаты состоят из 2, 3, 4 или более XTEN последовательность, отличающийся тем суммарная длина остатков XTEN-последовательностей больше чем от около 100 до около 3000, или от около 400 до около 2000, или от около 800 до 1000 аминокислотных остатков и XTEN-последовательности могут быть идентичными или они могут отличаться по набору или длине последовательности. Как используется в данном тексте, под термином суммарная длина подразумевается объединение общей длины в аминокислотных остатках, когда в конъюгат включено более одного полипептида XTEN.

[00241] Более подробно описанные ниже способы, в которых раскрывают конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, разработаны путем выбора длины полипептида XTEN и способа соединения его с реактантом кросс-линкера или с нагрузочным веществом для приобретения физико-химического свойства (например, стабильности или растворимости) или для получения целевого периода полувыведения или сохранения активности, когда конъюгат XTEN-нагрузочное вещество вводится пациенту.

[00242] Полипептиды XTEN используются в композициях как переносчики, данное изобретение использует преимущество открытия, которое увеличивает длину неповторяющихся неструктурированных полипептидов, улучшающее неструктурированность полипептидов XTEN и соответственно улучшающее физико-химические и фармакокинетические свойства конструкций, содержащих XTEN-носитель. В общем полипептиды XTEN в виде мономеров или мультимеров с суммарными длинами больше чем около 400 остатков, внедряясь в конъюгаты, приводят к продлению периода полувыведения по

сравнению с более короткими суммарными длинами последовательностей, например короче чем около 280 остатков. Как более полно описано ниже в примерах, пропорциональные увеличения длины полипептидов XTEN, даже если они получены путем повторений одного семейства мотивов последовательностей (например, четыре мотива AE из Таблицы 1), приводит к получению последовательности с большим процентным содержанием структуры статистического клубка, при определении с помощью GOR-алгоритма или пониженным содержанием альфа-спиралей или бета-слоев, при определении с помощью алгоритма Чоу-Фасмана, по сравнению с более короткими длинами полипептидов XTEN. Кроме того, увеличение длины неструктурированного полипептидного участника гибридизации, как описано в примерах, приводит к получению конструкции с непропорциональным увеличением конечного периода полувыведения по сравнению с полипептидами, взаимодействующими с неструктурированными полипептидными участниками с более короткими длинами. В некоторых вариантах осуществления, в которых полипептид XTEN служит главным образом переносчиком, данное изобретение охватывает конъюгационные композиции XTEN состоящие из двух, трех, четырех или более полипептидов XTEN, при этом суммарная длина XTEN-последовательности этих белков XTEN больше чем от около 100, 200, 400, 500, 600, 800, 900 или 1000 до около 3000 аминокислотных остатков, при этом такая конструкция выявляет улучшенные фармакокинетические свойства при введении пациенту по сравнению с нагрузочным веществом неприсоединенным к полипептиду XTEN и назначаемому в сравнимой дозе. В одном варианте вышеуказанного осуществления каждая из двух или более XTEN-последовательностей выявляет по меньшей мере около 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% или больше идентичности к последовательности, выбранной из какой-либо последовательности из Таблиц 2, 3 или 22-25, а оставшаяся последовательность (и) носителя, если такая есть, содержит по меньшей мере 90% гидрофильных аминокислот и меньше чем около 2% всей последовательности состоит из гидрофобных или ароматических аминокислот или цистеина. Улучшенные фармакокинетические свойства конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, в сравнении с нагрузочным веществом не соединенным полипептидом XTEN более полно описаны ниже.

5. Сегменты XTEN из предшественников полипептидов XTEN

[00243] В другом аспекте, в данном изобретении предлагаются способы создания XTEN-последовательности из фрагментов короткой или промежуточной длины из более длинных “донорских” XTEN-последовательностей, при этом более длинная донорская XTEN-последовательность является укороченной на N-конце или C-конце или представляет сегменты, полученные путем протеолиза полипептидов XTEN, содержащих последовательности действия протеаз, приводя таким образом к получению коротких или промежуточных фрагментов XTEN.

В примерах не ограничивающих осуществление, производительность AG864 из 864 аминокислотных остатков может быть фрагментирована для получения последовательностей AG144 из 144 остатков, AG288 из 288 остатков, AG576 из 576 остатков или других фрагментов промежуточных длин, в то время как производительность AE864 может быть фрагментирована для получения нескольких последовательностей AE144, производительности AE288 или последовательности AE576 из 288 или 576 остатков или других фрагментов более коротких или промежуточных длин. Подобным образом, можно манипулировать с молекулой ДНК, кодирующей более длинные “донорские” последовательности для внедрения остатков цистеина или лизина, которых предполагается использовать в конъюгатах с короткими или промежуточными длинами последовательностей XTEN. Специально предусмотрено, что такой подход может быть использован с любым из осуществлений полипептидов XTEN, описанных в данном тексте, или с любыми последовательностями, перечисленными в Таблицах 2, 3, 21 и 22 для получения полипептида XTEN требуемой длины.

[00244] В другом аспекте, в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с расщепляемыми последовательностями, внедренными внутрь последовательности через определенные интервалы такие, чтобы полипептид XTEN мог процессироваться расщеплением на 2, 3, 4, 5 или 6 более коротких пептидов XTEN однородной длины. Как показано на ФИГ. 96A, мономерный полипептид XTEN сконструирован с двумя внутренними расщепляемыми последовательностями так, чтобы обрабатываться протеазой в условиях, эффективных для обеспечения расщепления всех расщепляемых последовательностей, что приводит к получению трех XTEN-сегментов однородной длины. Кроме того, этот полипептид XTEN сконструирован с такой последовательностью, что также приводит к получению XTEN-сегментов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность, включая остаточную расщепляемую последовательность. В одном варианте, в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с определенной последовательностью, содержащей 1, 2, 3, 4 или 5 аргининовых (R) остатков внутри XTEN-последовательности и разделенных однородными интервалами вдоль XTEN-последовательности, соединяющими идентичные XTEN-сегменты, при этом обработка трипсином приводит к расщеплению полипептида XTEN на XTEN-сегменты, имеющие идентичную длину и последовательность. В вышеуказанных осуществлениях, остатки аргинина не присоединены к остаткам пролина в соседнем P1'-положении. Таким образом, обработкой вышеуказанных полипептидом трипсином, полипептид XTEN с 1 внутренним аргининовым остатком в результате разделится на 2 идентичных XTEN-сегмента, полипептид XTEN с 2 внутренними аргининовыми остатками в результате разделится на 3 идентичных XTEN-сегмента и т.д. В другом варианте каждый аргининовый остаток вышеуказанных осуществлений замещается лизиновыми остатками. В

другом варианте, в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с определенной последовательностью, содержащей 1, 2, 3, 4 или 5 последовательностей расщепление внутри XTEN-последовательности и разделенных однородными интервалами вдоль XTEN-последовательности, при этом каждая расщепляемая последовательность представляет собой SASRSA, и обработка трипсином приводит к расщеплению полипептида XTEN на XTEN-сегменты, имеющие идентичную длину и последовательность. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 6. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются полипептиды XTEN с по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблице 6. При этом полипептид XTEN дополнительно включает первый и второй аффинный маркер, в котором каждый из аффинных маркеров присоединены к XTEN с помощью расщепляемой последовательности к N- и C-концам XTEN соответственно, при этом каждая расщепляемаая последовательность способна расщепляться трипсином, и при этом первый аффинный маркер отличается от второго аффинного маркера и каждый независимо выбран из группы, состоящей из аффинных маркеров, отраженных в Таблице 7. Вышеприведенный вариант осуществления показан на ФИГ. 96B, при этом обработка протеазой полипептида XTEN с двумя внутренними расщепляемыми последовательностями и N-концевым и C-концевым аффинным маркером, каждый из которых присоединен к полипептиду XTEN через расщепляемую последовательность приводит к расщеплению конструкции на три XTEN-сегмента одинаковой длины и высвобождению двух аффинных маркеров, полученный препарат этого варианта в последствии может быть процессирован в основном в гомогенный полипептид XTEN как описано в данном тексте ниже. В данном изобретении предусмотрены вариации полипептидов XTEN, содержащие такие однообразные расщепляемые последовательности и их распределение в этой последовательности.

Таблица 6: XTEN-предшественники с внутренними расщепляемыми последовательностями

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AE864_R2 (2x AE432_R1)	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTESASR
AE864_R3 (3x AE288_R1)	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASRSAGSPTGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASRSAGSPTGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASR
AE864_R6 (6x AE144_R1)	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASRSAGSPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTE SASRSAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTESASR
Seg 200 (3x Seg 195)	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASRSAGSPTGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASRSAGSPTGPGSEPATSGSETPGT

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
	SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTACSEGSAPSASR
Seg 201 (3x Seg 196)	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSCASASRSAGSPTGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSCASASRSAGSPTGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSCASASR

6. Суммарный заряд

[00245] В других вариантах осуществления полипептиды XTEN обладают неструктурированным характером, обусловленным внедрением аминокислотных остатков со свободным зарядом и содержащие низкое процентное содержание или не содержащие гидрофобные аминокислоты в XTEN-последовательности. Общий суммарный заряд и плотность суммарного заряда контролируется модификацией содержания заряженных аминокислот в XTEN-последовательностях на положительный или отрицательный с получением суммарного заряда, обычно представляемого как процентное содержание аминокислот в полипептиде, которые вносят вклад в состояние заряда за пределами этих остатков, которое аннулируется остатком с противоположным зарядом. В некоторых вариантах осуществления плотность суммарного заряда конъюгата полипептида XTEN может составлять выше +0,1 или ниже -0,1 заряда на остаток. Термином “суммарная плотность заряда” белка или пептида в данном тексте обозначается суммарный заряд, деленный на общее количество аминокислот в белке. В других вариантах суммарный заряд полипептида XTEN может составлять около 0%, около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9%, около 10% около 11%, около 12%, около 13%, около 14%, около 15%, около 16%, около 17%, около 18%, около 19%, или около 20% или больше. Благодаря суммарному заряду некоторые полипептиды XTEN имеют изоэлектрическую точку (pI) равную 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 или даже 6,5. В одном варианте полипептид XTEN будет иметь изоэлектрическую точку между 1,5 и 4,5 и нести в физиологических условиях суммарный отрицательный заряд.

[00246] Поскольку большинство тканей и поверхностей организма человека и животного несут отрицательный суммарный заряд, то в некоторых осуществлениях XTEN-последовательности сконструированы так, чтобы нести отрицательный суммарный заряд для минимизации неспецифических взаимодействий между композициями, содержащими полипептиды XTEN и различными поверхностями, такими как кровеносные сосуды, здоровые ткани или различные рецепторы. Без связи с определенной теорией полипептид XTEN может принимать открытые конформации из-за электростатического отталкивания между отдельными аминокислотами полипептида XTEN, который самостоятельно несет отрицательный суммарный заряд, который распределен вдоль последовательности полипептида XTEN. В некоторых осуществлениях XTEN-последовательность сконстуирована с по меньшей мере от 90% до 95% заряженных остатков, разделенных другими незаряженными остатками, такими как серин, аланин, треонин, пролин или глицин, что ведет к более однородному распределению заряда, лучшей экспрессии или поведению при очистке. Такое однородное распределение отрицательного суммарного заряда на протяженных длинах полипептидов XTEN также вносит вклад в получение неструктурированную конформацию этого полимера, которая, в свою очередь, может привести к эффективному увеличению гидродинамическго радиуса. В предпочтительных осуществлениях отрицательный заряд предлагаемого полипептида XTEN обеспечивается внедрением остатков глутаминовой кислоты. Как правило, остатки глутаминовой кислоты располагаются однородно вдоль XTEN-последовательности. В некоторых случаях, полипептид XTEN может содержать около 10-80, или около 15-60, или около 20-50 остатков глутаминовой кислоты на 20 кДа полипептида XTEN, что может обеспечить получение полипептидов XTEN с заряженными остатками, которые имеют очень подобные значения pKa, что может повысить гомогенность заряда препарата и сузить его изоэлектрическую точку, улучшить физико-химические свойства получаемого продукта XTEN-нагрузочное вещество для того, чтобы, таким образом, упростить процедуры очистки. Например, если требуется получить полипептид XTEN с отрицательным зарядом, последовательность XTEN может быть выбрана полностью из семейства последовательностей AE, в которых около 17% суммарного заряда обеспечивается благодаря включению глутаминовой кислоты, или могут быть включены разные пропорции мотивов, содержащих глутаминовую кислоту из Таблицы 1 для обеспечения требуемой степени суммарного заряда. Не ограничивающие примеры последовательностей AE XTEN, включают, но не ограничивают использование последовательностей AE36, AE42, AE144, AE288, AE432, AE576, AE624, AE864 и AE912 из Таблиц 2 и 21 или их фрагменты. В одном варианте реализации XTEN-последовательность из Таблиц 2 или 3 может быть модифицирована для включения дополнительных остатков глутаминовой кислоты для достижение требуемого отрицательного суммарного заряда. Соответственно, в одном

осуществлении данное изобретение предлагает полипептид XTEN, в котором XTEN-последовательности содержат около 1%, 2%, 4%, 8%, 10%, 15%, 17%, 20%, 25% или даже около 30% глутаминовой кислоты. В некоторых случаях, полипептид XTEN может содержать около 10-80, или около 15-60, или около 20-50 остатков глутаминовой кислоты на 20 кДа полипептида XTEN, что может обеспечить получение полипептидов XTEN с заряженными остатками, которые имеют очень подобные значения pKa, что может повысить гомогенность заряда препарата и сузить его изоэлектрическую точку, улучшить физико-химические свойства получаемой конъюгационной композиции полипептида XTEN для того, чтобы, таким образом, упростить процедуры очистки. В одном варианте в данном изобретении для достижения отрицательного суммарного заряда в дополнение к глутаминовой кислоте предусмотрено включение в полипептид XTEN до 5% остатков аспарагиновой кислоты.

[00247] Без связи с определенной теорией полипептид XTEN в конъюгатах XTEN-нагрузочное вещество с большим отрицательным суммарным зарядом, как ожидается, обладает меньшим неспецифическим взаимодействием с различными отрицательно-заряженными поверхностями, такими как кровеносные сосуды, ткани или различные рецепторы, что может вносить дополнительный вклад в снижение активного выведения препарата. И наоборот, считается, что полипептид XTEN конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество с низким (или отсутствующим) суммарным зарядом будет обладать высокой степенью взаимодействия с поверхностями, которые могут потенциировать активность присоединенного конъюгата в сосудистой системе или тканях.

[00248] В других осуществлениях, где требуется отсутствие суммарного заряда, полипептид XTEN может быть выбран, к примеру, из компонентов XTEN AG, таких как мотивы AG из Таблицы 1, или тех мотивов AM из Таблицы 1, у которых нет заряда. Не ограничивающие примеры последовательностей AG XTEN, включают, но не ограничивают использование последовательностей семейств AG 36, 42, 144, 288, 576 и 864 из Таблиц 2 и 22 или их фрагментов. В другом варианте полипептид XTEN может включать варьирующие пропорции мотивов AE и AG для того, чтобы получить суммарный заряд, который считается оптимальным для данного использования или для поддержания данного физико-химического свойства.

[00249] Конъюгаты полипептидов XTEN настоящего изобретения не содержат или имеют низкое содержание положительно заряженных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид XTEN может содержать меньше чем 10% аминокислотных остатков с положительным зарядом, или меньше чем около 7%, или меньше чем около 5%, или меньше чем около 2%, или меньше чем около 1% аминокислотных остатков с положительным зарядом. Тем не менее, данное изобретение предусматривает конструкции, в которых определенное количество аминокислот с положительным зарядом, таких как лизин, внедрены в

полипептид XTEN для обеспечения конъюгации между эпсилон-аминогруппой лизина и реакционно-способной группы нагрузочного вещества или кросс-линкера, которые должны присоединяться к остову молекулы XTEN. В одном варианте осуществления вышеуказанный полипептид XTEN предложенных конъюгатов содержит от около 1 до около 100 лизиновых остатков, или от около 1 до около 70 лизиновых остатков, или от около 1 до около 50 лизиновых остатков, или от около 1 до около 30 лизиновых остатков, или от около 1 до около 20 лизиновых остатков, или от около 1 до около 10 лизиновых остатков, или от около 1 до около 5 лизиновых остатков, или от около 1 до около 3 лизиновых остатков или в другом варианте только один лизиновый остаток. С использованием вышеуказанных лизинсодержащих полипетидов XTEN, могут быть сконструированы конъюгаты, которые включают полипетид XTEN, необязательный линкер плюс нагрузочное вещество, пригодное для лечения болезненного состояния пациента, при этом максимальное количество молекул агента нагрузочного вещества присоединяется к XTEN-компоненту по определенному количеству остатков лизина с реакционно-способной боковой группой (например, концевой амин), внедренных в полипептид XTEN.

7. Низкая иммуногенность

[00250] В другом аспекте в данном изобретении предлагаются композиции полипептидов XTEN, обладающие низкой степенью иммуногенности или являющиеся в основном неиммуногенными. Не низкую иммуногенность полипептида XTEN могут влиять несколько факторов, например, неповторяющаяся последовательность, неструктурированная конформация, высокая степень растворимости, низкая степень или отсутствие самоагрегации, низкое содержание или отсутствие протеолитических сайтов в пределах последовательности и низкое содержание или отсутствие эпитопов в XTEN-последовательности.

[00251] Конформационные эпитопы формируются участками поверхности белка, которая состоит из множественных непрерывных последовательностей аминокислот белкового антигена. Точный фолдинг этого белка приводит эти последовательности к образованию четко-выраженных стабильных пространственных конфигураций или эпитопов, которые могут распознаваться как “чужеродные” гуморальной иммунной системой хозяина, приводя к образованию антител к этому белку или активизации клеточно-опосредованного иммунного ответа. В последнем случае, у индивида иммунный ответ к белку находится под сильным влиянием распознавания эпитопа Т-клетками, которое является функцией от специфичности связывания этого пептида с аллотипом рецепторов HLA-DR индивида. Вовлечение пептидного комплекса MHC II класса с помощью рецептора распознавания Т-клеток на поверхности Т-клеток вместе с перекрестным связыванием определенных других корецепторов, таких как молекула CD4, может индуцировать активированное состояние у Т-клеток. Активация ведет к

высвобождению цитокинов других лимфоцитов, таких как В-клетки, синтезирующие антитела, или активации Т-клеток киллеров, как полное проявление клеточного иммунного ответа.

[00252] Способность пептида связываться с данной молекулой MHC II класса для презентации на поверхности АПК (антиген-презентирующей клетки) зависит от нескольких факторов; наиболее заметно участие его первичной последовательности. В одном варианте осуществления более низкая степень иммуногенности достигается конструированием XTEN-последовательностей, которые устойчивы к процессированию в антиген-презентирующих клетках, и/или выбором последовательностей, которые не связываются легко с рецепторами MHC. В данном изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, XTEN-кросс-линкер и XTEN-реактант клик-химии с в основном неповторяющимися полипептидами XTEN, сконструированными для снижения связывания с рецепторами MHC II класса, а также устранения образования эпитопов для рецепторов Т-клеток или связывания антител, что приводит к низкой степени иммуногенности этих конъюгатов. Устранение иммуногенности может объясняться, по меньшей мере частично, следствием конформационной гибкости XTEN-последовательностей; например, отсутствием вторичной структуры, благодаря выбору и порядку аминокислотных остатков. Например, особым интересом пользуются последовательности, обладающие слабой склонностью принимать в водных растворах или в физиологических условиях компактные свернутые конформации, которые могут приводить к образованию конформационных эпитопов. Введение полипептидов, содержащих XTEN, применяя традиционные терапевтические способы и дозировки, обычно не приведут к образованию нейтрализующих антител к XTEN-последовательностям и также понизят иммуногенность нагрузочных веществ в данных конъюгатах.

[00253] В одном варианте осуществления XTEN-последовательности, используемые у предложенного полипептида, могут в основном быть свободными от эпитопов, распознаваемых Т-клетками человека. Удаление таких эпитопов с целью создания менее иммуногенных белков было раскрыто ранее; смотрите, к примеру, WO 98/52976, WO 02/079232 и WO 00/3317, которые включены в данный документ посредством ссылки. Assays for human T cell epitopes have been described (Stickler, M., *et al.* (2003) *J Immunol Methods*, 281: 95-108). Особый интерес представляют последовательности пептидов, которые могут быть олигомеризованы без получения эпитопов Т-клеток или несвойственных человеческому организму последовательностей. Это достигается испытанием прямых повторностей таких последовательностей на наличие Т-клеточных эпитопов и на встречаемость 6-15-мерных и, особенно, 9-мерных последовательностей несвойственных человеческому организму, с последующим изменением структуры XTEN-последовательностей для удаления или разрушения последовательности эпитопов. В некоторых вариантах осуществления XTEN-

последовательности являются в основном не-иммуногенными, благодаря ограничению количества эпитопов полипептида XTEN, для которых предсказана возможность связывания рецепторов MHC. Со снижением количества эпитопов, способных связывать рецепторы MHC, появляется сопутствующее снижение потенциала активации Т-клеток, а также функционирование Т-клеточных хелперов, снижение активизации В-клеток или повышенной экспрессии и ослабление образования антител. Низкая степень рассчитанных Т-клеточных эпитопов может быть определена алгоритмами вычисления эпитопов таких как, например, TEPITOPE (Sturniolo, T., *et al.* (1999) Nat Biotechnol, 17: 555-61), как показано в Примере 46. Число TEPITOPE для данной области пептида в пределах белка является значением log K_d (константа диссоциации, аффинности, скорости диссоциации) связывания такого участка пептида с множеством наиболее встречаемых аллелей MHC человека, как показано в публикации Sturniolo, T. *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17:555). Эти числа находятся в диапазоне по меньшей мере 20 log, от около 10 до около -10 (соответствует константам связывания от $10e^{10}$ K_d до $10e^{-10}$ K_d), и могут быть снижены удалением гидрофобных аминокислот, которые служат анкерными остатками во время представления пептидов комплексам MHC, таким как M, I, L, V, F. В некоторых вариантах, XTEN-компонент, встроенный в конъюгат XTEN-нагрузочное вещество, XTEN-кросс-линкер или XTEN-реактант клик-химии, не несет рассчитанный Т-клеточный эпитоп при пороговом значении числа TEPITOPE около -5, или -6, или -7, или -8, или -9, или при числе TEPITOPE равном -10. Как используется в данном тексте число "-9" является более ограничивающим пороговым значением TEPITOPE, чем число равное -5.

8. Увеличенный гидродинамический радиус

[00254] В другом аспекте, предложенный полипептид XTEN, применяемый как участник гибридизации, имеет большой гидродинамический радиус; это свойство, которое обеспечивает соответственное увеличение кажущейся молекулярной массы композиции XTEN-нагрузочное вещество по сравнению с нагрузочным веществом без полипептида XTEN. Как подробно объясняется в Примере 26, связывание XTEN с последовательностями лечебных белков приводит к получению композиций, которые могут иметь увеличенные гидродинамические радиусы, увеличенные кажущиеся молекулярные массы и увеличенный кажущийся коэффициент молекулярной массы по сравнению с лечебным белком не связанный с полипептидом XTEN. Например терапевтические применения, в которых требуется пролонгированный период полувыведения, композиций, в которых один или большее количество полипептидов XTEN с большим гидродинамическим радиусом присоединены к нагрузочному веществу, могут существенно увеличить гидродинамический радиус этого конъюгата с превышением гломерулярной поры размером около 3-5 нм (соответствует

кажущейся молекулярной массе около 70 кДа) (Caliceti. Sci. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277), что приводит к пониженному почечному выведению циркулирующих белков с соответствующим увеличением конечного периода выведения и другим улучшениям фармакокинетических свойств. Гидродинамический радиус белка обеспечивается его молекулярной массой, а также его структурой, включающей форму или компактность. Без связи с определенной теорией полипептид XTEN может принимать открытые конформации из-за электростатического отталкивания между отдельными зарядами внедренных заряженных остатков полипептида XTEN, а также из-за присущей гибкости, обусловленной определенными аминокислотами в последовательности с недостаточным потенциалом для появления вторичной структуры. Открытая, расширенная и неструктурированная конформация полипептида XTEN обладает большим пропорциональным гидродинамическим радиусом по сравнению с полипептидами со сравнимыми длинами последовательностей и/или молекулярными массами, которые имеют вторичную или четвертичную структуры, такие как обычные глобулярные белки. Методы определения гидродинамических радиусов хорошо известны в этой области знаний, такие как методы с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ), описанные в патентах США №№ 6 406 632 и 7 294 513. Пример 26 показывает, что увеличение длины полипептида XTEN приводит к пропорциональному увеличению гидродинамического радиуса, кажущейся молекулярной массы и/или коэффициент молекулярной массы и таким образом дает возможность направить полипептид XTEN-нагрузочное вещество к желаемому снижению значений кажущихся молекулярных масс и гидродинамических радиусов. Соответственно, в некоторых вариантах, полипептид XTEN-нагрузочное вещество может быть сконфигурирован с полипептидом XTEN так чтобы получаемый конъюгат мог обладать гидродинамическим радиусом по меньшей мере около 5 нм, или по меньшей мере около 8 нм, или по меньшей мере около 10 нм, или около 12 нм, или около 15 нм, или около 20 нм, или около 30 нм или больше. В вышеуказанных осуществлениях большой гидродинамический радиус, присущий полипептидам XTEN в конъюгате XTEN-нагрузочное вещество, может вести к пониженному клиренсу получаемого конъюгата, увеличению конечного периода полувыведения и увеличению среднего времени удержания. Как описано в примерах, когда молекулярные массы XTEN-содержащих композиций являются производными от результатов анализа эксклюзивной хроматографии, открытая конформация полипептида XTEN из-за низкой степени вторичной структуры приводит к увеличению кажущейся молекулярной массы конъюгатов, в которые они введены. В одном варианте осуществления в данном изобретении применяется открытие, в котором увеличение кажущейся молекулярной массы может достигаться присоединением не только одного полипептида XTEN

заанной длины, но также присоединением 2, 3, 4 или более полипептидов XTEN пропорционально более коротких длин, в линейном виде или в виде тримерной или тетрамерной разветвленной конфигурации, как более полно описано ниже. В некоторых вариантах осуществления полипептид XTEN, включающий нагрузочное вещество и один или большее количество полипептидов XTEN, выявляет кажущуюся молекулярную массу по меньшей мере около 400 кДа, или по меньшей мере около 500 кДа, или по меньшей мере около 700 кДа, или по меньшей мере около 1000 кДа, или по меньшей мере около 1400 кДа, или по меньшей мере около 1600 кДа, или по меньшей мере около 1800 кДа, или по меньшей мере около 2000 кДа. Соответственно, конъюгат XTEN-нагрузочное вещество выявляет кажущуюся молекулярную массу, которая является в около 1,3 раза больше, или около 2 раза больше, или около 3 раза больше или около 4 раза больше, или около 8 раз больше, или около 10 раз больше, или около 12 раз больше, или около 15 раз больше, или в около 20 раз больше чем действительная молекулярная масса этого конъюгата. В одном варианте изолированный конъюгат XTEN-нагрузочное вещество любого из осуществлений, раскрытых в данном тексте, выявляет коэффициент кажущейся молекулярной массы в физиологических условиях больше чем около 1,3, или около 2, или около 3, или около 4, или около 5, или около 6, или около 7, или около 8, или около 10, или больше чем около 15. В другом варианте осуществления полипептид XTEN-нагрузочное вещество в физиологических условиях коэффициент кажущейся молекулярной массы составляет от около 3 до около 20, или от около 5 до около 15, или от около 8 до около 12, или от около 9 до около 10 относительно действительной молекулярной массы этого конъюгата. В общем, увеличенная кажущаяся молекулярная масса предложенных конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество улучшает фармакокинетические свойства композиции путем сочетания факторов, которые включают пониженный активный клиренс, пониженное почечное выведение и пониженные потери при прохождении через капиллярные и венозные соединения.

9. Композиции и способы очистки полипепидов XTEN как в основном гомогенных препаратов

[00255] Объектом данного изобретения является предложение композиций полипептидов XTEN и способов получения препаратов, содержащих полипептиды XTEN с высокой степенью чистоты и однородности по длине и составу описанных в данном тексте полипептидов XTEN.

[00256] Экспрессия рекомбинантного белка XTEN или рекомбинантного белка слияния, содержащего полипепид XTEN, в клетке хозяине обычно как любого глобулярного белка приводит к получению смеси различных веществ, в которой часть белков представлены в виде укороченных версий требуемой длины белка. Эта укорачивание может быть результатом ранней терминации трансляции, нестабильность мРНК или протеолиза в клетке хозяине. Из-за

того, что глобулярные белки обычно эффективно и полностью сворачиваются в свои трехмерные структуры, тогда как укороченные версии – нет, обычные процессы очистки и выделения способны успешно разделять и удалять укороченные версии таким образом, что в данном препарате глобулярных белков достигается высокий уровень гомогенности продукта. Тем не менее, белковые полимеры, такие как полипептиды XTEN, уникальны тем, что в их заданной неструктурированной сущности обычно недостает трехмерных структур. Поэтому из-за одного или более вышеупомянутых причин получение гомогенного препарата полноразмерных полипептидов XTEN является трудной задачей. Это происходит потому, что неполные или укороченные цепи XTEN только слегка отличаются по своим физико-химическим свойствам от требуемых полноразмерных последовательностей, так что традиционные процессы, которые были бы достаточными для очистки глобулярных белков, не эффективны для удаления укороченных полипептидов XTEN от продукта экспрессии для того, чтобы получить в основном гомогенный препарат из полноразмерных последовательностей. Несмотря на то, что предложенный полипептид XTEN этого изобретения, включая полипептид XTEN присоединенный к нагрузочному веществу, может быть очищен до среднего уровня гомогенности традиционными методами, используемыми для белков, такими как: высаливание, ионобменная хроматография, эксклюзионная хроматография, хроматография с помощью адсорбции на гидроксиаппатите, хроматография с гидрофобным взаимодействием или гель-электрофорез, такие методы сами по себе не приводят к получению препаратов, в которых полипептиды XTEN в в основном гомогенны по длине последовательностей.

[00257] Предложенные способы, представленные в данном тексте, позволяют получать в основном гомогенный препарат полипептидов XTEN посредством одной или нескольких простых стадий очистки. В одном варианте осуществления при практическом применении какого-либо из таких способов настоящего изобретения может использоваться полипептид XTEN, сконструированный для дальнейшего включения, в виде елка слияния, аффинных маркеров, расположенных на одном или на обоих N- и C-концах этого полипептида XTEN так, что продукт экспрессии может стать объектом для методов очистки для селективного захвата полноразмерного экспрессированного полипептида, при этом удаляются фрагментированные побочные продукты полипептида XTEN (смотрите ФИГ. 41-42). Не ограничивающие примеры аффинных маркеров, которые могут быть добавлены к концам полипептида XTEN, представлены в Таблице 7. Не ограничивающие примеры способов конструирования, экспрессии и методов очистки для получения в основном гомогенных полипептидов XTEN, описаны в примерах.

[00258] В некоторых осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом XTEN, связанным непосредственно с

одним аффинным маркером (таким как, но не ограничиваясь маркерами из Таблицы 7), соединенном с N- или С-концом полипептида XTEN. В других осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом XTEN, связанным с одним аффинным маркером (таким как, но не ограничиваясь маркерами из Таблицы 7) через расщепляемую последовательность, соединенную с N- или С-концом полипептида XTEN. В других осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом XTEN, связанным непосредственно с одним или двумя различными аффинными маркерами (такими как, но не ограничиваясь маркерами из Таблицы 7), соединенными с N- и/или С-концом полипептида XTEN, как показано на ФИГ. 41. В других осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом XTEN, связанным с одной или двумя расщепляемыми последовательностями (такими как, но не ограничиваясь расщепляемыми последовательностями из Таблицы 8 или 9), каждая из которых, в свою очередь, соединена с различными аффинными маркерами (таким как, но не ограничиваясь маркерами из Таблицы 7), соединенными с N- или С-концом или обоими N- или С-концами полипептида XTEN, как показано на ФИГ. 41. В еще одних осуществлениях в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептидные композиции с полипептидом XTEN, связанным непосредственно с одним или двумя различными аффинными маркерами (такими как, но не ограничиваясь маркерами из Таблицы 7), соединенными с N- и/или С-концом полипептида XTEN, которые дополнительно включают вспомогательную последовательность (такую как, но не ограничиваясь последовательностями из Таблицы 12), соединенную с N-концом этого белка. Как используется в контексте описанных в данном тексте белков, термин “в основном гомогенный” обозначает, что по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже больше полипептидных последовательностей имеют идентичную длину последовательностей. Эти процентные значения основаны на процентном значении площади на хроматограмме препарата, проанализированного с помощью ВЭЖХ или процентном значении площади сканирования препарата, проанализированного с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН или с помощью других таких стандартных методик, известных в этой области, для оценивания чистоты белков.

[00259] В одном варианте осуществления в данном изобретении предложен в основном гомогенный полипептид, обладающий конфигурацией формулы I:

(HS)-(AT1)-(CS1)-(XTEN) I

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

[00260] В другом варианте осуществления в данном изобретении предложен в основном гомогенный полипептид, обладающий конфигурацией формулы II:

(HS)-(CS1)-(XTEN)-(CS2)-(AT1) II

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

[00261] В другом варианте осуществления, эта композиция обладает конфигурацией формулы III:

(HS)-(AT1)-(CS1)-(XTEN)-(CS2)-(AT2) III

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

[00262] Полипептидные конструкции, включающие аффинные маркеры, обладают преимущественным свойством по сравнению с полипептидом XTEN, не связанным с аффинными маркерами, что дает возможность очищать их до в основном гомогенной длины последовательностей путем использования хроматографических носителей, с которыми соединены аффинные маркеры. В некоторых осуществлениях классы хроматографических носителей, используемых в данном способе очистки, выбираются из хроматографических носителей, отраженных в Таблице 7, которые используются для очистки полипептидов XTEN, связанных с соответственно указанными в таблицах аффинными маркерами. Специалистом в этой области знаний будет отмечено, что классы хроматографических носителей могут охватывать различные химические группы, присоединенные к разным носителям или смолам; например, анионобменные носители содержат четвертичные триметиламмониевые и диэтиламиноэтильные группы, связанные со смолами, катионобменные носители содержат сульфо-, сульфопропил-, карбоксиметил- или фосфатные группы, связанные со смолами, носители для хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (HIC) содержат этил, изопропил, бутил, фенил или октил группы, связанные со смолами, и носители для IMAC-хроматографии содержат группы иминодиуксусной и нитрилуксусной кислот, связанные со смолами. Вышеуказанные носители перечислены в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения сферы носителей, которые могут применяться при практическом применении этого изобретения.

[00263] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены в основном гомогенные полипептиды XTEN, полученные из полипептидов, содержащих полипептид XTEN, связанный с первым или первым и вторым афинным маркером через расщепляемые последовательности (такие как, не ограничиваясь расщепляемыми последовательностями из Таблицы 8) способные расщепляться протеазой, при этом этот препарат обрабатывается протеазой для разрушения расщепляемых последовательностей, чтобы высвободить из полученного полипептида полипептид XTEN, с последующим проведением стадии хроматографии для связывания и последующего элюирования с дальнейшим выделением в основном гомогенного полипептида XTEN. В одном варианте вышеуказанного осуществления эта протеаза является трипсином и данные расщепляемые последовательности способны разрушаться трипсином, не ограничивающие примеры перечислены в Таблицах 11 и 15. В другом варианте вышеуказанного осуществления эта протеаза является протеазой TEV и данные расщепляемые последовательности способны разрушаться протеазой TEV. В другом варианте вышеуказанного осуществления разрушенный полипептид XTEN очищается связыванием на хроматографическом носителе MacoCap SP с последующим элюированием солевым или буферным раствором, таким как, но не ограничиваясь, фосфата натрия/NaCl, обеспечивая получение в основном гомогенного полипептида XTEN. Как используется в контексте полипептидов XTEN и/или полипептидов, содержащих последовательность XTEN, сочетание “в основном очищенный” препарат обозначает, что по меньшей мере около 85%, и предпочтительнее по меньшей мере около 90%, и предпочтительнее по меньшей мере около 91%, и предпочтительнее по меньшей мере около 92%, и предпочтительнее по меньшей мере около 93%, и предпочтительнее по меньшей мере около 94%, и предпочтительнее по меньшей мере около 95% или больше отдельных молекул данного препарата имеют идентичную длину последовательностей; другими словами одно и то же количество аминокислот. Методы, которые могут быть использованы для определения гомогенности длины последовательности включают масс-спектроскопию, эксклюзионную хроматографию/ВЭЖХ или электрофорез в ПААГ с ДСН с последующим окрашиванием серебром; эти методе могут применяться по отдельности или вместе для количественного определения степени гомогенности. Обобщенная схема для очищения полипептидов, содержащих полипептиды XTEN с последовательностями аффинных маркеров, оптимизированными для очистки, показаны на ФИГ. 41-42. После очистки маркеры могут протеолитически отщепляться (ФИГ. 41B) или сохраняться с полипептидами (ФИГ. 41C). Полипептиды XTEN могут быть очищены от загрязняющих веществ благодаря уникальному аминокислотному составу полипептида XTEN, как показано на ФИГ. 42.

[00264] В одном варианте осуществления в данном изобретении предложен способ получения в основном очищенного препарата полипептида, содержащего XTEN, включающего стадии: конструирования гена, кодирующего полипептид XTEN и первый аффинный маркер, создавая вектор экспрессии, пригодный для трансформации клетки хозяина, содержащей функционально связанные с контролирующими последовательностями кодирующие гены, трансформирования клетки хозяина этим вектором экспрессии, культивирования клетки хозяина в условиях, подходящих для экспрессии полипептида XTEN с присоединенным аффинным маркером, введения неочищенного продукта экспрессии в процесс очистки, который включает стадию аффинной очистки, при котором неочищенный продукт экспрессии наносится на первый хроматографический носитель, селективно связывающий первый аффинный маркер, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования удерживаемого белка в подходящих условиях и выделения элюата, при этом получается выделенный полипептид в основном гомогенный по длине. В другом варианте осуществления в данном изобретении предложен способ получения в основном гомогенного препарата полипептида, содержащего XTEN, включающего стадии: конструирования гена, кодирующего полипептид XTEN, содержащий первый и второй аффинный маркер, создавая вектор экспрессии, пригодный для трансформации клетки хозяина, содержащей функционально связанные с контролирующими последовательностями кодирующие гены, трансформирования клетки хозяина этим вектором экспрессии, культивирования клетки хозяина в условиях, подходящих для экспрессии этого полипептида, введения неочищенного продукта экспрессии в процесс очистки, который включает стадию аффинной очистки, при котором неочищенный продукт экспрессии наносится на первый хроматографический носитель, селективно связывающий первый аффинный маркер, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования удерживаемого белка в подходящих условиях и выделения элюата, нанесения выделенного полипептида на второй хроматографический носитель в условиях, эффективных для захватывания этого полипептида со вторым аффинным маркером хроматографическим носителем, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования полипептида XTEN в условиях, эффективных для элюирования полипептида XTEN со вторым аффинным маркером, выделения элюата, содержащего полипептид, включающий полипептид XTEN с первым и вторым аффинным маркером, при этом получается выделенный полипептид в основном гомогенный по длине. В еще одном варианте осуществления в данном изобретении предложен способ получения в основном гомогенного препарата полипептида, содержащего XTEN, включающего стадии: конструирования гена, кодирующего полипептид XTEN,

содержащий первый аффинный маркер, присоединенный расщепляемой последовательностью к N-концу кодирующей последовательности XTEN, и второй аффинный маркер, присоединенный расщепляемой последовательностью к С-концу кодирующей последовательности XTEN, создавая вектор экспрессии, пригодный для трансформации клетки хозяина, содержащей функционально связанные с контролирующими последовательностями кодирующие гены, трансформирования клетки хозяина этим вектором экспрессии, культивирования клетки хозяина в условиях, подходящих для экспрессии этого полипептида, введения неочищенного продукта экспрессии в процесс очистки, который включает стадию аффинной очистки, при котором неочищенный продукт экспрессии наносится на первый хроматографический носитель, селективно связывающий первый аффинный маркер, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования удерживаемого белка в подходящих условиях и выделения элюата, нанесения выделенного полипептида на второй хроматографический носитель в условиях, эффективных для захватывания этого полипептида со вторым аффинным маркером хроматографическим носителем, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования полипептида XTEN в условиях, эффективных для элюирования полипептида XTEN со вторым аффинным маркером, с последующей обработкой выделенного полипептида протеазой в условиях, эффективных для высвобождения полипептида XTEN из полученного полипептида и нанесения вещества на хроматографический носитель, способный к захватыванию полипептида XTEN, но не аффинных маркеров, промывания хроматографического носителя для элюирования вещества, не связанного с хроматографическим носителем, элюирования полипептида XTEN, выделения элюата, содержащего полипептид XTEN, при этом получается выделенный полипептид в основном гомогенный по длине. В одном варианте осуществления вышеуказанных способов, описанных в этом параграфе, первый и второй аффинные маркеры выбираются из группы аффинных маркеров, отраженных в Таблице 7. В одном осуществлении этого способа, первый аффинный маркер присоединен к полипептиду XTEN в виде гибридного белка, содержащего последовательность RPRPRPRPRPRPR, и используемый хроматографический носитель для связывания этого полипептида является носителем SP. В другом осуществлении вышеуказанных способов, первый аффинный маркер присоединен к первому концу полипептида XTEN в виде гибридного белка, содержащего последовательность RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, второй аффинный маркер присоединен ко второму концу полипептида XTEN, содержащего последовательность HHHHHHHH, первый хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем MacroCap SP, а второй хроматографический носитель, используемый для

связывания этого полипептида, является носителем для аффинной хроматографии с иммобилизованным металл-ионом (IMAC). В другом осуществлении вышеуказанных способов, первый аффинный маркер связан с расщепляемой последовательностью, присоединенной к первому концу полипептида XTEN в виде гибридного белка, содержащего последовательность RPRPRPRPRPRPR или RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPR, второй аффинный маркер присоединен к расщепляемой последовательности ко второму концу полипептида XTEN, содержащего последовательность HHHHHH или HHHHHHHH, первый хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем MacroCap SP, второй хроматографический носитель, используемый для связывания этого полипептида, является носителем для аффинной хроматографии с иммобилизованным металл-ионом (IMAC), расщепляемые последовательности содержат аргинин или лизин (включая, но не ограничиваясь, последовательностями из Таблиц 8 и 9) и разрушаются трипсином, а носитель Macrocap Q является хроматографическим носителем, используемым для связывания полипептида XTEN, высвобожденного от аффинных маркеров или, в альтернативном варианте, высвобожденный полипептид XTEN захватывается как элюат, прохождением препарата, обработанного протеазами, через одну или большее количество катионообменных, HIC и/или IMAC-носителей для захватывания продуктов расщепления и протеазы, оставляя в элюате полипептид XTEN, который после выделения остается в основном гомогенным препаратом.

[00265] Специалистом в данной области будет отмечено, что порядок и особые условия проведения стадий этого способа будут варьировать в зависимости от композиции полипептида XTEN-аффинный маркер, а также от начального уровня экспрессии и степени загрязнения фрагментированными полипептидами. Например, для определенных композиций XTEN, использование одного аффинного маркера, присоединенного к полипептиду XTEN, будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине. В таких случаях в одном варианте осуществления один аффинный маркер выбирается из группы, состоящей из аффинных маркеров, отраженных в Таблице 7. С другими композициями XTEN использование первого и второго аффинного маркера будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине, и в таких случаях, в одном осуществлении первый и второй аффинные маркеры различаются и каждый из них выбирается из аффинных маркеров, отраженных в Таблице 7. Специалистом в данной области знаний будет отмечено, что порядок и особые условия проведения стадий этого способа будут варьировать в зависимости от композиции полипептида XTEN-аффинный маркер, а также от начального уровня экспрессии и степени загрязнения фрагментированными полипептидами. Например, для определенных композиций XTEN, использование одного аффинного маркера, присоединенного к полипептиду XTEN, будет

достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине. В таких случаях в одном варианте осуществления один аффинный маркер выбирается из группы, состоящей из аффинных маркеров, отраженных в Таблице 7. С другими композициями XTEN использование первого и второго аффинного маркера будет достаточным для получения препарата, в котором полипептидные молекулы в основном гомогенны по длине, и в таких случаях, в одном осуществлении первый и второй аффинные маркеры различаются и каждый из них выбирается из аффинных маркеров, отраженных в Таблице 7. Специалистом в данной области дополнительно будет отмечено, что как только эти полипептиды, содержащие последовательности расщепления будут очищены, выделенный полипептид может впоследствии быть обработан с целью протеолиза для высвобождения одного или двух аффинных маркеров, с последующим пропусканием обработанного полипептида XTEN через хроматографический носитель для выделения полипептида XTEN без присоединенных аффинных маркеров. Схематически этот способ показан на ФИГ. 42 и приводимые в качестве примера методики описаны в Примерах. Множество различных протеаз может использоваться для удаления концевых маркеров для очистки в зависимости от последовательности, присоединенной аффинным маркером к полипептиду XTEN, включая, но не ограничиваясь протеазами, выбранными в Таблице 9. В одном варианте осуществления эти протеазы выбираются из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина, протеазы вируса гравировки табака (TEV), фактора FXa и энтерокиназы. В другом варианте осуществления расщепляемая последовательность встраивается в полипептид, содержащий аргининовые остатки, которые могут быть разрушены и аффинный маркер удален обработкой трипсином, таким образом высвобождая полипептид XTEN, который впоследствии выделяется в в основном в очищенной форме с помощью хроматографии, такой как улавливание анионобменным носителем (включая, но не ограничиваясь, носителем MacroCap Q) или выделением в виде элюата, при этом продукты расщепления, не содержащие последовательность XTEN и протеазу, захватыванием носителями HIC, катионобменной или IMAC-хроматографии, получая в элюате в основном гомогенный полипептид XTEN.

Таблица 7: Классы аффинных маркеров и хроматографических носителей, которые связывают аффинные маркеры

Аминокислотная последовательность аффинных маркеров	Хроматографический носитель
LYPYPYP, LYYYPP, WPWP, FPFPFP	HIC
$(Y)_n$, $(W)_n$, $(YP)_n$, $(WP)_n$, $(FP)_n$, $(LP)_n$ c n=3-20	HIC
$(RP)_n$, $(KP)_n$, $(HP)_n$, $(H)_n$, $(R)_n$ c n=3-20	Катионобменный, IMAC
$(E)_n$, $(D)_n$, $(ED)_n$, $(EP)_n$, $(DP)_n$ c n=3-20	Анионобменный
RPRPRPRPRP	Катионобменный
RPRPRPRPRPGR	Катионобменный

RPRPRPRPRPRP	Катионобменный
RPRPRPRPRPRPGR	Катионобменный
KPKPKPKP	Катионобменный
KPKPKPKPGR	Катионобменный
RPRPRPRPRPRPRPRP	Катионобменный
RPRPRPRPRPRPRPRPGR	Катионобменный
RPRPRPRPRPRPRPRPRP	Катионобменный
RPRPRPRPRPRPRPRPRPGR	Катионобменный
RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRP	Катионобменный
RPRPKPRPKPRPKPRPKP	Катионобменный
PRPKPRPKPRPKPRPKPGR	Катионобменный
RPRPKPRPKPRPKPRPKPRPKP	Катионобменный
RPRPKPRPKPRPKPRPKPRPKPGR	Катионобменный
GSPYGYPYSYS, GSPWGSPTSTE, GSPAGSPTSTE,	HIC
GSPXGXPXSXS, GSPSGXPXSXS, GSPSGTPXSXS, где X = Ile, Leu, Val, Phe, Trp или Тир	HIC
GSPXGXPXSXS, GSPSGXPXSXS, GSPSGTPXSXS, где X = Arg, Lys или His	Катионобменный, IMAC
HHHHHH, HHHHHHHH	IMAC
STRPSRRSRRG, STRRGTRRGTRRG,	Катионобменный
STRPSRGRARG, STRPSRRARG, STRPSRRRRG,	Катионобменный
STEPSEESEEG, STEEGTEEGTEEG,	Анионобменный
STEPSEGEAEG, STEPSEEAEG, STEPSEEEEG,	Анионобменный

Таблица 8: Последовательности, расщепляемые трипсином

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

* X = любая L-аминокислота, отличная от пролина

Таблица 9: Протеазы и расщепляемые протеазами последовательности

Протеаза, действующая на последовательность	Примерные расщепляемые последовательности	Расщепляемые последовательности*
FXIa	KLTR↓AET	KD/FL/T/R/VA/VE/GT/GV
FXIa	DFTR↓VVG	KD/FL/T/R/VA/VE/GT/GV
FXIIa	TMTR↓IVGG	
Калликреин	SPFR↓STGG	-/-/FL/RY/SR/RT/-/-
FVIIa	LQVR↓IVGG	
FIXa	PLGR↓IVGG	-/-/G/R/-/-/-/-
FXa	IEGR↓TVGG	IA/E/GFP/R/STI/VFS/-/G

FIIa (тромбин)	LTPR↓SLLV	-/-/PLA/R/SAG/-/-/-
Эластаза-2	LGPV↓SGVP	-/-/-/VIAT/-/-/-/-
Гранизим-B	VAGD↓SLEE	V/-/-/D/-/-/-/-
MMP-12	GPAG↓LGGA	G/PA/-/G/L/-/G/-
MMP-13	GPAG↓LRGA	G/P/-/G/L/-/GA/-
MMP-17	APLG↓LRLR	-/PS/-/-/LQ/-/LT/-
MMP-20	PALP↓LVAQ	
TEV	ENLYFQ↓G	ENLYFQ/G/S
Энтерокиназа	DDDK↓IVGG	DDDK/IVGG
Protease 3C (PreScission™)	LEVLFQ↓GP	LEVLFQ/GP
Сортаза A	LPKT↓GSES	L/P/KEAD/T/G/-/EKS/S
Трипсин	K↓X** или R↓X	K/X или R/X
Трипсин	R↓X**	SASRSA

↓указывает сайт расщепления
* Перечень множества аминокислот до, между, или после, косая черта указывает на альтернативные аминокислоты, которые могут быть замещены в этом положении; “-“ указывает, что любая аминокислота может быть замещена соответствующей аминокислотой, показанной в середине столбца.
** X – любая L-аминокислота, отличная от пролина

[00266] В другом варианте осуществления, полипептид XTEN может быть сконструирован так, что один или оба аффинных маркера, соединенных с концами полипептида и используемых для облегчения очистки, могут сохранять часть конечного продукта, исключая требование применения стадии высвобождения протеазы. Если маркеры для очистки сконструированы, чтобы оставаться частью лекарственного вещества, то последовательности маркеров выбираются таким образом, чтобы не вызывать выраженного иммунного ответа. Иммуногенность может быть предсказана с помощью использования численных алгоритмов расчета или экспериментальными исследованиями. Предпочтительной является последовательность, из которой устранены эпитопы Т-клеток и В-клеток. Не ограничивающие примеры последовательностей, встраиваемых в коневые последовательности XTEN, которые облегчают захватывание при очистке и которые могут при желании оставаться связанными с конъюгированными конструкциями, представлены в Таблице 7.

10. Композиции для повышенной экспрессии полипептидов XTEN

[00267] В другом аспекте в данном изобретении предложены конструкции, содержащие последовательности полинуклеиновых кислот, кодирующих полипептид XTEN, и способы получения полипептида XTEN для использования в предложенных конъюгатах, в которых дополнительные кодирующие полинуклеотидные кодирующие вспомогательные последовательности добавляются к 5’-концу полинуклеотидов, кодирующих полипептид

XTEN, или добавляются к 5'-концу последовательностей, кодирующих аффинный маркер, присоединенный к 5'-концу последовательностей, кодирующих полипептид XTEN, и облегчают экспрессию полипептида XTEN или последовательности XTEN с расщепляемыми последовательностями, присоединенными к полипептидам аффинных маркеров в трансформированных клетках хозяина, таких как бактерии. Примеры таких последовательностей, кодирующих вспомогательные последовательности, приведены в Таблице 10 и в примерах. В одном варианте в данном изобретении предложена конструкция полинуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид, содержащий вспомогательную последовательность, обладающей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% идентичности с последовательностью, выбранной из Таблицы 10, присоединенной к N-концу первого аффинного маркера, выбранного из множества последовательностей, отраженных в Таблице 7, такого, что в свою очередь, является присоединенным к расщепляемой последовательности, описанной в данном тексте, или непосредственно N-концу последовательности XTEN, обладающей по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94% идентичностью последовательности, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% с последовательностью, выбранной из множества последовательностей, отраженных в Таблицах 2 и 3. В этом изобретении предложены векторы экспрессии, кодирующие конструкции, используемые для способов получения в основном гомогенных препаратов полипептидов и полипептидов XTEN с высокими уровнями экспрессии. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предлагает способы получения в основном гомогенных популяций полипептидов, включающих последовательности XTEN, первого и второго аффинного маркера и вспомогательную последовательность, этот способ включает культивирование в реакции ферментации клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN, первый и второй аффинный маркер в условиях эффективных для экспрессии полипептида, такие, что больше чем около 2 г/л, или больше чем около 3 г/л, или больше чем около 4 г/л, или больше чем около 5 г/л, или больше чем около 6 г/л, или больше чем около 7 грамм на литр (г/л) этого полипептида синтезируется как компонент неочищенного продукта экспрессии клетки хозяина, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 130 при длине волны 600 нм. В одном варианте осуществления этот способ дополнительно включает стадии: адсорбции данного полипептида на первом

хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения полипептида; адсорбции полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения в в основном гомогенного полипептидного препарата. В одном варианте вышеуказанного способа вектор дополнительно включает нуклеотиды, кодирующие вспомогательную последовательность на N-конце кодированного полипептида, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, отраженным в Таблице 10. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются способы получения в основном гомогенной популяции полипептидов, содержащих полипептид XTEN, первый и второй аффинный маркер и вспомогательную последовательность, этот способ включает культивирование клетки-хозяина в реакции ферментации, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и первый и второй аффинный маркер в условиях, эффективных для экспрессии этого полипептидного продукта в концентрации больше чем около 10 миллиграмм/грамм сухой массы клеток-хозяев (мг/г), или по меньшей мере около 250 микромоль/л, или около 300 микромоль/л, или около 350 микромоль/л, или около 400 микромоль/л, или около 450 микромоль/л, или около 500 микромоль/л упомянутого полипептида, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 130 при длине волны 600 нм. В одном вышеуказанном осуществлении этот способ дополнительно включает стадии: адсорбции данного полипептида на первом хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения полипептида; адсорбции полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения в в основном гомогенного полипептидного препарата. В одном варианте вышеуказанного способа вектор дополнительно включает нуклеотиды, кодирующие вспомогательную последовательность на N-конце кодированного полипептида, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностями, отраженными в Таблице 10. В другом варианте осуществления в данном изобретении предлагаются способы получения в основном гомогенной популяции полипептидов, содержащих полипептид XTEN, первый и второй аффинный маркер и вспомогательную последовательность, этот способ включает культивирование клетки-хозяина в реакции

ферментации, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий последовательность XTEN и первый и второй аффинный маркер в условиях, эффективных для экспрессии этого полипептидного продукта в концентрации больше чем около 10 миллиграммов/грамм сухой массы клеток-хозяев (мг/г), или по меньшей мере около 15 мг/г, или по меньшей мере около 20 мг/г, или по меньшей мере около 25 мг/г, или по меньшей мере около 30 мг/г, или по меньшей мере около 40 мг/г, или по меньшей мере около 50 мг/г упомянутого полипептида, когда реакция ферментации достигает оптической плотности по меньшей мере 130 при длине волны 600 нм. В одном вышеуказанном осуществлении этот способ дополнительно включает стадии: адсорбции данного полипептида на первом хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания первого аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения полипептида; адсорбции полипептида на втором хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания второго аффинного маркера полипептида хроматографическим носителем; элюирования полипептида и выделения в в основном гомогенного полипептидного препарата. В одном варианте вышеуказанного способа вектор дополнительно включает нуклеотиды, кодирующие вспомогательную последовательность на N-конце кодированного полипептида, в котором вспомогательная последовательность обладает по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичности с последовательностями, отраженными в Таблице 10. В другом варианте осуществления данные конструкции, полученные вышеуказанными в этом параграфе способами, дополнительно включают нуклеотиды, кодирующие последовательности, расщепляемые протеазами между аффинными маркерами и полипептидом XTEN, и эти способы предлагают для выделенных полипептидов препарата обработку протеазой, способной разрушать эти расщепляемые последовательности, такие протеазы не ограничиваются трипсином, с помощью которого полипептид XTEN высвобождается из получаемого полипептида; полипептид XTEN адсорбируется на хроматографическом носителе в условиях, эффективных для захватывания полипептида XTEN; полипептид XTEN потом элюируется и выделяется как в основном гомогенный полипептид XTEN.

Таблица 10: Примеры вспомогательных последовательностей для облегчения экспрессии белков, их выделения и процессинга в бактериях

Аминокислотная последовательность*	Аминокислоты в положении**					
	X1	X2	X3	X4	X5	Z
ADAQKAADNKKP						
KTLVYCSEGSPE						
ENNAQTTNESAG						
KDTIALVVSTLN						

Аминокислотная последовательность*	Аминокислоты в положении**					
	X1	X2	X3	X4	X5	Z
APKDNTWYTGA						
ADVPAGVTLAEK						
KIEEGKLVIWIN						
AEATTAAGGA						
ATGTATSEGSPE						
EPTAATTGESAG						
AETTAPAGST						
APTEATAGTGA						
AETPAGATGAE						
APEEGTAGGA						
SLSTEATAKIVSEFGRDAN						
ANPEQLEEQREETRLIIEE						
SASTEATAKAASEAGRDAN						
ANPEQAEEQREETR						
ANPEQAEEQREET						
ANPEQAEEQSEET						
KNPEQAEEQREET						
KNPEQAEEQSEET						
KNPEQAEEQAEEQREET						
KNPEQAEEQAEEQSEET						
KNHEQAEEQAEEQSEET						
KKHEQAEEQAEEQSEET						
KKPEQAEEQAEEQREET						
KNHEQEKEKAEEQSEET						
KKQEQEEKKAEEQREET						
KNHEKDEKKAEEQSEET						
KKQEQEKEQAEEQREET						
KNPEQEKEKAEEQREET						
KKPEQEEKQAEEQREET						
KKQEQEKEQAEEQAESEREET						
KKQEQEKEQAEEQSQSQREET						
KKQEQEKEQAEEQSESEREET						
KKQEQEKEQAEEQAKAESEAEREET						
KKQEQEKEQAEEQSKSQAEAEREET						
KKQEQEKEQAEEQAQAQAEDEREET						
KKQEQEKEQAEEQSKSKAEDEREET						
KKQEQEKEQAEEQPEVQREET						
KKQEQEKEQAEEQVENPREET						
KKQEQEKEQAEEQELCEREET						
KKQEQEKEQAEEQGIDTREET						
KNPEQAEEQX1EET	S/R					
ANPEQAEEQX1EET	S/					

Аминокислотная последовательность*	Аминокислоты в положении**					
	X1	X2	X3	X4	X5	Z
	R					
KNPEQAEEQAEEQX1EET	S/R					
KX2X3EQAEEQAEEQX1EET	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
KX2$(X3)_{10}$QX1EET	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
KX2$(X3)_7$AEEQX1EET	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
KX2X3EQE$(X3)_3$AEEQREET		K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
KX2X3EQE$(X3)_3$AEE$(X3)_5$		K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
KKQEQEKEQAEEQ$(X4X5)_2$REET				A/S	K/Q/E	
KKQEQEKEQAEEQ$(X4X5)_4$REET				A/S	K/Q/E	
KKQEQEKEQAEEQ$(Z)_4$REET						любом
KX2$(X3)_n$, где n=10-40		K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
$(X3)_n$, где n=10-50			K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			
KX2QEQEKEQAEEQ$(X4X5)_n$X1EET, где n=0-10	S/R	K/N		A/S	K/Q/E	
KX2$(X3)_n(X4X5)_m$X1EET, где n=5-20 и m=0-10	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S	A/S	K/Q/E	
KX2$(X3)_n(Z)_m$X1EET, где n=5-20 и m=0-20	S/R	K/N	K/N/T/Q/H/P/E/D/A/R/S			любом

* где n или m=0, соседние аминокислоты расположены последовательно
** указана аминокислота (ы), которые могут быть использованы в данном положении в исходных аминокислотных последовательностях с альтернативными вариантами, разделенными символом “/”

III). НАГРУЗОЧНЫЕ ВЕЩЕСТВА

[00268] Настоящее изобретение относится частично к XTEN-конъюгатам присоединенным к одной или большему количеству молекул нагрузочных веществ. Предусмотрено, что полипептид XTEN может быть соединен с большим разнообразием молекул нагрузочных веществ, включающем биологически активные пептиды, белки, полимеры, небольшие фармакологически активные молекулы, полинуклеиновые кислоты, пептиды- и белки-мишени, небольшие молекулы-мишени, антитела и фрагменты антител и небольших молекул нагрузочных веществ для визуализации, а также комбинациями этих типов нагрузочных веществ, что приводит к получению композиций с 2, 3, 4 или более типов нагрузочных веществ. Это изобретение направлено на долговременные потребности улучшения конечного

периода полувыведения экзогенно назначаемых терапевтических и диагностических нагрузочных веществ пациенту в них нуждающемуся, а также комбинаций нагрузочных веществ, которые могут включать лечебный компонент или нацеленному компоненту.

[00269] Примеры, не ограничивающие функциональные классы агентов фармакологически активных нагрузочных веществ для использования для связывания с полипептидом XTEN данного изобретения, могут включать какой-либо больше следующих классов: снотворные и седативные средства, антидепрессанты, транквилизаторы, лекарство, действующее на органы дыхания, антиконвульсанты, миорелаксанты, средства против болезни Паркинсона (антагонисты дофамина), анальгетики, противовоспалительные средства, успокоительные препараты (анксиолитики), средства, подавляющие аппетит, антигистаминные средства, средства для сокращения мышц, противинфекционные средства (антибиотики, антивирусные, противогрибковые, вакцины), противоревматические, противомалярийные, противорвотные средства, средства против эпилепсии, бронхолитические средства, факторы свертывания крови, цитокины, хемокины, интерлейкины, ростовые факторы, гормоны роста, гормоны эндокринной системы, экзокринные гормоны, инсулин, пептиды, регулирующие метаболизм глюкозы, противораковые агенты, антитромботические средства, антигипертензивные средства, препараты для сердечнососудистой системы, противоаритмические средства, антиоксиданты, противоастматические средства, гормональные агенты (включая контрацептивы), симпатомиметические средства, диуретики, средства, регулирующие липидный обмен, антиандрогенные агенты, противопаразитарные средства, антикоагулянты, диагностирующие опухоли средства, противоопухолевые средства, гипогликемические средства, нутриенты и пищевые добавки, ростовые добавки, противоэнтеритные агенты, вакцины, антитела, диагностические средства, контрастирующие агенты и радиоактивные вещества для визуализации.

[00270] Конкретнее, данное активное нагрузочное вещество может попадать в один из нескольких структурных классов, включающих, но не ограничивающихся, небольшими молекулами лекарственных средств, биологически активные белки (пептиды, полипептиды, белки, рекомбинантные белки, антитела и гликопротеины), стероиды, нуклеотиды, олигонуклеотиды, полинуклеотиды, жиры, электролиты и тому подобное. Для конъюгационных композиций XTEN-нагрузочное вещество специально предусмотрено, чтобы нагрузочное вещество могло быть фармакологически активным агентом, который обладает подходящей реакционно-способной группой, включающей, но не ограничивающейся нативной аминогруппой, сульфгидрильной группой, карбоксильной группой, альдегидной группой, кетонной группой, алкеновой группой, алкиновой группой, азидной группой, спиртовой группой, гетероциклом, или, в альтернативном варианте, модифицируется для того, чтобы

содержать по меньшей мере одну из вышеуказанных реакционно-способных групп, подходящих для связывания с полипептидом XTEN, XTEN-кросс-линкером или XTEN-реактантом клик-химии из этого изобретения, используя любой из способов конъюгации, описанных в данном тексте, или из иных, известных по использованию в этой области для конъюгации таких реакционно-способных групп. Специфические функциональные части и их реакционно-способные активности описаны в издании Organic Chemistry, 2nd Ed. Thomas Sorrell, University Science Books, Herndon, VA (2005). В дальнейшем будет понятно, что какое-либо нагрузочное вещество, содержащее реакционно-способную группу или модифицированное для включения реакционно-способной группы, также будет содержать остаток, после конъюгации, при которой к нему присоединяется полипептид XTEN, XTEN-кросс-линкер или XTEN-реактант клик-химии.

[00271] Приводимые в качестве примера нагрузочные вещества, подходящие для ковалентного присоединения к XTEN-полимеру, XTEN-кросс-линкеру или XTEN-реактанту, включают биологически активные белки и фармакологически активные небольшие молекулы лекарственных веществ, обладающих активностью. Приводимые в качестве примера лекарственные вещества, подходящие для изобретенных композиций, могут быть найдены как представленные в официальной Фармакопее США, официальной Гомеопатической Фармакопее США, официальном Национальном Формуляре и Настольный справочник врача (PDR) и в «Оранжевой книге» (Перечень зарегистрированных лекарственных средств с оценками терапевтической эквивалентности), издаваемой Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA). Предпочитаемые лекарственные вещества – это те вещества, которые имеют необходимую реакционно-способную функциональную группу, или те, для которых легко могут быть получены производные с внесением реакционно-способной функциональной группы для конъюгации и которые будут сохранять по меньшей мере часть фармакологической активности неконъюгированного нагрузочного вещества после конъюгации с полипептидом XTEN.

1. Лекарственные вещества как нагрузочные вещества

[00272] В некоторых вариантах осуществления изобретения лекарственное нагрузочное вещество для конъюгации с предложенным полипептидом XTEN, XTEN-кросс-линкерами или XTEN-реактантами клик-химии, описанными в данном тексте, является одним или более агентов, описанных в данном тексте или выбранных из нагрузочных веществ Таблицы 11, или их фармацевтически приемлемой солью, кислотой или производным или агонистом. В одном варианте осуществления для этого лекарственного вещества получают производное для введения реакционно-способной группы для конъюгации с предложенным полипептидом XTEN, XTEN-кросс-линкерами или XTEN-реактантами клик-химии, описанными в данном

тексте. В другом варианте осуществления для этого лекарственного вещества для конъюгации получают производное для введения расщепляемого линкера, такого как, но не ограничивающегося соединением валин-цитруллин-ПАБ, при этом после введения пациенту данный линкер способен расщепляться циркулирующей или внутриклеточной протеазой, таким образом высвобождая лекарственное вещество из конъюгата.

Таблица 11: Лекарственные вещества для конъюгации с полипептидами XTEN

Лекарственные вещества
Эрлотиниб; Бортезомиб; Алитретиноин, Аллопуринол, триокись мышьяка, клотфарабин, дексразоксан, Фульвестрант; Сутент (SU11248), Летрозол; Иматиниба мезилат; PTK787/ZK 222584; Бендамустин; Ромидепсин; Пралатрексат; Кабазитаксель (XRP-6258); Эверолимус (RAD-001); Абиратерон; Оксалиплатин; 5-ФУ (5-фторурацил), лейковорин, рапамицин; лапатиниб; лонафарниб; сорафениб; гефитиниб; циклофосфамид; бусульфан; импросульфан; пипосульфан; бензодопа; карбоквон; метуредопа; уредопа; алтретамин; триэтиленмеламин; триэтиленфосфорамид; триэтилентиофосфорамид; триметилмеламин; буллатацин; буллатацинон; камтотецин; топотекан; бриостатин; каллистатин; CC-1065; адозелезин; калихеамицин; ауристатин; монометилауристатин E (MMAE); монометилауристатин F (MMAF); (валин-цитрулин-ПАБ)- монометилауристатин E; (валин-цитрулин-ПАБ)-монометилауристатин F; карзелезин; бизелезин; криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин; элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; хлорамбуцил; хлорнафазин; холофосфамид; эстрамустин; ифосфамид; мехлорэтамин; мехлорэтаминоксид гидрохлорид; мелфалан; новембихин; фенестерин; преднимустин; трофосфамид; урацил мустард; кармустин; хлорозотоцин; фотемустин; ломустин; нимустин; ранимнустин; калихеамицин; динемицин; динемицин A; клодронат; эсперамицин; неокарзиностатина хромофор; аклациномизины, актиномицин; антрамицин; азасерин; блеомицин; кактиномицин; карабицин; карминомицин; карзинофилин; хромомицины; дактиномицин; даунорубицин; деторубицин; 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин; доксорубицин; морфолино- доксорубицин; леналидомид, цианоморфолино-доксорубицин; (валин-цитруллин-ПАБ)- доксорубицин; 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин; эпирубицин; эзорубицин; идарубицин; марцелломицин; митомицин C; микофеноловая кислота; ногаламицин; оливомицин; пепломицин; потфиромицин; пуромицин; квеламицин; родорубицин; стрептонигрин; стрептозоцин; туберцидин; убенимекс; зиностатин; зорубицин; 5-фторурацил (5-ФУ); фденоптерин; метотрексат; птероптерин; триметрексат; флударабин; 6-меркаптопурин; тиамиприн; анцитабин; азацитидин; 6-азауридин; кармофур; цитарабин; дидезоксиуридин; доксифлуридин; эноцитабин; меклортамин, флоксуридин; калустерон; дромостанолон пропионат; эпитиостанол; мепитиостан; тестолактон; аминоглутетимид; трилостан; фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; эниурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиниума ацетат; эпотилон; этоглюцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидайнин; майтанзин; анзамитоцины; митогуазон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; метоксален, подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; ризоксин; рибавирин; зидовудин; ацикловир; гангцикловир; видарабин; идоксуридин; трифлкридин; фоскарнет; амантадин; римантадин; саквинавир; индинавир; рионавир; альфа-интерфероны и другие интерфероны; AZT; сизофуран; спирогерманиум; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2;2′,2″-трихлоротриэтиламин; T-2 токсин; верракурин A; роридин A; ангвидин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (“Ara-C”); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды; эпаклитаксел; паклитаксел; доцетаксел; доксетаксел; иринотекан; пеметрексед; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; цисплатин; карбоплатин; винбластин; платина; этопозид, VP-16; ифосфамид; митоксантрон; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор изомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; капецитабин; месна, лидокаин; бупивакаин; мемантин; квинакрин, донепезил; ривастигмин; галантамин; морфин; оксикодон; гидроморфон; оксиморфон; метопон; апоморфин; норморфин; эторфин; бупренорфин; меперидин; лопермид; анилеридин; этогептазин; пиминидин; бетапродин; дифеноксилат; фентанил; суфентанил; альфентанил; ремифентанил; леворфанол; декстрометорфан; феназоцин; пентазоцин; циклазоцин; метадон; изометадон; пропоксифен; налоксон; натрексон; трепростинил; N-метилналоксон;

Лекарственные вещества
6-амино-14-гидрокси-17-аллилнордезоморфин; налтрендол; N-метилналтрексон; налбуфин; буторфанол; циклазоцин; пентазоцин; налмефен; налтриндол; нор-биналторфимин; оксилорфан; 6-амино-6-дезоксоналоксон; петазоцин; леваллорфанметилналтрексон; бупренорфин; циклорфан; левалорфан; циклоспорин; циклоспорин А; микофенилат мофетила; сиролимус; такролимус; преднизолон; азатиоприн; циклофосфамид; преднизон; аминокапроновая кислота; хлороквин; гидроксихлороквин; дексаметазон; хлорамбуцил; даназол; бромокриптин; Нилотиниб (AMN107); Неларабин, амифостин, амиодарон, аминокапроновая кислота, аминогиппурат натрия, аминоглутетимид, аминолевулиновая кислота, аминосалициловая кисота, амсакрин, анагрелид, анастрозол, аспарагиназа, антрациклины, бексаротен, бикалутамид, блеомицин, бузерелин, бусульфан, каберголин, капецитабин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, циластина натрий, цисплатин, кладрибин, клодронат, циклофосфамид, ципротерон, цитарабин, камптотецины, 13-цис-ретиноевая кислота, все транс ретиноевые кислоты; дакарбазин, дактиномицин, даунорубицин, дефероксамин, дексаметазон, диклофенак, диэтилстильбэстрол, доцетаксел, доксорубицин, эпирубицин, эстрамустин, этопозид, экземестан, фексофенадин, флударабин, флудрокортизон, фторурацил, флуоксиместерон, флутамид, гемцитабин, эпинефрин, L-Дофа, гидроксимочевина, идарубицин, ифосфамид, иматиниб, иринотекан, итраконазол, гозерелина ацетат, летрозол, лейковорин, левамизол, лизиноприл, ловотироксина натрия, мехлоретамин, медроксипрогестерон, мегестрол, мелфалан, метараминола битартрат, метоклопрамид, мексилэтин, митомицин, митотан, налоксон, никотин, нилутамид, октреотид, памидронат, пилкамицин, порфимер, преднизон, прохлорперазин, ондасетрон, ралтитрексед, сиролимус, такролимус, тамоксифен, темозоломид, тестостерон, тетрагидроканнабинол, талидомид, тиогуанин, топотекан, третиноин, валрубицин, винкристин, виндезин, винорелбин, доласетрон, гранисетрон; формотерол, флутиказон, лейпролид, мидазолам, алпразолам, амфотецин В, подофилотоксины, нуклеозидные противовирусные препараты, ароилгидразоны, суматриптан; макролиды, такие как эритромицин, олеандомицин, тролеандромицин, рокситромицин, кларитромицин, даверцин, азитромицин, флуритромицин, диритромицин, джозамицин, спиромицин, мидекамицин, лейкомицин, миокамицин, рокитамицин, андазитромицин и свинолид А; фторохиноны, такие как ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, тровафлоксацин, алатрофлоксацин, моксифлоксицин, норфлоксацин, эноксацин, грепафлоксацин, сунитиниб, гатифлоксацин, ломефлоксацин, спарфлоксацин, темафлоксацин, пефлоксацин, амифлоксацин, флероксацин, тосуфлоксацин, прулифлоксацин, ирлоксацин, пазуфлоксацин, клинафлоксацин и ситафлоксацин; аминогликозиды, такие как гентамицин, нетилмицин, парамецин, тобрамицин, амикацин, канамицин, неомицин и стрептомицин, ванкомицин, текопланин, рамполанин, мидепланин, колистин, даптомицин, грамицидин, колистиметат; полимиксины, такие как полимиксин В, капреомицин, бацитрацин, пенемы; пенициллины, включая чувствительные к пенициллиназе агенты как пенициллин G, пенициллин V; устойчивые к пенициллиназе агенты как метициллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, флоксациллин, нафциллин; активные против грам-отрицательных микроорганизмов агенты как ампициллин, амоксициллин и гетациллин, циллин и галампициллин; пенициллины против синегнойной палочки как карбенициллин, тикарциллин, азлоциллин, мезлоциллин и пиперациллин; цефаспорины какцефподоксим, цефпрозил, цефтбутен, цефтизоксим, цефтриаксон, цефалотин, цефапирин, цефалексин, цефрадрин, цефокситин, цефамандол, цефазолин, цефалоридин, цефаклор, цефадроксил, цефалоглицин, цефуроксим, цефоранид, цефотаксим, цефатризин, цефацетрил, цефепим, цефиксим, цефоницид, цефперазон, цефотетан, цефинетазол, цефтазидим, лоракарбеф и моксалактам, монобактамы как азтреонам и карбапенемы, такие как имипенем, меропенем, пентамидина изетиоуат, альбутерола сульфат, лидокаин, метапротеренола сульфат, беклометазона дипропионат, триамцинолон ацетамид, будесонид ацетонид, флутиказон, ипратропиума бромид, флунизолид, кромолин натрий и эрготамина тартрат; таксаны, такие как паклитаксел; SN-38, тирфостины, 20-эпи-1,25-дигидрокси-витамин D3, 5-этинилурацил, абиратерон, Ацивицин, Акларубицин, Акодазола Гидрохлорид, АкрКвнин, ацилфульвен, адеципенол, адрамицин, Алдеслейкин, антагонисты ALL-TK, амбамустин, амидокс, Амбомицин, Аметантрона ацетат, амрубицин, андрографолид, ингибиторы ангиогенеза, антагонист D, антагонист G, антареликс, анти-андроген, антидорзелининг морфогенетический протеин -1, анти-эстроген, антиметаболиты, анти-неопластон, анти-эстрогены, антисмысловые олигонуклеотиды, противоядия, афидиколинглицинат, модуляторы генов апоптоза, апуриновая кислота, ara-CDP-DL-PTBA, аргинин-дезаминаза, Асперлин, азулакрин, атаместан, атримустин, атрсакрин, аксинастатин 1, аксинастатин 2, аксинастатин 3, азасетрон, азатоксин, азатирозин, Азптепа:Азотомицин, производные баккатина III, баланол, Батимастат, аньагонисты BCR/ABL, бензохлорины, Бензоднпа, бензоилстауроспорин, стауроспорин, бета-алетин, бетакламицин В,

Лекарственные вещества
производные беталактамов, бетаметазон, бетулиновая кислота, ингибитор bFGF, Бикалутамид, Бизантрена Гидрохлорид, бисазидиринилспермин, биснафид, Биснафида Димесилат, бистратен А, Блеомицина Сульфат, брефлат, Бреквинар Натрий, бром эпиандростерон, Бропиримин, будотитан, бутионин сульфоксимин, кальципотриол, калфостин С, производные камтотецина, канарипокс IL-2, капедтабин, Карацемид, Карбетимер, карбоксамид-амино-триазол:карбоксиамидотриазол, CaRestM3, CARN700, ингибитор происходящий из хрящей, Карубицина Гидрохлорид, ингибиторы казеинкиназы (ICOS), кастаноспермин, цекропин В, Цедефингол, цетрореликс, хлорины, хлороквиноксалина сульфонамид, хлоротрианизен, цикапрост, Циролемицин, цис-порфирин, аналоги кломифена, клотримазол, коллисмицин А, коллисмицин В, комбретастатин А4, аналоги комбретастатина, конагенин, крамбесцидин 816, кристнатол, Кристнатол Мезилат, криптофицин 8, производные криптофицина А, курацин А, циклопентантрахиноны, циклоплатам, ципемицин, цитарабинофосфат, цитолитический фактор, цитостатин, цитотоксические агенты, Даунорубицина Гидрохлорид, Децитабин, дегидродидемнин В, деслорелин, дексифосфамид, Дексормаплатин, дексразоксан, дексверапамил, Дезагуанин, Дезагуанина Мезилат, DHEA, диазикворин, дикарбазин, дидемнин 13, дидокс, диэтилнорспермин, дигидро-5-азацитидин:дигидротаксол,9-диоксамицин, дифенилспиромустин, докозанол, Доксорубицина Гидрохлорид, Дролоксифен, Дролоксифена Цитрат, Дромостанолона Пропионат, дронабинол, Дуазомицин, дуоканницин SA, эбселен, экорустин, эдельфозин, эдроколомаб, Эфломитина Гидрохлорид, эфлорнитин, элемен, Эльзамитруцин, эмитефур, Энлоплатин, Энпромат, эпиандростерон, Эпиропидин, Эпирубицина Гидрохлорид, эпристерид, Эрбулозол, терапия с использованием генов эритроцитов, Эзорубицина Гидрохлорид, аналоги эстрамустина, агонисты эстрогенов, антагонисты эстрогенов, Этанидазол, этинилэстрадиол, Этиодизированное Масло I131, Этопозида Фосфат, Этоприн, фадрозол, Фадрозола Гидрохлорид, Фазарабин, фазарабин, фенретинид, Фенретинид:Флоксуридин, финастерид, флавопиридол, флезеластин, Флударабина Фосфат, фтордауноруницина гидрохлорид, Фторцитабин, форменимекс, фрместан, Фосквидон, фостриецин, Фостриецин Натрий, гадолиния тексафирин, галоцитабин, ганиреликс, ингибиторы желатиназы: гемцитабин, Гемцитабина Гидрохлорид, ингибиторы глутатиона, Золото Au198, гозерелин, гепсульфам, герегулин, гексаметиленбисацетамид, гексаметилмеламин, хорионический гонадотропин человека:монофосфорил-липид А + к-клеточные стенки миобактерий, гиперицин, ибандроновая кислота, идарубицина гидрохлорид, идоксифен, идрамантон, Илмофозин, иломастат, имидазо-акридоны, имиквимод, иммуностимулирующие пептиды:ингибитор рецептора инсулиноподобного ростового фактора -1, агонисты интерферона, Интерферон Альфа-2a, Интерферон Альфа-2b, Интерферон Альфа -n1, Интерферон Альфа -n3, Интерферон Бета-Ia, Интерферон Гамма-Ib, иобенгуан, йододоксорубицин, ипомеанол, Ипроплатин, Иринотекана Гидрохлорид, ироплакт,ирсогладин, изобенгазол, изогомогаликондрин В, итасетрон, джасплакинолид, кахалалид F, ламелларин-N-триацетат, ланреотид, Лантреотида Ацетат, лейнамицин, ленограстим, лентинана сульфат, лептолстатин, фактор ингибирующий лейкемию, лейкоцитарный альфа интерферон, Лейпролида Ацетат, лейпролид+эстроген+прогестерон, лейпропрелин, лиарозол, Лиарозола Гидрохлорид, аналог линейного полиамина, липофильный дисахарид-пептид, липофильные соединения платины, лиссоклинамид 7, лобаплатин, ломбрицин, лометрексол, Лометрексол Натрий, Ионидамин, Лозоксантрона Гидрохлорид, ловастатин, локсорибин, лупролид, луртотекан, лутетлумтексафирин, лизофиллин, литические пептиды, майтанзин, манностатин А, маримастат, Мазопрокол, маспин, ингибиторы матрилизина, ингибиторы матричной металлопротеиназы, меркаптопурин, Мехлорэтамина Гидрохлорид, Мегетерола Ацетат, Меленгестрола Ацетат, Меногарил, мербарон, метерелин, метиониназа, метлоретамин, Метоприн, Метуредепа, микроалгал, мифепристон, ингибитор МИФ, милтефозин, миримостим, некомплементарные двухцепочечные РНК, Митиндомид, Митокарцин, Митокромин, Митогиллин, митогвазон, Митомалцин, аналоги митомицина, митонафид, Митоспер, митотоксин фактора роста фибробластов -сапорин, мофаротен, молграмостим, моноклональное антитело, ингибитор генов множественной устойчивости к лекарствам, средства терапии на основе супрессора1 множественных опухолей, противораковый агент горчицы, мутамицин, микапероксид В, экстракт клеточных стенок микобактерий, Mycobacterium bovis, мириапорон, N-ацетилдиналин:N-замещенные бензаамиды, нафарелин, нагрестип, налоксон+пентазоцин, напавин, нафтерпин, нартограстим, недаплатин, неморубицин, неридроновая кислота, нейтральная эндопептидаза, низамицин, модуляторы оксида азота, нитропроизводные мустарда, антиоксидант нитроксида, нитруллин, Нокодазол:Ногаламицин, О6-бензилгуанин, эстрадиол, окайзенон, олигонуклеотиды, онапристон:ондасетрон, ондасетрон, орацин, индуктор оральных цитокинов, Ормаплатин, озатерон, оксауномицин, Оксизуран, палауамин, пальмитоилризоксин, памидроновая

Лекарственные вещества
кислота, панакситриол, паномифен, парабактин, пазеллиптин:пегаспаргаза, Пегаспаргаза, пелдезин:пентозанполисульфат натрия, Пентамустин, пентрозол, Пептомицина Сульфат, перфлуброн, Перфлосфамид, периллиловый спирт, феназомицин, фенилацетат, ингибиторы фосфатазы, пицибанил, пилокарпина гидрохлорид, пиритрексим, Пироксантрона Гидрохлорид, плацетин А, плацетин В, ингибитор активатора плазминогена, комплекс платины, соединения платины, комплекс платина-триамин, Пликамицин, Пломестан, Порфимер Натрий, Прокарбазина Гидрохлорид, пропил-бис-акридон, простагландин J2, карцинома простаты, ингибиторы протеасомы, иммуномодулятор на основе протеина А, ингибитор протеинкиназы С, ингибиторы протеин-тирозин-фосфатазы, ингибиторы пурин-нуклеозид-фосфорилазы, Пуромицина Гидрохлорид, пурпурины, Пиразофурин, пиразолоакридин, конъюгат пиридоксилированного гемоглобина и полиоксиэтилена, антагонисты raf, рамосетрон, ингибиторы расфарнезил-протеин-трансферазы, ингибиторы ras: ингибитор ras-GAP, деметилированный ретеллиптин, рения Re186 этидронат, Рибоприн, рибозимы, RII ретинамид, RM-131 (агонист грелина), RM-493 (агонист рецептора меланокортина 4 типа), Роглетимид, рогитумин, ромуртид, роквинимекс, рубигинон В1, рубоксил, Сафингола Гидрохлорид, Сафингол, сейнтропин:Sar CNU, саркофитол А, сарграмостим, Sdi1-миметик, Семустин, сенесцен-производное ингибитора 1, смысловые олигонуклеотиды, ингибиторы сигнала трансдукции, модуляторы сигнала трансдукции, Симтразен, одноцепочечный антигенсвязывающий белок, собузоксан, натрия борокаптат, натрия фенилацетат, сольверол, соматомединсвязывающий белок, сонермин, Спарфосат Натрия, спарфосоевая кислота, Спарсомицин, Спирогерманиума Гидрохлорид, Спиромустин, спиромустин:спленопентин, Спиоплатин, спликанамицин D, скваламин, ингибитор стволовых клеток, ингибитор деления стволовых клеток, стипиамид, ингибиторы стромелизина, Стронция Хлорид Sr89, сульфмозин, Сулофенур, антагонист суперактивного вазоактивного интестинального пептида, сурадиста, сурамин, свайнсонин, синтетический гликозаминогликаны, Тализомицин, таллимустин, тамоксифена метйодид, тауромустин, тазаротен, Текогалан Натрий, Тегафур, теллурапирилиум, телнопорфин, ингибиторы теломеразы, Телоксантрона Гидрохлорид, Темопорфин, тернозоломид, Тероксирон, тетрахлородекаоксид, тетразомин, тексотер, таллбластин, тиокоралин, миметик тромбопоэтина, тималфасин, агонист рецептора тимопоэтина, тимотринан, тироид-стимулирующий гормон, тиазофурин, тинетилотиопурпурин, Тирапазамин, титаноцена дихлорид, Топотекана Гидрохлорид, топсентин, торемифен, Торемифена Цитрат, фактор тотипотентных стволовых клеток, ингибиторы трансляции, Трестолона Ацетат, триацетилуридин, трицирибин, Трицирибина Фосфат:Триметрексат, Триметрексата Глюкуронат, Трипторелин, трипторелин:трописетрон, тубулозола гидрохлорид, туростерид, ингибиторы тирозин-киназы, ингибиторы UBC, уродепа, фактор ингибирования роста полученный из урогенитального синуса, антагонисты рецептора урокиназы, вапреотид, вариолин В, векторная система, веларезол, змеиный яд, верамин, вердины, Верлепорфин, вертепорфин, Винбластина Сульфат, винкристина сульфат, виндезин, Виндезина Сульфат, Винепидина Сульфат, Винглицината Сульфат, Винлейрозина Сульфат, винорелбина тартрат, винрозидина сульфат, винксалтин, Винзолидина Сульфат, витаксин, Ворозол, занотерон, Зениплатин, зиласкорб, зиностатина стималамер, Зорубицина Гидрохлорид, панкреатическая РНКаза быка, панкреатическая РНКаза человека, панкреатическая РНКаза млекопитающих, онконаза, ранпирназа, антивирусный белок лаконоса американского, рахелмицин, цепь рицина-А, гелонин, эверолимус, карфилзомиб, тубулизин, тубулизин В, тубулизин М, майтанзиноид DM1, майтанзиноид DM4, триптолид, SJG-136, апазиквон, ирофульвен, иллудин S, томаймицин, золендронат.

2. Биологически активные белки как нагрузочные вещества

[00273] В другом аспекте, данном изобретении предложены композиции XTEN-нагрузочное вещество, в которых нагрузочное вещество является биологически активным белком в виде пептида или полипептида. В некоторых вариантах осуществления конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, это нагрузочное вещество является каким-либо фармакологически активным пептидом или полипептидом, который может быть экспрессирован как рекомбинантный белок слияния, присоединенный к одному или большему количеству

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

[00274] Последовательности биологически активных белков могут быть получены из общедоступных баз данных, патентов или литературных ссылок и других подобных источников, которые хорошо известны в этой области знаний. Например, последовательности могут быть получены из Универсального Ресурса Белков (UniProt)/Swiss-Prot, Европейского института биоинформатики (EBI), SIB Швейцарского института биоинформатики, Информационного Ресурса по Белкам (PIR). Регистрационные номера Химической реферативной службы (CAS) (публикуемые Американским Химическим Обществом) или номера доступа в GenBank (например, AAA-AZZ, HAA-HZZ, JAA-JZZ), идентификаторы модельных белков, доступные на веб-странице Национального центра биотехнологической информации (NCBI), доступные в интернете по адресу ncbi.nlm.nih.gov, которые соответствуют записям в реестре CAS или базе данных GenBank, содержащих аминокислотную последовательность интересуемого белка или фрагмента или варианта этого белка. Такие идентификаторы последовательностей, представленные в данном тексте, обобщенные страницы связаны с каждым из этих CAS, GenBank и GenSeq номерами доступа, а также цитируемыми журнальными публикациями (например, ID номер PubMed (PMID)), каждая из которых включена посредством ссылки в их полном объеме, особенно применительно к аминокислотным последовательностям, описанным в данном документе.

[00275] В одном варианте осуществления композиция XTEN-нагрузочное вещество в рекомбинантной или конъюгационной форме, включает одну или больше молекул биологически активного пептида или белка, который содержит, но не ограничивается пептидом или полипептидом, выбранным из нагрузочных веществ, отраженных в Таблице 12 или их вариантом последовательности, который сохраняет по меньшей мере часть активности этого биологически активного белка. Под термином “вариант последовательности” подразумевается,

что этот биологически активный белок обладает по меньшей мере около 80%, или 90%, или 91%, или 92%, или 93%, или 94%, или 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99% идентичностью последовательности при оптимальном выравнивании к последовательности известного пептида или полипептида, такого как перечислены в Таблице 12.

Таблица 12: Биологически активные белки для присоединения к полипептиду XTEN

Название белка/пептида
EPO, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, консенсусный IFN, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, IL-1, IL-2, ремикад (инфликсимаб), Ритуксан (ритуксимаб), Эмбрел (этанерцепт), Синагис (паливизумаб), Реопро (абциксимаб), Герцептин (трастузимаб), tPA, Церизим (имиглюцераза), Вакцина против гепатита-B, рДНКаза, ингибитор альфа-1 протеиназы, C-пептид, фузеон, G-CSF, GM-CSF, гормон роста, соматропин, гормон высвобождающий гормон роста, инсулин, аналоги инсулина, глюкагон, GLP-1, GLP-2, FSH, TNF-рецептор, уриказа, VEGF, PTH, аспарагиназа, амдоксовир (DAPD), антид, бекаплермин, кальцитоцины, циановирин, денилейкин дифтитокс, эритропоэтин (EPO), цередаза, церезим, альфа-глюкозидаза, коллаген, циклоспорин, альфа дефензины, бета дефензины, эксендин-4, гранулоцитарный колониестимулирующих фактор (GCSF), тромбопоэтин (TPO), ингибитор альфа-1 протеиназы, элкатонин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GMCSF), фибриноген, филграстим, ростовые гормоны человека гормон роста (hGH), гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), GRO-бета, антитело к GRO-бета, морфогенные белки костей, такие как морфогенный белок костей-2, морфогенный белок костей-6, OP-1; кислый ростовой фактор фибробластов, основной ростовой фактор фибробластов, лиганд CD-40, гепарин, сывороточный альбумин человека, низкомолекулярный гепарин (LMWH), интерфероны, такие как интерферон альфа, интерферон бета, интерферон гамма, интерферон омега, интерферон тау, консенсусный интерферон; интерлейкины и рецепторы интерлейкинов, такие как рецептор интерлейкина-1, интерлейкин-2, гибридные белки интерлейкина-2, антагонист рецептора интерлейкина -1, интерлейкин -3, интерлейкин -4, рецептор интерлейкина -4, интерлейкин -6, интерлейкин -8, интерлейкин -12, рецептор интерлейкина -13, рецептор интерлейкина-17; лактоферрин и фрагменты лактоферрина, гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон (LHRH), инсулин, про-инсулин, аналоги инсулинов (например, моно-ацилированный инсулин как описано Пат. США № 5922675), амилин, соматостатин, аналоги соматостатина, включая октреотид, вазопрессин, фолликулстимулирующий гормон (FSH), вакцина против гриппа, инсулиноподобный ростовой фактор (IGF), инсулинотропин, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), активаторы плазминогена, такие как альтеплаза, урокиназа, ретеплаза, стрептокиназа, памитеплаза, ланотеплаза и тенетеплаза; ростовой фактор нервов (NGF),остеопротегерин, тромбоцитарный фактор роста, тканевые ростовые факторы, трансформирующий ростовой фактор -1, фактор роста эндотелия сосудов, ингибирующий лейкемию фактор, ростовой фактор кераноцитов (KGF), глиальный ростовой фактор (GGF), T-клеточные рецепторы, CD молекулы/антигены, фактор некроза опухолей (TNF), моноцитарный хемоатрактантный белок -1, эндотелиальные ростовые факторы, паратиреоидный гормон (PTH), тимозин альфа 1, ингибитор тимозина альфа 1 IIb/IIIa, тимозин бета 10, тимозин бета 9, тимозин бета 4, альфа-1 антитрипсин, соединения фосфодиэстеразы (PDE), ингибиторы VLA-4 (очень поздний антиген -4), ингибиторы VLA-4, бисфосфонаты, антитело к респираторно-синцитиальному вирусу, ген-регулятор кистозного фиброза (CFTR), дезоксирибонуклеаза (ДНКаза), бактерицидный/повышающий проницаемость белок (BPI), антитело к CMV, этанерсепт, абсиксимаб, афелиомомаб, базиликсимаб, даклизумаб, инфиксимаб, имбритумомаб тиуэксетан, митумомаб, муромомаб-CD3, конъюгат йода 131 и тозитумомаба, олизумаб, ритуксимаб, трастузумаб (герцептин), бокстокс, Диспорт, алглюкозидаза альфа, даптомицин, YH-16, хориогонадотропин альфа, филграстим, цетрореликс, интерлейкин-2, альдеслейкин, тецелейкин, денилейкин дифтитокс, интерферон альфа -n3 (инъекционный), интерферон альфа -n1, DL-8234, интерферон, Санторий (гамма-1a), интерферон гамма, тимозин альфа 1, тазонермин, ДигиФаб, ВипераТАб ЭхиТАб, КроФаб, незиритид, абатасепт, алефасепт, Ребиф, эптотермин альфа, терипаратид (остеопороз), кальцитоцин инъекционный (заболевания костей), кальцитоцин (назальный, остеопороз), этанерсепт , глютамер гемоглобина 250 (бычий), дротрекогин альфа, коллагеназа , карперетид, рекомбинантный эпидермальный ростовой фактор человека (гель для местного применения, лечение ран), DWP-401, дарбепоэтин альфа , эпоэтин омега, эпоэтин бета, эпоэтин альфа, дезирудин , лепирудин, бивалирудин, нонаког альфа, Мононин, эптаког альфа (активированный),

Название белка/пептида
рекомбинантный Фактор VIII + VWF, Рекомбинат, рекомбинантный Фактор VIII, Фактор VIII (рекомбинантный), Альфанат, октоког альфа, Фактор VIII, палифермин, Индикиназа, тенектеплаза, альтеплаза, памитеплаза, ретеплаза, натеплаза, монтеплаза, фоллитропин альфа, rFSH, hpFSH, микафунгин, пэгфилграстим, ленограстим, нартограстим, серморелин, глюкагон, экзенатид, прамлинтид, имиглюцераза, галсульфаза, Лейкотропин, молграмостим, трипторелина ацетат, гистрелин, гистрелина ацетат, деслорелин, нафарелин, лейпролид запасной замедленного высвобождения (ATRIGEL), имплант лейпролида (DUROS), соматропин, Эутропин, программа KP-102, соматропин, соматропин, мекасермин (нарушение роста), энфувиртид, Org-33408, инсулин гларгин, инсулин глюлизин, инсулин (ингаляционный), инсулин лизпро, инсулин детемир, инсулин (буккальный, RapidMist), мекасермин ринфабат, анакинра, сельмолейкин, 99mTc-апситид инъекционный, миелопид, Бетасерон, глатирамера ацетат, Гепон, опрелвекин, альфа-интерфероны, происходящие из лейкоцитов человека, Билив, инсулин (рекомбинантный), рекомбинантный инсулин человека, инсулин аспарт, мекасермин, Роферон-А, интерферон -альфа2, Альфаферон, интерферон альфакон-1, интерферон альфа, Авонекс, рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека, дорназа альфа, трафермин, зиконотид, талтирелин, диботермин альфа, атозибан, бекаплермин, эптифибатид, Земайра, CTC-111, Шванвак-В , вакцина против HPV (квадровалентная), NOV-002, октреотид, ланреотид, ансестим, агалзидаза бета, агалзидаза альфа, ларонидаза, презатид ацетат меди (гель для местного применения), расбуриказа, ранибизумаб, Актиммун, ПЭГ-Интрон, Трикомин, десенситизирующая инъекция рекомбинантного аллергена клеща домашней пыли, рекомбинантный паратироидный гормон человека (PTH) 1-84 (п/к, остеопороз), эпоэтин дельта, трансгенный антитромбин III, Грандитропин, Вираза, рекомбинантный инсулин, интерферон-альфа (оральные пастилки), GEM-21S, вапреотид, идурсульфаза, омапатрилат, рекомбинантный сывороточный альбумин, сертолизумаб пэгол, глюкарпидаза, ингибитор рекомбинантной эстеразы C1 человека (ангиоэдема), ланотеплаза, рекомбинантный гормон роста человека, энфувиртид (безиголочная инъекция, Биоджектор 2000), VGV-1, интерферон (альфа), люцинактант, авиптадил (ингаляционный, заболевание легких), икатибант, экаллантид, омиганан, Аурограб, пексиганана ацетат, ADI-PEG-20, LDI-200, дегареликс, цинтредекин безудотокс, Фавид , MDX-1379, ISAtx-247, лираглутид, терипаратид (остеопороз), тифакогин, AA-4500, T4N5 липосомный лосьон, катумаксомаб, DWP-413, ART-123, Хризалин, десмотеплаза, амедиплаза, корифоллитропин альфа , TH-9507, тедигютид, Диамид, DWP-412, гормон роста (инъкция для замедленного высвобождения), рекомбинантный G-CSF, инсулин (ингаляционный, AIR), инсулин (ингаляционный, Техносфера), инсулин (ингаляционный, AERx), RGN-303, DiaPep277, интерферон бета (вирусная инфекция гепатита С (HCV)), интерферон альфа -n3 (оральный), белатасепт, трансдермальные инсулиновые пластыри, AMG-531, MBP-8298, Ксересепт, опебакан, AIDSVAX, GV-1001, Лимфоскан, ранпирназа, Липоксисан, лусупултид, MP52 (переносчик бета-трикальцийфосфата, регенерация костей), вакцина против меланомы, сипулейцел-Т, CTP-37, Инсегия, витеспен, тромбин человека (замороженный, кровотечения при хирургическом вмешательстве), тромбин, TransMID, альфимепраза, Пуриказа, терлипрессин, EUR-1008M, рекомбинантный FGF-1, BDM-E, ротигаптид, ETC-216, P-113, MBI-594AN, дурамицин (ингаляционный, цистозный фиброз), SCV-07, OPI-45, Эндостатин, Ангиостатин, ABT-510, Концентрат ингибитора Боуман-Бирка, XMP-629, 99mTc-Хиник-Аннексин V, кахалалид F, CTCE-9908, тевереликс (пролонгированное высвобождение), озареликс, ромидепсин, BAY-50-4798, интерлейкин-4, PRX-321, Пепскан, ибоктадекин, rh лактоферрин, TRU-015, IL-21, ATN-161, циленгитид, Альбуферон, Бифазикс, IRX-2, омега интерферон, PCK-3145, CAP-232, пазиреотид, huN901-DM1, иммунотерапевтическая вакцина против рака яичников, SB-249553, Онковакс -CL, Онковакс -P, BLP-25, Цервакс-16, немифитид, rAAT (ингаляционный), rAAT (дерматологичексий), CGRP (ингаляционный, астма), пегсунерсепт, тимозин бета-4, плитидепсин, GTP-200, рамопланин, GRASPA, OBI-1, AC-100, кальцитоцин лосося (оральный, элиген), кальцитоцин (оральный, остеопороз), экзаморелин, капроморелин, Кардева, велафермин, 131I-TM-601, KK-220, TP-10, уларитид, депелестат , гематид, Хризалин (для местного применения), rNAPc2, рекомбинантный Фактор VIII (ПЭГилированный липосомальный), bFGF, ПЭГилированный вариант рекомбинантной стрептокиназы , V-10153, Сонолизис Пролиз, НейроВакс, CZEN-002, неогенезная терапия островными клетками, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, экзенатид, AVE-0010, GA-GCB, аворелин, AOD-9604, линаклотида ацетат, CETi-1, Гемоспан, VAL (инъекционный), инсулин, рекомбинантный метионилированный лептин человека, питракинра для подкожных инъекций, экзема), питракинра (сухой порошок для ингаляций, астма), Мультикин, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10 (аутоиммунные заболевания/воспаление), талактоферрин (для местного применения), rEV-

Название белка/пептида
131 (офтальмологический), rEV-131 (заболевание легких), оральный рекомбинантный инсулин (диабет), RPI-78M, CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, валатеграст , интерферон альфа-n3 (для местного применения), IRX-3, RDP-58, Тауферон, стимулированная желчными солями липаза, Мериспаза, щелочная фосфатаза, EP-2104R, Меланотан -II, бремеланотид, ATL-104, рекомбинантный микроплазмин человека, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, динорфин A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, вакцина против малярии (виросомы, PeviPRO), ALTU-135, вакцина против парвовируса B19, вакцина против гриппа (рекомбинантная нейраминидаза), вакцина малярии/HBV, вакцина против сибирской язвы, Vacc-5q, Vacc-4x, вакцина против ВИЧ (оральная), вакцина против HPV, Тат Токсоид, YSPSL, CHS-13340, PTH(1-34) липосомальный крем (Новасом), Остаболин-С, аналог PTH (для местного применения, псориаз), MBRI-93.02, MTB72F вакцина (туберкулез), MVA-Ag85A вакцина (туберкулез), FAR-404 , BA-210, рекомбинантная вакцина против чумы F1V, AG-702, OxSODrol, rBetV1, Der-p1/Der-p2/Der-p7 вакцина нацеленная против аллергена (аллергия к пылевому клещу), PR1 пептидный антиген (лейкемия), вакцина против мутантного ras, HPV-16 E7 липопептидная вакцина, вакцина против лабиринтина (аденокарцинома), вакцина против CML, WT1-пептидная вакцина (рак), IDD-5, CDX-110, Пентрис, Норелин, ЦиоФаб, P-9808, VT-111, айкрокаптид, телбермин, рупинтвир, ретикулоза, rGRF, P1A, альфа-галактозидаза A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, ангиотензин-терапевтическая вакцина, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (оральный, туберкулез), DRF-7295, ABT-828, ErbB2-специфический иммунотоксин (противораковый), DT388IL-3, TST-10088, PRO-1762, Комботокс, пептиды связывающие холецистокинин-B/гастрин-рецептор, 111In-hEGF, AE-37, трастузумаб-DM1, Антагонист G, IL-12 (рекомбинантный), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (для местного применения), радиоиммунные препараты на основе L-19 (рак), Re-188-P-2045, AMG-386, DC/I540/KLH вакцина (рак), VX-001, AVE-9633, AC-9301, NY-ESO-1 вакцина (пептиды), NA17.A2 пептиды, вакцина против меланомы (лекарственное средство активированное антигеном), вакцина против рака простаты, CBP-501, рекомбинантный лактоферрин человека (сухость глаз), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (инъекционный), ACP-HIP, SUN-11031, пептид YY [3-36] (ожирение, интраназально), FGLL, атасисепт , BR3-Fc, BN-003, BA-058, паратироидный гормон человека 1-34 (назальный, остеопороз), F-18-CCR1, AT-1001 (целиакия /диабет), JPD-003, PTH(7-34) липосомальный крем (Новасом), дурамицин, CAB-2 , CTCE-0214, эритропоэтин, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114 , JR-013, Фактор XIII, аминокандин, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318 , BAY-73-7977 , телеверикс (с быстрым высвобождением), EP-51216, hGH, OGP-I, сифувиртид, TV-4710, ALG-889, Org-41259, rhCC10, F-991, тимопентин (заболевания легких), r(m)CRP, гепатоселективный инсулин, субалин, L19-IL-2 белок слияния, элафин, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, агонист рецептора тромбопоэтина, AL-108, AL-208, антагонисты фактора роста нервов (боли), SLV-317, CGX-1007, INNO-105 , оральный терипаратид (элиген), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, LFn-p24 гибридная вакцина (Терапор), EP-1043, hPTH(1-34), 768974, SYN-101, PGN-0052, авискумин, BIM-23190, энкастим , APC-8024, GI-5005, ACC-001, TTS-CD3 , TNF, десмопрессин, онерсепт, TP-9201, AC165198, Рецептор активина типа IIA, Аденозин дезаминаза, Адипотид, Афостаза альфа (щелочная фсфатаза), Альфа-меланоцит стимулирующий гормон, Альфа-1 антитрипсин, Альфа-галактозидаза, Ангиотензин, Ингибитор анти-ангиопоэтина-1, Ингибитор анти-ангиопоэтина -2, Аполипопротеин A1, аркалист, Аргинин дезиминаза, Аспарагиназа, Атилмотин, AZD2820, Антагонист рецептора брадикинина, Кальцитоцин, Пептид, регулирующий ген кальцитоцин, Цендеритид, Холецистокинин, Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), Цилигенитид, Фактор свертывания IX, Фактор свертывания, Фактор свертывания VIII, Фактор свертывания X, Фактор свертывания XIII, Коллагеназа, Ингибитор эстеразы C1 комплемента (конестат альфа), Ингибитор фактора комплемента C3, Ингибитор фактора комплемента C5, Кортикотропин-высвобождающий фактор, C-пептид, натрийуретический пептид C-типа, Дефензины, DiaPep277, Дифенилгидрамин, Экаллантид, Эндостатин, Эптифибатид, Фибриноген, Агонист рецептора фактора роста фибробластов, Фолликул-стимулирующий гормон (FSH), Фоллистатин, FP-1039 (FGF-ловушка), Фузеон, Гастрин, Грелин, Антагонист грелина, GIP-1, GIP-1/GLP-1 двойной агонист, Глюкагон, Глюкагон –подобный пептид (GLP) 1, Глюкагон –подобный пептид (GLP) 2, Глюкоцереброзидаза (Церезим), Глютамат карбоксипептидаза (карбоксипептидаза G2), Глютаминаза, Колониестимулирующий фактор гранулоцитов (GCSF), Гормон роста, Гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), Гематид, Гепариназа, Гирудин, Human хорионический гонадотропин (hCG), дезоксирибонуклеаза человека I, Хуманин, Гиалуронидаза, Икатибант, Идуронат-2-сульфатаза (Элапраза), INGAP (Эксулин), Инсулин, Иризин, KAI-4169, Лепирудин (Рефлудан), Фактор ингибирования лейкемии, L-идуронидаза, ингибитор

Название белка/пептида
LRP5, ингибитор LRP6, лютеинизирующий гормон (LH), макрофагальный воспалительный белок 2 (ГроБета-Т CXC хемокин), Манноза-связывающий лектин, меланокортин-стимулирующий гормон, Метиониназа (МЕТаза), Миростипен, Ингибитор MUC1, Ингибитор миостатина, N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (Наглазим), Фактор роста нервов (Церебролизин), Нейропептид Y2, Нейрофилин, NU206, Онконаза (Ранпирназа), Онтак (IL-2-токсин), Опиоидный ростовой фактор, Оксинтомодулин, Окситоцин, Палиперидон, Панкреатический полипептид, Панцит, Паратироидный гормон (PTH), белок, высвобождающий паратироидный гормон (PTHrP), Пептид YY (3-36), Фенилаланин аммонийлиаза (PAL), Фенилаланин гидроксилаза (PAH), Активирующий полипептид аденилатциклазы гипофиза (PACAP), Ацетилгидролаза тромбоцит-активирующего фактора, POT-4 (APL-1), Прамлинтид, P-Селектин, Релаксин, рекДНКаза (Пульмозим), РНКаза, Санвар, Секретин, SN38, Соматостатин (Октеотид, Пазиреотид, Сандостатин и т.д.), Сомаверт (антагонист рецептора гормона роста человека), Фактор роста стволовых клеток, Супероксиддисмутаза, TACI, Ингибитор тромбина (прямой), Тромбомодулин, Тромбопоэтин (TPO), Тимозин альфа 1 (Тимальфазин), Тироид-стимулирующий гормон (TSH), Тиротропин-высвобождающий гормон, Тигапотид, Тканевый активатор плазминогена (tPA), TLN-232, Трипептидилпептидаза 1, Рецептор фактора некроза опухолей, Рецептор тирозинкиназы (TrkA), UGP281, Уратоксидаза, Уриказа, Урокортин 2, Активатор урокиназы плазминогена, Ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), Вазоактивный интестинальный пептид, Вазопрессин, Фактор фон Виллебранда (vWF), Зиконотид (Приалт), Цинк протопорфирин, Гормон надпочечного кортикотрофина (ACTH), CD25, Рецептор интерлейкина-1, Интерлейкин-21, ABCF1, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, ADORA2A, Аггрекан, AGR2, AICDA, AIF1, AIG1, AKAP1, AKAP2, AMH, AMHR2, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANPEP, APC, APOC1, APRIL, AR, AZGP1 (цинк-а-гликопротеин), A4 интегрин, B7, B7.1, B7.2, BAD, BAFF, BAG1, BAI1, BCL2, BCL6, BDNF, BLNK, BLR1 (MDR15), BlyS, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, BPAG1 (плектин), BRCA1, C19orf10 (IL27w), C3, C4A, C5, C5R1, CANT1, CASP1, CASP4, CAV1, CCBP2 (D6/JAB61), CCL1 (1-309), CCL11 (эотаксин), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL2 (MCP-1), MCAF, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), SLC, эксодус-2, CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/эотаксин-2), CCL25 (TECK), CCL26 (эотаксин-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCNA1, CCNA2, CCND1, CCNE1, CCNE2, CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-1RB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), CD164, CD19, CD1C, CD20, CD200, CD-22, CD24, CD28, CD3, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD11a (LFA-1 интегрин альфа L), CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD52, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD340, CDH1 (E-кадгерин), CDH10, CDH12, CDH13, CDH18, CDH19, CDH20, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CDKN1A (p21Wap1/Cip1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN1C, CDKN2A (p16INK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, CEBPB, CER1, CHGA, CHGB, Хитиназа, CHST10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (клаудин-7); CLN3; CLU (кластерин); cMET; CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1 (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA4; CTNNB1 (b-катенин); CTSB (катепсин B); CX3CL1 (SCYD1); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10(IP-10); CXCL11 (I-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Бонзо); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; эластаза; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB-2 (Her2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FIL1 (EPSILON); FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (фибронектин); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GFI1; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCC10 (C10); GRP; GSN (Гельзолин); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HER2; HGF; HIF1A; HIP1; гистамин и рецепторы гистамина; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFN-гамма; IFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2;

Название белка/пептида
IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (гликопротеин 130); IL7; IL7R; IL8; IL8RA; IL8RB; IL8RB; IL9; IL9R; ILK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; IRAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 интегрин); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b 4 интегрин); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC Бокс BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (Кератин 19); KRT2A; KRTHB6 (волососпецифичный кератин II типа); LAMA5; LEP (лептин); LFA3; LIGHT; Линго-p75; Линго-Трой; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG или Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; мидкин; MIF; MIP-2; MKI67 (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (металлотионектин-III); MTSS1; MUC1 (муцин); MYC; MYD88; NCK2; нейрокан; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-Линго; NgR-Hoго66 (Hoго); NgR-p75; NgR-Трой; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NR0B1; NR0B2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NRII2; NRII3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZ1; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; фосфакан; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21Rac2); RANKL; RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROBO2; RSV; SI00A2; SCGB1D2 (липофилин B); SCGB2A1 (маммаглобин 2); SCGB2A2 (маммаглобин 1); SCYE1 (эндотелиальный моноцит-активирующий цитокин); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5 (маспин); SERPINE1 (PAI-1); SERPINF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B (Spr1); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB111; TGFB2; TGFB3; TGFBI; TGFBR1; TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (тромбоспондин-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TIMP3; тканевый фактор; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAIP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18; TNFSF4 (лиганд OX40); TNFSF5 (лиганд CD40); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (лиганд CD27); TNFSF8 (лиганд CD30); TNFSF9 (лиганд 4-1BB); TOLLIP; Толл-подобные рецепторы (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 до TLR-13); TOP2A (топоизомераза Iia); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VAP1; VEGF; VEGFB; VEGFC; версикан; VHL C5; VLA-1; VLA-4; XCL1 (лимфотактин); XCL2 (SCM-1b); XCR1 (GPR5/CCXCR1); YY1; ZFPM2.

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

[00276] Белковые вещества, которые специально предусмотрены как нагрузочные вещества в предложенных композициях, являются следующими пептидами и белками:

[00277] “Натрийуретический пептид C-типа” или “CNP” обозначает белок человека (UniProt № P23582), кодируемый геном NPPC, который расщепляется до натрийуретического пептида – пептида C-типа из 22 аминокислот (CNP), несущий последовательность GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC, а также его видовые и синтетические варианты, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного пептида. CNP – это селективный агонист натрийуретического рецептора B-типа (NPRB) и, по сообщениям, является сильным стимулятором эндохондрального роста костей. CNP связывается со своим

рецептором, инициирует передачу внутриклеточных сигналов и, в конечном итоге, ингибирует механизм передачи сигнала FGFR3. Применение CNP назначается при ахондроплазии, обычной форме дисплазии скелета или синдроме "карлика-коротконожки" и расстройствах человеческого организма, вызванных мутациями участников механизма FGFR3, включая синдромы, влияющие на развитие скелета; например, гипохондоплазия [HCH], ACH, летальная дисплазия [TD]), заболевания кожи (эпидермальные невусы, себорейный кератоз, акантокератодермия) и раковые заболевания (множественная миелома [MM], карцинома простаты и рак мочевого пузыря, семиома) (Foldynova-Trantirkova S. Hum Mutat. (2012) 33:29). Период полувыведения пептида CNP-22, как сообщалось, равен 2,6 мин, из-за быстрого метаболизма нейтральной эндопептидазой и выведению клиренс-рецептором (Prickett T., 2004, Clinical Science, 106:535), что ограничивает применение этого пептида.

[00278] "Гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон" или "LHRH" обозначает белок человека (UniProt № P01148), кодируемый геном *GNRH1*, который процессируется в преоптическом переднем отделе гипоталамуса из препрогормона из 92-аминокислот в линейный декапептидный конечный продукт, имеющий последовательность пироGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2, а также его видовые и синтетические варианты, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного пептида. Гормон LHRH играет ключевую роль в регулировании блока гипофиз/половые железы и, таким образом, репродукции. Гормон LHRH проявляет свое действие посредством связывания с высоко-аффинными рецепторами на гипофизарных гонодотропных клетках с последующим высвобождением гормонов FSH и LH. Гормон LHRH найден в органах за пределами гипоталамуса и гипофиза из-за высокого процентного содержания в определенных раковых тканях, имеющих сайты связывания LHRH, и из-за того, что половые гормоны были замечены в развитии раковых заболеваний груди и простаты, гормональная терапия с помощью агонистов LHRH была утверждена или предлагается для лечения зависимых от половых гормонов болезненных состояний, таких как: эстроген-зависимый рак груди, рак яичников, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и андроген-зависимая карцинома простаты. Из-за того, что согласно сообщениям, период полувыведения составляет менее 4 минут, (Redding TW, et al. The Half-life, Metabolism and Excretion of Tritiated Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Man. J Clin Endocrinol. Metab.(1973) 37:626-631), его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00279] Название "циленгитид" обозначает синтетический циклический RGD пентапептид, имеющий последовательность Arg-Gly-Asp-Dphe-NmeVal или пептид с химическим названием 2-[(2S,5R,8S,11S)-5-бензил-11-{3-[(диаминометилиден)амино]пропил}-7-метил-3,6,9,12,15-пентаоксо-8-(пропан-2-ил)-1,4,7,10,13-пентаазациклопентадекан-2-ил]уксусная кислота (CAS

№ 188968-51-6). Циленгитид является селективным к αv интегринам, которые являются важными для ангиогенеза (формирования новых кровеносных сосудов). Связывание таких лигандов активирует интегрины для регулирования инвазии, миграции, пролиферации, выживания опухолевых клеток и ангиогенеза. В связи с этим, использование циленгитида для лечения глиобластомы путем ингибирования ангиогенеза находится в процессе исследования (Burke P, et al. Cilengitide targeting of αvβ3 integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts". Cancer Res (2002) 62(15): 4263–4272). Поскольку циленгитид имеет короткий период полувыведения 3-5 часов и слабую растворимость, ограничивающую максимальную концентрацию лекарственного вещества 15 мг/мл (O'Donnell PH. A phase I study of continuous infusion cilengitide in patients with solid tumors. Invest New Drugs (2012) 30:604), его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00280] "Гормон, высвобождающий гормон роста" или "GHRH" (также известный как рилизинг фактор ростового гормона, GRF, GHRF, соматолиберин или соматокринин" обозначает пептидный гормон из 44 аминокислот, синтезируемый в дугообразном ядре гипоталамуса, несущий последовательность YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL, а также его видовые и синтетические варианты, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного пептида, включая биологически активный укороченный пептид из 1-29 аминокислот YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSR. Гормон GHRH высвобождается нейросекреторными нервными окончаниями и переносится гипоталамо-гипофизарной портальной системой к передней доле гипофиза, где он воздействует на рецептор GHRH для стимуляции импульсного высвобождения гормона роста. Аналог GHRH – тезаморелин является утвержденным лекарственным препаратом для лечения липодистрофии у ВИЧ-пациентов при высокоактивной антиретровирусной терапии и также рассматривается для применения при истощении, центральном ожирение у пациентов с дефицитом гормона роста, мышечной атрофии, связанной с определенными хроническими заболеваниями, легком когнитивном нарушении и замещении гормона роста у пациентов с дефицитом гормона роста. Из-за того, что период полувыведения, как сообщалось, менее 15 минут, (Chapman IM. J Endocrinol (1991) 128:369-374), его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00281] "Пептид YY" и "PYY" обозначают пептид YY человека, полипептид (UniProt № P10082), синтетические версии, видовые варианты и варианты неприродных последовательностей, обладающие по меньшей мере часть биологической активности зрелого белка PYY. Как используется в данном тексте, пептид "PYY" включает обе основные

полноразмерные формы пептида человека из 36 аминокислот, PYY_{1-36} и доминирующая циркулирующая форма PYY_{3-36} (“PYY3-36”), которые несут свернутый структурный мотив PP. Пептид PYY3-36 обладает последовательностью IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH2. Пептид PYY синтезируется специализированными клетками эндокринной системы (L-клетками) в желудке после приема пищи у каждого человека и он ингибирует перистальтику желудка и повышает абсорбцию воды и электролитов в кишечнике. Пептид PYY также может подавлять секрецию поджелудочной железы. Встречающийся в природе PYY3-36 – это неселективный агонист рецепторов Y_1, Y_2, и Y_5. Гибридные белки этого изобретения, содержащие пептид PPY, могут найти особое применение при лечении диабета для регуляции метаболизма глюкозы, нарушений, устойчивых к инсулину и ожирения. Были получены аналоги пептидов PYY, описанные в патентах США №№ 5 604 203, 5 574 010 и 7 166 575. Из-за того, что период его полувыведения, как сообщалось, составил менее 1 часа, (Addison ML. A role for metalloendopeptidases in the breakdown of the gut hormone, PYY 3-36. Endocrinology (2011) 152(12):4630-4640) и он обычно назначался интраназальным путем введения три раза в день, его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00282] Термин “лептин” означает встречающийся в природе лептин (UniProt № P41159), который кодируется геном *Ob(Lep)*, синтетические версии, видовые варианты и варианты неприродных последовательностй, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого лептина. Лептин имеет последовательность VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQIL TSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVVALSR LQGSLQDMLWQLDLSPGC, и содержит дисульфидный мостик между остатками 97 и 147. Лептин играет ключевую роль в регуляции получения и расходования энергии, включая аппетит, метаболизм и массу тела. Лептин-содержащие полипептиды этого изобретения, могут найти особое применение при лечении диабета для регуляции метаболизма глюкозы, нарушений, устойчивых к инсулину, ожирения, врожденной/приобретенной липодистрофии, HAART-индуцированной липодистрофии, гипоталамической аменореи. Лептин клонировали, как описано в патент США № 7 112 659, а аналоги и фрагменты лептина – патент США № 5 521 283, патент США № 5 532 336, заявках PCT/US96/22308 и PCT/US96/01471. Благодаря коммерчески доступной форме, для метрелептина сообщался период полувыведения составивший 8-30 мин (Klein S., et al. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. Diabetes (1996) 45:984–987) и в большинстве действующих схем лечения лептином требуется его 1-2 разовое дозирование/сутки, его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00283] Название “прамлинтид” обозначает синтетический амилинмиметический пептид, имеющий последовательность KCNTATCATNRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH2, и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого прамлинтида или нативного амилина. Прамлинтид имеет последовательность, в которой аминокислоты последовательности амилина крысы замещены аминокислотами последовательности амилина человека. Амилин – это пептид из 37 ак, секретируемый b-клетками поджелудочной железы, который высвобождается совместно с инсулином импульсным образом, обычно в молекулярном соотношении 100 частей инсулина к 1 амилина. Действие амилина заключается в ингибировании опустошения желудка, секреции глюкагона, способствуют насыщению и прекращению приема пищи (Kong MF, et al. Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM. Diabetologia. (1997) 40:82–88). Прамлинтид используется как вспомогательное средство в инсулиновой терапии диабета 1 и 2 типов и показывает улучшение гликемического контроля и снижение потребности в инсулине, а также демонстрирует умеренное снижение массы тела (Neary MT, Batterham RL. Gut hormones: Implications for the treatment of obesity. Pharmacology & Therapeutics (2009)124:44-56). Поскольку у прамлинтида, по сообщениям, период полувыведения составляет 20 мин (McQueen, J. Pramlintide acetate. Am. J. Health-System Pharmacy (2005) 22:2363-2372) и он требует 2-3 разовое дозирование/сутки, его применение в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00284] Название “окситоцин” обозначает пептидный гормон млекопитающих (UniProt № P01178), имеющий последовательность CYIQNCPLG-NH2 и дисульфидный мостик между остатками 1 и 6, и его синтетические версии, такие как питоцин. Окситоцин главным образом действует как нейромодулятор в мозге, обладая структурой очень сходной к такой вазопрессина, они являются единственными известными гормонами, высвобождаемые задняя доля гипофиза человека, дествующие удаленно. Окситоцин обладает свойством вызывать сокращение матки, опосредованное специфическими высоко-аффинными рецепторами окситоцина, экспрессируемыми молочными железами и маткой; тем самым играя роль в родовом акте и процессе лактации. Окситоцин-содержащие полипептиды этого изобретения, могут найти особое применение при лечении аутизма, хрупкости X-хромосомы, хронической ежедневной головной боли и бесплодии мужчин.

[00285] Название “релаксин” обозначает белковый гормон, который представляет собой гетеродимер двух пептидных цепей из 24 и 29 аминокислот, связанных дисульфидными мостиками, образующийся из белка-предшественника из 185 аминокислот (UniProt № P04090); B-цепь, имеет последовательность DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS, а A-цепь, имеет последовательность QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC, с дисульфидными мостиками

между положениями B10-A10 и B23-A24, название также включает синтетические и рекомбинантные версии этого гормона. Релаксин продуцируется желтым телом во время менструального цикла и беременности у женщин и простатой у мужчин. Релаксин управляет многими физиологическими реакциями материнского организма на беременность, действует как системный и почечный сосудорасширяющий фактор, является кардиопротекторным и противофиброзным агентом. Релаксин связывается с рецептором релаксина (GPCR), увеличивает количество цАМФ и активирует PKC, PI3K и эндотелиальный рецептор типа B, что приводит к увеличенному образованию оксида азота и также активирует MAPK киназу, что может играть роль в обеспечении индуцированной релаксином экспрессии фактора VEGF. Релаксин-содержащие полипептиды этого изобретения, могут найти особое применение при лечении острой декомпенсированной сердечной недостаточности (ADHF). Поскольку опубликованный период полувыведения релаксина у людей составляет менее 10 мин (Dschietzig T, et al. Intravenous recombinant human relaxin in compensated heart failure: a safety, tolerability, and pharmacodynamic trial. J Card Fail. 2009;15:182–190), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00286] Названия “цендеритид” и “CD-NP” обозначают натрийуретический пептид-(32-53)-пептид C-типа человека (CNP-22) с натрийуретическим пептид-(24-38)-пептидом узкоголовой мамбы (Dendroaspis angusticeps), имеющий последовательность GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGCPSLRDPRPNAPSTSA, с дисульфидными мостиками между остатками 6 и 22. Этот химерный пептид имеет вазопротекторное и RAAS-подавляющее действие, посредством активации рецепторов гуанилилциклазы (GC)-A и GC-B, и он может потенциировать усиление почечного и сердечного выброса, при этом обладая минимальным гипотензивным действием. Соответственно, он может получить применение при лечении кардиоренальных заболеваний, таких как острая декомпенсированная сердечная недостаточность (ADHF) и острый инфаркт миокарда (AMI), особенно во время периода лечения “после купирования острых симптомов”.

[00287] “Пэгинесатид” или “гематид” – это пептид состоящий из двух синтетических пептидов из 21 аминокислоты, обладающих последовательностью GlyGlyLeuTyrAlaCysHisMetGlyProIleThr1NalValCysGlnProLeuArgSarLys, которые присоединен к лизину с азветленным полиэтиленгликолем. Пэгинесатид представляет собой новый аналог эритропоэтина, который обладает эритропоэтическими свойствами и разрабатывается для использования в медицине как средство для лечения анемии при хронической почечной недостаточности (CKD) у пациентов, не пребывающих на диализе.

[00288] Названия “оксимодулин” или “OXM” обозначают оксимодулин человека, его синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью

биологической активности зрелого оксимодулина. Оксимодулин является пептидом из 37 аминокислот, имеющим последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA, который синтезируется после приема пищи в интестинальных L-клетках толстого кишечника и содержит последовательность глюкагона из 29 аминокислот с карбокситерминальным дополнением из 8 аминокислот. Оксимодулин – это агонист рецептора глюкагона и GLP-1R, его аноректичное действе вероятно опосредовано влиянием на последний рецептор. Было обнаружено, что OXM подавляет аппетит. OXM-содержащие полипептиды этого изобретения, могут найти особое применение при лечении диабета для регуляции метаболизма глюкозы, нарушений, устойчивых к инсулину, ожирения и может использоваться при лечении потери массы. Для нативного оксимодулина сообщали его период полураспада в плазме человека ~12 мин (измерено анализом с перекресным взаимодействием с глюкагоном; Schjoldager BT. Oxyntomodulin: a potential hormone from the distal gut. Pharmacokinetics and effects on gastric acid and insulin secretion in man. Eur J Clin Invest. (1988) 18(5):499-503.), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00289] Сокращения “POT4” или “APL-1” обозначают синтетический циклический пептид, имеющий последовательность H-Ile-[Cys-Val-Val-Gln-Asp-Trp-Gly-His-His-Arg-Cys]-Thr-NH2. POT4 более сильный ингибитор фактора C3 комплемента чем компстатин, который ингибирует расщепление нативного фактора C3 на его активные фрагменты C3a и C3b, и он имеет пролонгированный период полувыведения 8 часов в условиях in vivo. Его предполагают использовать для предупреждения воспалений, повреждения и повышенной экспрессии ангиогенных факторов как VEGF при таких заболеваниях как связанная с возрастом дегенерация желтого пятна (AMD), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), астма и COPD.

[00290] Названия “интерферон-лямбда”, “IFN-λ”, “интерлейкин-29” и “IL-29” обозначают интерлейкин человека (UniProt № Q8IU54 (20-200)), который кодируется геном *IL29*, имеющим последовательность GPVPTSKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRLL QVRERPVALEAELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGR LHHWLHRLQEAPKKESAGCLEASVTFNLFRLLTRDLKYVADGNLCLRTSTHPEST, их рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого IL-29. Интерферон II типа – IL-29 передает стгнал через гетеродимерный рецепторный комплекс (рецепторные цепи IL-10R2 и IL-28Rα), отличающиеся от IFN I типа (рецепторный комплекс IFNAR1/IFNAR2), и играет важную роль в развитии невосприимчивости к вирусам. Примечательно, что рецептор IL-29

экспрессируется на высоком уровне в гепатоцитах, первичном сайте возникновения HCV-инфекции, но незначительно экспрессируется в иммунных клетках или клетках костного мозга. Для пэгилированных версий период полувыведения составляет 50-70 часов.

[00291] Названия “интерферон-бета” или “IFN-ß” обозначают белок человека, который кодирует ген *IFNB1*, имеющий последовательностьMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQ FQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTR GKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого IFN-ß. IFN-ß синтезируется различными типами клеток, включая фибробласты и макрофаги и является медиатором антивирусного, антипролиферативного и иммуномодулирующего действия в ответ на вирусную инфекцию и другие биологические индукторы. Связывание IFN-ß со специфическими рецепторами на поверхности клеток человека инициирует каскад внутриклеточных событий, которые ведут к экспрессии многочисленных продуктов интерферон-индуцированных генов, таки как 2',5'-олигоаденилатсинтаза, ß2-микроглобулин и неоптерин. Эти генные продукты обычно используются в качестве биомаркеров в клинических условиях. IFN-ß используется при лечении различных форм рассеянного склероза (РС), включая проходящий ремиссию MS, вторичный прогрессирующий РС, первичный прогрессирующий РС, ювенильные проявления РС и клинически изолированные синдромы суггестивного РС. Коммерчески доступные формы IFN-ß, по сообщениям, обладает периодом полувыведения от 4 до 67 часов и требуют частое дозирование, такое, что их применение в качестве лекарственных средств является ограниченным.

[00292] “С-пептид” обозначает белок поджелудочной железы человека, имеющий последовательность EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого С-пептида. С-пептид – это средний сегмент проинсулина, который находится между N-концом В-цепи и С-концом А-цепи и отщепляется от препроинсулина, когда образуется и секретируется зрелый инсулин. Циркулирующий С-пептид связывается с рецептором, который вероятно является сдвоенным G-белком и получаемый сигнал активирует Ca2+-зависимый внутриклеточные сигнальные механизмы, такие как MAPK, PLCγ и PKC, что приводит к повышению экспрессии ряда факторов транскрипции, а также повышению активности фермента eNOS и Na+K+АТФазы. С-пептид рассматривается для лечения диабетических осложнений и диабетической нефропатии. Так как установленный период полувыведения составляет около 30 минут (Matthews DR. The half-life of endogenous

insulin and C-peptide in man assessed by somatostatin suppression. Clin Endocrinol (Oxf). (1985) 23(1):71-79), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00293] "Грелин" обозначает гормон человека, имеющий последовательность GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR, его укороченные, рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного грелина, включая нативную процессированную последовательность из 27 или 28 аминокислот и гомологические последовательности. Грелин индуцирует насыщение, или его виды и варианты не встречающихся в природе последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности зрелого грелина, включая нативную процессированную последовательность из 27 или 28 аминокислот и гомологические последовательности. Грелин синтезируется в основном P/D1-клетками, выстилающими дно желудка человека и эпсилон-клетками поджелудочной железы, которые стимулируют чувство голода, он рассматривается как заместительный гормон для лептина. Уровни содержания грелина возрастают перед приемом пищи и снижаются после еды, что может приводить к повышенному потреблению пищи и увеличивать жировую массу посредством влияния, выявляемого на уровне гипоталамуса. Грелин также стимулирует высвобождение гормона роста. Грелин ацилируется по сериновому остатку n-октановой кислотой; это ацилирование является необходимым для связывания с рецептором GHS1a и для проявления агонистической активности и GH-высвобождающую способность грелина. Грелин-содержащие полипептиды этого изобретения могут найти особое применение в качестве агонистов; например, для селективного стимулирования перистальтики ЖК-тракте при нарушениях моторики желудочно-кишечного тракта, для ускорения освобождения желудка или при стимулировании высвобождения гормона роста. В данном изобретении также предусмотрены неацилированные формы и варианты последовательностей грелина, которые действуют антагонистами. Аналоги грелина с заместителями в последовательности или укороченные варианты, такие как описанные в патенте США № 7 385 026, могут найти особое применение как участники гибридизации с полипептидами XTEN для использования в качестве антагонистов для улучшения гомеостаза глюкозы, лечения инсулиновой резистентности и лечения ожирения, раковой кахексии, послеоперационной кишечной непроходимости, нарушений пищеварения и желудочно-кишечных расстройств. Сообщалось об изоляции и определении характеристик грелина (Kojima M, *et al.*, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. 1999;402(6762):656-660) и пептидным синтезом были получены синтетические аналоги, как описано в патенте США № 6 967 237. Так как для грелина сообщалось о периоде полувыведения 10-30 мин (Akamizu T, et al. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite

effects of ghrelin administration in young healthy subjects. Eur J. Endocrinology (2004)150(4):447–455), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено, и его аналоги с октильной боковой группой у нативной аминокислоты серина в положении 3 вместо нативной октаноиловой боковой группы могут выявлять дополнительной устойчивостью к протеазам.

[00294] "Фоллистатин" также известный как "активин-связывающий белок" или "FSH-супрессирующий белок (FSP)," означает белок, который у людей кодируется геном *FST*. Как используется в данном тексте, "фоллистатин" включает гомологи, видовые варианты, варианты последовательности и их фрагменты. Зрелая форма белка у людей имеет 315 аминокислот, обозначается как FS-315 и была клонирована (патенты США №№ 5 041 538 и 5 182 375). Фоллистатин содержит два потенциальных сайта N-гликозилирования, Asn95 и Asn259, однако, было продемонстрировано, что мутации этих сайтов с последующим испытанием этого рекомбинантного белка на способность ингибировать экспрессию FSH и связывать активин, обеспечивает для каждого мутанта сходными свойствами с немутировавшим рекомбинантным белком hFS-315, что наводит на предположение об отсутствии влияния гликозилирования на функции молекулы фоллистатина (Inouye, S., et al. Site-specific mutagenesis of human follistatin. BBRC (1991) 179(1):352–358). Фоллистатин свиньи описан в публикации Ueno et al., PNAS:USA 84:8282-8286 (1987), а фоллистатин коровы описан в публикации Robertson et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 149:744-749 (1987). Так как белки морфогенеза костей и факторы роста/дифференциации, такие как активин и миостатин обладают способностью индуцировать рост, образование, дифференцирование и поддержание различных тканей, включая кости, хрящи, сухожилия/связки, мышцы, нервные ткани и разные органы, их нейтрализация фоллистатином и агонистами фоллистатина имеют терапевтическое значение (патенты США №№ 5 545 616, 5 041 538, и AU9675056). Так как фоллистатин, введенный пациенту, быстро удаляется из кровотока, с определенным на крысах конечным периодом полувыведения чуть больше 2 часов (Kogure K , et al. Intravenous administration of follistatin: delivery to the liver and effect on liver regeneration after partial hepatectomy. Hepatology. (1996) 24(2):361-366), применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00295] Названия "вазоактивный интестинальный полипептид" и "VIP" обозначают пептидный гормон из 28 аминокислот (UniProt № P01282 (125-152)), который кодируется геном *VIP*, имеющий последовательность HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN-NH2 и, их рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного VIP. Пептид VIP синтезируется во многих тканях, включая желудок, поджелудочную железу и супрахиазматическое ядро

гипоталамуса в мозге. Пептид VIP стимулирует сократительную способность сердца, расширение кровеносных сосудов, повышает гликогенолиз, снижая артериальное давление крови и расслабляя гладкую мускулатуру трахеи, желудка и желчный пузырь. Изменения в концентрации, связанные с миокардиальным фиброзом, параличом сердца, кардиомиопатией и легочной гипертензией, а также его дефицитом в системе органов дыхания считается патогенетическим фактором при заболевании легких (Said SI, 2007, Circulation, 115: 1260; Said SI, 2008, Ann N Y Acad Sci, 1144:148; Petkov V et.al., 2003, J Clin Invest, 111:1339). Пептид VIP рассматривается в связи с применением для лечения устойчивой гипертензии, первичной легочной артериальной гипертензии (PAH), астмы, COPD, диабета, эректильной дисфункции и сексуальной дисфункции у женщин. Так как период его полувыведения определен равным приблизительно 1 минуте (Domschke S, et al. Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. Gut (1978) 19:1049–1053), то применение немодифицированного белка в качестве лекарственного препарата ограничено.

[00296] "Фузеон" обозначает пептид из 36 аминокислот, производный gp41 ВИЧ, вирусного белка, участвующего в слиянии вириона ВИЧ с рецептором CD4+ Т-клеток, имеющий последовательность YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательности, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного gp41. Фузеон и его мультимеры или конъюгаты с родственными пептидами используются или рассматриваются для использования в лечении устойчивых форм ВИЧ-инфекции. Так как период полувыведения фузеона у пациентов, требующих частых инъекционных введений составляет 3,8 часов, то его применение ограничено.

[00297] Обозначение "KAI-4169" относится к пептидному агонисту кальций-распознающего рецептора (CaSR) на поверхности клеток человека, разрабатываемого компанией KAI Pharma для лечения вторичного гиперпаратиреоза (SHPT) у пациентов с заболеваниями почек и поражением костей (CKD-MBD).

[00298] "Пазиреотид" обозначает аналог соматостатина, имеющий химическое название [(3S,6S,9S,12R,15S,18S,20R)-9-(4-аминобутил)-3-бензил-12-(1H-индол-3-илметил)-2,5,8,11,14,17-гексаоксо-15-фенил-6-[(4-фенилметоксифенил)метил]-1,4,7,10,13,16-гексазабицикло[16.3.0]геникозан-20-ил] N-(2-аминоэтил)карбамат, используемый для лечения болезни Кушинга. Пазиреотид – это мультирецепторный аналог соматостатина с высокой связывающей аффинностью с R-подтипами соматостатина R1, 2, 3 и 5, который подавляет секрецию гормона роста, IGF-1 и адренокортикотропного гормона. Кроме лечения болезни Кушинга, он также рассматривается для использования в лечении акромегалии, нейроэндокринных заболеваний, заболеваний печени, симптоматического полициститного

заболевания печени, нейроэндокринных опухолей, лимфангиолейкомиоматоза, наследственного гиперинсулинизма, рецидивирующей и прогрессирующей менингиомы и других эндокринных нарушений. Так как для коммерчески доступной формы определен период полувыведения от 12 до 17 часов (Petersenn, S. et al. Tolerability and Dose Proportional Pharmacokinetics of Pasireotide Administered as a Single Dose or Two Divided Doses in Healthy Male Volunteers: A Single-Center, Open-Label, Ascending-Dose Study. Clinical Therapeutics (2012) 34:677-688), то его использование ограничено.

[00299] "Иризин" обозначает продукт расщепления белка, кодируемого геном FNDC5 и имеющим последовательность DSPSAPVNVTVRHLKANSAVVSWDVLEDEVVIGFAISQQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALW DLEEDTEYIVHVQAISIQGQSPASEPVLFKTPREAEKMASKNKDEVTMKE, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного иризина. Иризин является медиатором благоприятного действия при мышечных нагрузках и индуцирует окисление белой жировой ткани путем повышения экспрессии гена UCP1 через активизацию ядерного рецептора PPARA. Как показано, небольшое увеличение концентраций иризина приводит к увеличению расхода энергии, снижению массы тела и улучшению индуцированной диетой невосприимчивости к действию инсулина (Bostrom P, 2012, Nature, 481:463). Иризи рассматривается для применения в лечении ожирения, диабета и нарушений обмена веществ.

[00300] "TXA127" и "PanCyte" являются аналогами ангиотензина (1-7), TXA127 имеет последовательность NRVYIHP, а PanCyte – циклическим аналогом, связанным 4-м и 7-м остатками с dAла и Ала, соответственно, что делает его более устойчивым к деградации и увеличению периода полувыведения. Эти аналоги связываются с MAS-рецептором и стимулируют ранние гемапоэтические клетки-предшественники в костном мозге и также обладающие сосудорасширяющим, противотрофическим, противофиброзным, натрийуретическим, противовоспалительным и антитромботическим действиями. Эти вещества рассматриваются относительно использования для ускорения восстановления количества тромбоцитов при трансплантации стволовых клеток у пациентов с опухолями системы крови, такими как: острая миелогенная лейкемия (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хроническая миелогенная лейкемия (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома Ходжкина (HL) или не-Ходжкина лимфома (NHL) и множественная миелома, а также для применения в лечении легочного фиброза, острого повреждения легких, легочной артериальной гипертензии и фиброза почек и печени.

[00301] Названия “интерлейкин-7” и “IL-7” обозначают интерлейкин человека (UniProt № P13232 (26-177)), который кодируется геном *IL7* и имеющий последовательность DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARK LRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKK LNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH, а также его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного IL-7. IL-7 стимулирует дифференцирование мультипотентных (плюрипотентных) гематопоэтических стволовых клеток в лимфоидных клетках-предшественниках, включая развитие CD4/CD8 Т-клеток. IL-7 лимитирует выработку суппрессорных регуляторных Т-клеток и через антагонизм к фактору TGF-B вызывает анэргию Т-клеток, а также поддерживает образование центральных Т-клеток памяти. IL-7 рассматривается для использования при лечении лимфопении при ВИЧ, онкологии, трансплантациях, HBV- и HCV-инфекциях, а также при лечении минимальной остаточной болезни или опухолей на поздней стадии, а также может играть роль при восстановлении или улучшении иммунотерапии. Так как для IL-7 определенный период полувыведения у людей составил приблизительно 10 часов (Sportès, C. et al. Phase I Study of Recombinant Human Interleukin-7 Administration in Subjects with Refractory Malignancy. Clin Cancer Res 2010;16:727-735),), то его применение в немодифицированной форме ограниченно.

[00302] Названия “фактор роста фибробластов 18” или “FGF-18” относятся к белку человека (UniProt № O76093(28-207)), который кодируется геном *FGF18*, имеющий последовательность EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYAQLLVE TDTFGSQVRIKGKETEFYLCMNRKGKLVGKPDGTSKECVFIEKVLENNYTALMSAKYSGWY VGFTKKGRPRKGPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTKRSRRIRPTHPA и его рекомбинантным и синтетическим версиям и последовательностям вариантов, обладающих по меньшей мере частью биологической активности нативного FGF-18. FGF-18 – это белковый фактор семейства факторов роста фибробластов (FGF). Факторы семейства FGF обладают различными видами митогенной и обеспечивающей выживание клеток активностью, а также вовлечены в разнообразные биологические процессы, включая развитие эмбриона, клеточный рост, морфогенез, репарацию тканей, рост и инвазию опухолей. При исследованиях in vitro показано, что этот белок способен индуцировать отрастание нейритов у PC12-клеток. FGF-18 стимулирует пролиферацию хондроцитов и остеобластов (клетки, которые образуют и поддерживают клеточные и хрящевые ткани), а его использование рассматривается в отношении репарации и генерации хрящевой ткани, например в коленных суставах (Ellsworth JL. Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors. Osteoarthritis Cartilage (2002) 10:308-320).

[00303] “Гормон, стимулирующий альфа-меланоциты” или “α-MSH” является пептидом из 13 аминокислот, образующийся как продукт протеолитического расщепления из гормона ACTH (1-13), который в свою очередь является продуктом расщепления проопиомеланокортина (POMC), имеющий последовательность N-Ac-SYSMGFRWGLPV, и его синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного α-MSH. Альфа-MSH – неселективный агонист меланокортиновых рецепторов MC1, MC3, MC4 и MC5, но не MC2 (который является специфическим для ACTH). Альфа-MSH стимулирует меланоциты синтезировать и высвобождать меланин, который обладает фотопротекторным действием; он передает сигналы в мозг, которые влияют на аппетит и сексуальное возбуждение. Он рассматривается в качестве применения для лечения эритропоэтической протопорфирии (EPP, непереносимости солнца), несегментального витиллиго (обесцвечивание кожи), актинический кератоз (AK, солнечный керацитоз, предшественний рака кожи), полиморфного фотодерматоза (PLE/PMLE), послеоперационного повреждения почек, эректильной и сексуальной дисфункций. Из-за того, что его период полувыведения исчисляется всего лишь секундами, то его применение в немодифицированной форме ограниченно.

[00304] Термин “эндостатин” обозначает встречающийся в природе С-концевой фрагмент массой 20 кДа, который происходит из коллагена XVIII типа (UniProt. № P39060(1572-1754)), имеющий последовательность HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRR ADRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFDGKDVLRHPTWPQKSVWHGSDP NGRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMTASK, , и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного эндостатина. Эндостатин – это ингибитор ангиогенеза и он может взаимодействовать с про-ангиогенным действием факторов роста, таких как основной фактор роста фибробластов (bFGF/FGF-2) и VEGFEго рассматривают для лечения некоторых видов рака. Из-за того, что его период полувыведения составляет 13 часов (Thomas, JP et al. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. J. Clin. Oncol. (2003) 21:223-231), то его применение в немодифицированной форме ограниченно.

[00305] Название “хуманин” обозначает пептид (UniProt № Q8IVG9(1-24)), кодируемый геном MT-RNR2, имеющий последовательность MAPRGFSCLLLLTSEIDLPVKRRA, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного хуманина. Хуманин играет роль в нейрозащите от клеточной смерти, связанной с болезнью Альцгеймера (AD), AD-

сопутствующего инсульта, прион-индуцированного апоптоза и химически индуцированного нейронального повреждения (Hashimoto, Y, A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Aβ. PNAS (2001) 98:6336-6341). Недавно обнаружено, что хуманин помогает улучшить действие инсулина и снижает уровни глюкозы в крови (Muzumdar RH, Humanin: A Novel Central Regulator of Peripheral Insulin Action. PLoS One (2009) 4:e6334). Рассматривается использование хуманина при лечении болезни Альцгеймера, диабета и сосудистых и сердечнососудистых заболеваний.

[00306] Название "глюкагон" обозначает глюкозорегулирующий пептид – глюкагон человека, имеющий последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного глюкагона. Термин "глюкагон", используемый в данном тексте, также включает пептидные миметики глюкагона. Нативный глюкагон синтезируется поджелудочной железой, высвобождаемый, когда уровни глюкозы падают очень низко, и вызывающий в печени конверсию запасенного гликогена в глюкозу и ее выделение в кровоток. Так как действие глюкагона противоположно действию инсулина, который передает сигнал клеткам организма захватывать глюкозу из крови, глюкагон также стимулирует высвобождение инсулина так, что вновь доступная в кровотоке глюкоза может поступать и использоваться инсулин-зависимыми тканями. Глюкагон-содержащие пептиды данного изобретения могут найти особое применение в увеличении уровней глюкозы в крови индивидов с имеющимися запасами глюкозы в печени и поддержания гомеостаза глюкозы при диабете. Глюкагон был клонирован, как описано в патенте США № 4 826 763.

[00307] "Глюкагон-подобный белок-1" или "GLP-1" обозначает глюкагон-подобный пептид-1 человека и его варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного GLP-1.Термин "GLP-1" включает GLP-1(1-37) человека, имеющий последовательность HDEFERHAEGTFTSDVSSTLEGQAALEFIAWLVKGRG, GLP-1(7-37) и GLP-1(7-36)амид. GLP-1 стимулирует секрецию инсулина, но только во время периодов гипергликемии. Безопасность GLP-1, благодаря этому качеству и тому наблюдению, что количество секретированного инсулина пропорционально интенсивности гипергликемии, выше по сравнению с инсулином. Биологический период полувыведения GLP-1(7-37)OH составляет всего лишь 3-5 минут (Пат США № 5 118 666). GLP-1-содержащие полипептиды этого изобретения, могут найти особое применение при лечении диабета и нарушений метаболизма, устойчивых к инсулину, для регуляции глюкозы. GLP-1 был клонирован и получены его производные, как описано в патенте США № 5 118 666.

[00308] "Глюкагон-подобный белок-2" или "GLP-2" собирательно в данном тексте обозначает глюкагон-подобный пептид-2 человека, имеющий последовательность

HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD, видовые гомологи GLP-2 человека и не встречающиеся в природе варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного GLP-2, включая такие варианты как, в числе прочего, вариант с глицином, замещающим аланин в положении 2 зрелой последовательности, что обеспечивает получение последовательности HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (“2G”), а также с Val, Glu, Lys, Arg, Leu или Ile, замещающие аланин в положении 2. GLP-2 или его варианты последовательностей были изолированы, синтезированы, описаны или клонированы, как описано в Патентах или Заявках США №№ 5 789 379; 5 834 428; 5 990 077; 5 994 500; 6 184 201; 7 186 683; 7 563 770; 20020025933 и 20030162703.

[00309] “Инсулин” обозначает инсулин человека или его гомолог, видовые варианты или варианты последовательностей, которые включают, в числе прочего, зрелый белок инсулина человека, состоящий из 51 аминокислоты с молекулярным весом 5808 Да и предшественник проинсулин из 110 аминокислот. Белок-предшественник процессируется в зрелый инсулин, который имеет A-цепь с последовательностью GIVEQCCTSICSLYQLENYCN и B-цепь с последовательностью FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT, связанные вместе дисульфидными связями.

[00310] “A-цепь фактора XIII”, “FXIIIA” или “F13A” обозначает белок свертывания крови (UniProt № P00488(2-732)), имеющий последовательность SETSRTAFGGRRAVPPNNSNAAEDDLPTVELQGVVPRGVNLQEFLNVTSVHLFKERWDTNKV DHHTDKYENNKLIVRRGQSFYVQIDFSRPYDPRRDLFRVEYVIGRYPQENKGTYIPVPIVSELQ SGKWGAKIVMREDRSVRLSIQSSPKCIVGKFRMYVAVWTPYGVLRTSRNPETDTYILFNPWC EDDAVYLDNEKEREEYVLNDIGVIFYGEVNDIKTRSWSYGQFEDGILDTCLYVMDRAQMDLS GRGNPIKVSRVGSAMVNAKDDEGVLVGSWDNIYAYGVPPSAWTGSVDILLEYRSSENPVRY GQCWVFAGVFNTFLRCLGIPARIVTNYFSAHDNDANLQMDIFLEEDGNVNSKLTKDSVWNY HCWNEAWMTRPDLPVGFGGWQAVDSTPQENSDGMYRCGPASVQAIKHGHVCFQFDAPFVF AEVNSDLIYITAKKDGTHVVENVDATHIGKLIVTKQIGGDGMMDITDTYKFQEGQEEERLALE TALMYGAKKPLNTEGVMKSRSNVDMDFEVENAVLGKDFKLSITFRNNSHNRYTITAYLSANI TFYTGVPKAEFKKETFDVTLEPLSFKKEAVLIQAGEYMGQLLEQASLHFFVTARINETRDVLA KQKSTVLTIPEIIIKVRGTQVVGSDMTVTVQFTNPLKETLRNVWVHLDGPGVTRPMKKMFREI RPNSTVQWEEVCRPWVSGHRKLIASMSSDSLRHVYGELDVQIQRRPSM, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного FXIIIA. Фактор XIII является последним ферментом в каскаде свертывания крови и отвечает за перекрестное связывание молекул фибрина друг к другу в новообразующегося сгустка крови. Образование

внутримолекулярных ковалентных связей между мономерами фибрина и перекрестное связывание альфа-2 антиплазмина, фибриногена, фибронектина, коллагена и других белков для усиления механической прочности фибринового сгустка защищает от протеолитической деградации и обеспечивает стабильность внутриклеточного матрикса. FXIII плазмы циркулирует в виде гетеротетрамера, состоящего из 2 A-субъединиц и 2 B-субъединиц нековалентно связанные вместе и присоединенные к фибриногену. B-субъединица, которая, как оказалось, стабилизирует структуру A-субъединицы и защищает A-субъединицу от протеолиза, обычно присутствует в плазме в избытке как свободная B-субъединица FXIII. Большинство пациентов с дефицитом FXIII несут мутации в субъединице A FXIII; в некоторых случаях сообщалось о наличии у пациентов мутаций в субъединице B FXIII (Mikkola H, 1996, Semin Thromb Hemost, 22:393; Ichinose A, 1996, Semin Thromb Hemost, 22:385). FXIIIA используется или предполагается использовать при лечении гемофилии и связанной с ней коагулопатии, наследственного дефицита FXIII и приобретенного дефицита FXIII из-за хронического заболевания печени, воспалительных заболеваний кишечника и послеоперационного кровотечения.

[00311] “Фактор X” или “FX” обозначает белок свертывания крови (UniProt № P00742(2-488)), имеющий последовательность GRPLHLVLLSASLAGLLLLGESLFIRREQANNILARVTRANSFLEEMKKGHLERECMEETCSY EEAREVFEDSDKTNEFWNKYKDGDQCETSPCQNQGKCKDGLGEYTCTCLEGFEGKNCELFT RKLCSLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADNGKACIPTGPYPCGKQTLERRKRSVAQ ATSSSGEAPDSITWKPYDAADLDPTENPFDLLDFNQTQPERGDNNLTRIVGGQECKDGECPW QALLINEENEGFCGGTILSEFYILTAAHCLYQAKRFKVRVGDRNTEQEEGGEAVHEVEVVIKH NRFTKETYDFDIAVLRLKTPITFRMNVAPACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQS TRLKMLEVPYVDRNSCKLSSSFIITQNMFCAGYDTKQEDACQGDSGGPHVTRFKDTYFVTGI VSWGEGCARKGKYGIYTKVTAFLKWIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK, и его рекомбинантные и синтетические версии и варианты последовательностей, обладающие по меньшей мере частью биологической активности нативного FX. Фактор X при активации с помощью фактора IX (со своим кофактором, фактором VIII, для образования комплекса, известного как внутренняя Хаза) и фактора VII со своим кофактором, тканевым фактором (для образования комплекса, известного как внешняя Хаза) превращается в фактор Xa. Фактор X – это первый участник завершения обычного (или тромбинового) пути. Фактор X применяется для лечения дефицита фактора X, гемофилии A и B, используя обходные стратегии из-за того, что у пациентов, принимающих факторы FVIII и FIX, развиваются ингибирующие антитела к препаратам FVIII и FIX заместительной терапии), неотложной терапии пациентов с кровоизлияниями из-за передозировки антикоагулянтами или критическими кровотечениями

неизвестного происхождения и для пациентов, у которых развился приобретенный дефицит FX, обусловленный недостатком витамина K, амилоидоз, тяжелые заболевания печени и при использовании антикоагулянтов (например, варфарина). Так как период полувыведения зрелого фактора X составляет 40-45 часов, период полувыведения активированного фактора X (Fxa) в плазме составляет <1-2 минут ((Bunce MW, 2008, Blood, 117:290), то это делает применение его немодифицированной формы ограниченным, из-за бытрой инактивации антитромбином III и TFP1.

4. Нуклеиновые кислоты как нагрузочные вещества

[00312] Данное изобретение также подразумевает использование нуклеиновых кислот как нагрузочных веществ в XTEN-конъюгатах. В одном осуществлении в этом изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, в которых нагрузочное вещество выбирается из группы, состоящей из аптамеров, антисмысловых олигонуклеотидов, рибозимных нуклеиновых кислот, РНК-интерферирующих нуклеиновых кислот и антигенных нуклеиновых кислот. Такие нуклеиновые кислоты используются как лекарственные средства, известные в этой области (Edwin Jarald, Nucleic acid drugs: a novel approach. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (12):662-666, 2004; Joanna B. Opalinska. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. Nature Reviews Drug Discovery 1:503-514, 2002).

IV). КОНЪЮГАТЫ XTEN-КРОСС-ЛИНКЕРОВ И XTEN-НАГРУЗОЧНЫХ ВЕЩЕСТВ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТАКИХ КОНЪЮГАТОВ

[00313] Настоящее изобретение относится к высокоочищенным препаратам конъюгационных составов XTEN-кросс-линкер, которые можно использовать в качестве участников конъюгации, к которым присоединяются нагрузочные вещества, как описано в данном тексте. Также изобретение относится к высокоочищенным препаратам нагрузочных веществ, связанных с одним или более XTEN при помощи участников конъюгации XTEN-кросс-линкер. Настоящее изобретение включает в себя композиции и способы получения конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, образованных путем связывания любого из описанных в данном тексте XTEN с нагрузочным веществом, а также химически активные композиции и способы получения композиций, образованных путем конъюгации XTEN с кросс-линкером, или другие описанные в данном тексте химические способы. В частности, отмечается, что термины “XTEN-нагрузочное вещество” и “XTEN-кросс-линкер” включают в себя связанные с ними продукты реакции, которые остаются после конъюгации реагирующих веществ – участников конъюгации, включая продукты реакции кросс-линкеров, реактантов клик-химии или других описанных в данном тексте методов.

[00314] В некоторых вариантах реализации XTEN, применяемые для создания конъюгатов, являющихся объектами изобретения, содержат XTEN, выбранные из любой последовательности в Таблице 2, Таблице 3 и Таблицах 22-25, которые могут быть связаны с нагрузочным веществом прямо или посредством описанных в данном тексте кросс-линкеров. В других вариантах реализации один или более из XTEN, применяемых для создания конъюгатов, являющихся объектами изобретения, содержат в отдельности последовательность XTEN, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или, в другом варианте, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с XTEN, выбранным из Таблиц 2, 3 и 22-25 или его фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В одном варианте реализации конъюгаты, являющиеся объектами изобретения, являются мультимерными, что означает, что они содержат первую и вторую последовательность XTEN, при этом XTEN являются одинаковыми либо разными и каждый в отдельности содержит последовательность XTEN, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или, в другом варианте, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с XTEN, выбранным из Таблиц 2, 3 и 22-25 или его фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В другом варианте реализации конъюгаты, являющиеся объектами изобретения, являются мультимерными, что означает, что они содержат первую, вторую и третью последовательность XTEN, при этом XTEN являются одинаковыми либо разными и каждый в отдельности содержит последовательность XTEN, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или, в другом варианте, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с XTEN, выбранным из Таблиц 2, 3 и 22-25 или его фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сравнимой длины. В другом варианте реализации конъюгаты, являющиеся объектами изобретения, являются мультимерными, что означает, что они содержат 3, 4, 5, 6 или более последовательностей XTEN, при этом XTEN являются одинаковыми либо разными и каждый в отдельности содержит последовательность XTEN, обладающую по меньшей мере 80% идентичности в последовательностях, или, в другом варианте, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности в последовательностях по сравнению с XTEN, выбранным из Таблиц 2, 3 и 22-25 или его фрагментом. В мультимерных конъюгатах суммарная длина остатков в последовательностях XTEN является большей, чем от около 200 до около 3000 или от около 400 до около 1000

аминокислотных остатков, а XTEN могут являться одинаковыми либо разными по последовательности или по длине. При употреблении в данном тексте подразумевается, что суммарная длина включает в себя общую длину в аминокислотных остатках, в случае, когда более одного XTEN включено в состав конъюгата.

[00315] В одном аспекте изобретения предложены композиции из XTEN, ковалентно связанных с низкомолекулярным нагрузочным лекарственным веществом, что приводит к образованию конъюгата XTEN-лекарственное вещество ("XTEN-D" ("D" – от англ. "drug")). В другом аспекте изобретения предложены композиции из XTEN, ковалентно связанных с нагрузочными биологически активными белками (которые включают в себя пептиды или полипептиды), что приводит к образованию конъюгата XTEN-пептид/полипептид ("XTEN-P" ("P" – от англ. "peptide")). В другом аспекте изобретения предложены композиции из одного или более XTEN, рекомбинантно связанных с нагрузочным пептидом или полипептидом, что приводит к образованию рекомбинантного гибридного белка XTEN-пептид/полипептид ("XTEN-PR" ("PR" – от англ. "recombinant" и "peptide")). В другом аспекте изобретения предложены композиции из одного или более XTEN, связанных с нагрузочными веществами из одного или более лекарственных веществ или одного или более белков, которые могут быть биологически активными или могут являться нацеленными веществами. В частности, в изобретении предложены отдельные композиции XTEN-D, XTEN-P, XTEN-PR и XTEN-D-P, которые могут применяться для лечения болезненного состояния, для которого в данной области известно, что введение нагрузочного лекарственного вещества и/или белка является целесообразным для лечения, улучшения или предотвращения заболевания или болезненного состояния пациента. В общем случае конъюгаты XTEN-D содержат один или более из следующих компонентов: 1) XTEN; 2) кросс-линкер; и 3) нагрузочное вещество, к которому XTEN присоединен химическим способом, прямо или посредством кросс-линкера, такого, как описанные в данном тексте коммерчески доступные кросс-линкеры, или посредством реактантов клик-химии, или, в некоторых случаях, они могут быть образованы вследствие конъюгации между функциональными группами в XTEN и нагрузочным веществом без применения линкера, как описано в данном тексте. XTEN-P в общем случае содержат один или более из следующих компонентов: 1) XTEN; 2) кросс-линкер; и 3) биологически активный нагрузочный белок, и в общем случае также образуются вследствие конъюгации посредством кросс-линкера или реактантов клик-химии. Конъюгаты XTEN-PR в общем случае содержат один или более из следующих компонентов: 1) один или более XTEN; 2) спейсерную последовательность и 3) нагрузочное вещество. XTEN-D-P в общем случае содержат один или более из следующих компонентов: 1) XTEN; 2) произвольный линкер; 3) биологически активный белок; и 4) лекарственное вещество, при этом нагрузочные вещества в общем случае

образованы вследствие конъюгации посредством кросс-линкера или реактантов клик-химии, как описано выше. При этом в некоторых случаях, касающихся вышеописанных композиций, эти композиции могут быть созданы без применения кросс-линкера при условии, что компоненты обладают химической активностью иного рода.

[00316] Конъюгация XTEN с нагрузочными веществами обеспечивает полученным в результате композициям несколько преимуществ по сравнению с нагрузочными веществами, неприсоединенными к XTEN. Как более полно описано ниже, неограничивающие примеры усиленных свойств включают увеличение общей растворимости и метаболической стабильности, сниженную восприимчивость к протеолизу во время циркуляции, сниженную иммуногенность, сниженную скорость всасывания при подкожном или внутримышечном введении, сниженное выведение почками, повышенное взаимодействие с субстратом, сниженную токсичность, нацеленную доставку нагрузочного вещества и усиленные фармакокинетические свойства. Усиленные фармакокинетические свойства конъюгатов по сравнению с нагрузочным веществом, неприсоединенным к XTEN, включают более длительный терминальный период полувыведения (например, двукратно, трехкратно или четырехкратно превышающий обычный), увеличенную площадь под кривой (ППК) (например, на 25%, 50%, 100% или более), более низкий объем распределения, более медленное всасывание после подкожной или внутримышечной инъекции (что является преимуществом по сравнению с коммерчески доступными формами нагрузочных веществ, которые вводятся таким же способом), что приводит к более низкой величине средней максимальной концентрации, что, в свою очередь, приводит к снижению нежелательных действий нагрузочного вещества, что, все вместе, приводит к увеличению периода времени, на протяжении которого вводимая пациенту конъюгационная композиция оказывает терапевтическое действие. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгационные композиции содержат расщепляемые последовательности (более детально описанные ниже), что делает возможным пролонгированное высвобождение активного нагрузочного вещества так, что вводимый конъюгат XTEN-нагрузочное вещество действует в качестве депо при подкожном или внутримышечном введении. В частности, предполагается, что конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество могут проявлять одно или более либо любую комбинацию из описанных в данном тексте улучшенных свойств. В результате данных усиленных свойств конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество обеспечивают возможность менее частого дозирования, более индивидуализированного дозирования и/или сниженной токсичности по сравнению с нагрузочным веществом, неприсоединенным к XTEN и вводимым схожим способом. Подобные конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество обладают свойством излечивать определенные болезненные состояния, на которые, как известно в данной области, восприимчивы к,

улучшаются или предотвращаются при введении нагрузочного вещества нуждающемуся в этом пациенту, как описано в данном тексте.

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

[00317] В другом аспекте реализации данное изобретение относится к XTEN, присоединенным к кросс-линкерам, что приводит к образованию конъюгатов XTEN-кросс-линкер, которые можно применять для получения конъюгационных композиций XTEN-нагрузочное вещество. В частности, описанные в данном тексте участники конъюгации XTEN-кросс-линкер можно применять для конъюгации с нагрузочными веществами или поверхностями, несущими по меньшей мере одну тиоловую, амино, карбоксильную, альдегидную или спиртовую либо любую другую функциональную группу, которая является доступной и подходящей, как известно в данной области, для реакции между описанными в данном тексте компонентами.

[00318] В другом аспекте реализации данное изобретение относится к способам получения конъюгатов из реактантов XTEN-кросс-линкер и XTEN-азид/алкиновых реактантов клик-химии, что приводит к образованию конъюгатов, которые можно применять для получения конъюгационных композиций XTEN-нагрузочное вещество. В частности, описанные в данном тексте способы получения XTEN-кросс-линкеров и XTEN-азид/алкиновых реактантов можно применять в случае, если нагрузочное вещество или реакционная поверхность несет по меньшей мере одну тиоловую, амино, карбоксильную, альдегидную, алкеновую, алкиновую, гетероциклическую, спиртовую либо другую функциональную группу, которая является доступной для реакции.

[00319] Примеры вариантов реализации XTEN были описаны выше, включая получение в основном гомогенных XTEN. В изобретении предложены XTEN, которые дополнительно служат в качестве платформы, к которой могут быть присоединены нагрузочные вещества, так, что они служат в качестве “носителя”, обеспечивая композициям определенные необходимые фармакокинетические, химические и фармацевтические свойства среди других описанных ниже свойств. В других вариантах реализации в изобретении предложены полинуклеотиды, которые кодируют XTEN, которые могут быть присоединены к генам, кодирующим пептидные или полипептидные нагрузочные вещества, которые могут быть включены в экспрессионные векторы и внесены в подходящие хозяйские организмы для экспрессии и выделения рекомбинантных гибридных белков XTEN-нагрузочное вещество, являющихся объектами изобретения.

[00320] В некоторых вариантах реализации изобретения компоненты XTEN, описанные выше в данном тексте, сконструированы так, чтобы включать определенное количество функциональных аминокислотных остатков, которые могут реагировать с

перекрестносшивающими веществами или могут дополнительно содержать функциональные группы, которые могут участвовать в конъюгации с нагрузочными веществами. В одном варианте реализации в изобретении предложены цистеин-сконструированные XTEN, в которых молекулы цистеина, каждая из которых содержит функциональную тиоловую группу, присоединены к кросс-линкеру, что приводит к образованию конъюгата XTEN-кросс-линкер. В другом варианте реализации в изобретении предложены лизин-сконструированные XTEN, в которых молекулы лизина, каждая из которых содержит положительно заряженную гидрофильную ε-аминогруппу, присоединены к кросс-линкеру, что приводит к образованию конъюгата XTEN-кросс-линкер. В вариантах реализации цистеин-сконструированных XTEN каждый из них содержит от около 1 до около 100 аминокислот цистеина, или от 1 до около 50 аминокислот цистеина, или от 1 до около 40 аминокислот цистеина, или от 1 до около 20 аминокислот цистеина, или от 1 до около 10 аминокислот цистеина, или от 1 до около 5 аминокислот цистеина, или 9 цистеинов, или 3 цистеина, или одну аминокислоту цистеина, которые доступны для конъюгации. В вариантах реализации лизин-сконструированных XTEN каждый из них содержит от около 1 до около 100 аминокислот лизина, или от 1 до около 50 аминокислот лизина, или от 1 до около 40 аминокислот лизина, или от 1 до около 20 аминокислот лизина, или от 1 до около 10 аминокислот лизина, или от 1 до около 5 аминокислот лизина, или 9 лизинов, или 3 лизина, или одну аминокислоту лизина, которые доступны для конъюгации. В другом варианте реализации изобретения сконструированный XTEN содержит остатки, как цистеина, так и лизина, в вышеприведенных диапазонах или количествах.

[00321] В общем случае тиоловые группы цистеина XTEN являются более функциональными, т.е., более нуклеофильными, по отношению к электрофильным конъюгационным реагентам, чем аминные или гидроксильные группы. Вдобавок, остатки цистеина, как правило, присутствуют в данном белке в меньших количествах; и, таким образом, вероятность множественной конъюгации в пределах одного и того же белка является меньшей. Остатки цистеина вносили в белки методами генной инженерии для образования ковалентных связей с лигандами или для образования новых внутримолекулярных дисульфидных связей (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; патент США № 6,248,564).

[00322] В одном варианте реализации в изобретении предложена отдельная композиция, содержащая цистеин-сконструированный XTEN, конъюгированный с кросс-линкером, в которой кросс-линкер выбран из сульфгидрил-функциональных гомобифункциональных или

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

[00323] В одном аспекте реализации в изобретении предложены способы для сайт-специфической конъюгации с полимером XTEN, осуществляемой путем применения химически-активных аминокислотных остатков или их производных (например, N-концевой α-аминной группы, ε-аминной группы лизина, тиоловой группы цистеина, C-концевой карбоксильной группы, карбоксильных групп глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты). Функциональными группами, подходящими для реакций с первичными α- и ε-аминогруппами, являются хлорцианураты, дихлортреазины, трезилаты, бензотриазолкарбонаты, п-нитрофенилкарбонаты, трихлорфенилкарбонаты, альдегиды, смешанные ангидриды, карбонилимидазолы, имидоэфиры, N-гидроксисукцинимидэфиры, N-гидроксисульфосукцинимидэфиры (Harris, J. M., Herati, R. S. *Polym. Prepr.* (*Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem*), 32(1), 154-155 (1991); Herman, S., et al. *Macromol. Chem. Phys.* 195, 203-209 (1994); Roberts, M. J. et. al. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 54, 459-476 (2002)). N-гидроксисукцинимидэфиры (NHS-эфиры и их водорастворимые аналоги сульфо-NHS-эфиры) обычно применяют для конъюгации белка (смотрите ФИГ. 2). NHS-эфиры дают на выходе устойчивые амидные продукты при реакции с первичными аминами с относительно эффективным сопряжением при физиологическом уровне pH. Реакции конъюгации обычно проводят в 50-200 мМ фосфатного, бикарбонатного/карбонатного, ГЭПЭС или боратного буферов (pH от 7 до 9) при температуре от 4°C до комнатной на протяжении от 0,5 до 2 часов. NHS-эфиры обычно применяют в молярном количестве, от двух до 50-ти раз превышающем количество белка. Обычно концентрация реагента может варьироваться от 0,1-10 мМ, в то время как оптимальная концентрация белка составляет 50-100 мкМ.

[00324] В другом способе, при условии, что полипептиды XTEN обладают только одной N-концевой α-аминогруппой, XTEN можно сконструировать так, чтобы они содержали дополнительную ε-аминогруппу(ы) специально включенных остатков лизина; примеры

последовательностей которых приведены в Таблице 3. α- и ε-аминогруппы характеризуются разными величинами pKa: приблизительно от 7,6 до 8,0 для α-аминогруппы N-концевой аминокислоты и приблизительно 10-10,5 для ε-аминогруппы лизина. Такую значительную разницу в величинах pKa можно использовать для избирательной модификации аминогрупп. Депротонирование всех первичных аминов происходит при величине pH выше pH 8,0. В таком окружении нуклеофильные свойства различных аминов определяют их реакционнцю способность. Как правило, при депротонировании большее количество нуклеофильных ε-аминогрупп лизинов являются более реакционно-способными в отношении электрофилов, чем α-аминогрупп. С другой стороны, при более низком уровне pH (например, pH 6), как правило, большее количество кислотных α-аминогрупп являются более депротонированными, чем ε-аминогруппы, и порядок реакционной способности является обратным. Например, одобренный управлением по контролю за продуктами и лекарствами препарат нейласта (пэгфилграстим) представляет собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF – от англ. “granulocyte colony-stimulating factor”), модифицированный посредством ковалентного присоединения 20 кДа ПЭГ-альдегида. Специфическую модификацию N-концевой аминокислоты белка проводили путем использования более низкой pKa для ε-аминогруппы по сравнению с ε-аминогруппами внутренних лизинов (Molineaux, G. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1235-1244 (2004), Патент США 5,824,784).

[00325] Полипептиды XTEN, содержащие остатки цистеина, можно генетически конструировать при помощи рекомбинантных технологий, описанных в данном тексте (смотрите, например, Примеры) или при помощи стандартных методов, известных в данной области. Конъюгацию с тиоловыми группами можно проводить при помощи высокоспецифических реакций, которые приводят к образованию одиночных продуктов конъюгации, соединенных перекрестносшивающими веществами. Функциональными группами, подходящими для реакций с тиоловыми группами цистеина, являются N-малеинимиды, галоацетилы и пиридилдисульфиды. Малеинимидная группа реагирует непосредственно с сульфгидрильными группами, когда уровень pH реакционной смеси составляет между pH 6,5 и 7,5, образовывая стабильную тиоэфирную связь, которая не является обратимой (смотрите ФИГ. 3). При нейтральном уровне pH малеинимиды реагируют с сульфгидрилами в 1000 раз быстрее, чем с аминами, но когда уровень pH превышает 8,5, реакция происходит преимущественно с аминами. Малеинимиды не реагируют с тирозинами, гистидинами или метионинами. При составлении реакционных растворов тиолы следует исключить из реакционных буферов, которые применяются с малеинимидами, так как они будут конкурировать с ними за сайты сопряжения. Избыток малеинимидов в реакции можно

компенсировать в конце реакции путем добавления тиолов, в то время как ЭДТК можно включать в буфер для сопряжения, чтобы минимизировать окисление сульфгидрилов.

[00326] В другом варианте реализации изобретение предполагает применение галоацетильных реагентов, которые используются для перекрестного сшивания сульфгидрильных групп XTEN или нагрузочных веществ для получения конъюгатов, являющихся объектами данного изобретения. Наиболее часто применяемые галоацетильные реагенты содержат йодоацетильную группу, которая реагирует с сульфгидрильными группами при физиологическом уровне pH. Реакция йодоацетильной группы с сульфгидрильной сопровождается нуклеофильным замещением йода тиолом, что приводит к образованию стабильной тиоэфирной связи (смотрите ФИГ. 4). Создание небольшого избытка йодоацетильных групп над количеством сульфгидрильных групп при pH 8,3 обеспечивает сульфгидрильную избирательность. При наличии большого избытка йодоацетильных групп йодоацетильная группа может реагировать с другими аминокислотами. Имидазолы могут реагировать с йодоацетильными группами при pH 6,9-7,0, но инкубация должна проходить более одной недели. Боковые цепи и аминогруппы гистидила реагируют в непротонированной форме с йодоацетильными группами при уровне pH выше pH 5 и pH 7, соответственно. В другом варианте реализации изобретения кросс-линкеры, применяемые для сульфгидрильных групп, представляют собой пиридилдисульфиды. Пиридилдисульфиды реагируют с йодоацетильными группами в широком диапазоне pH (оптимальны уровень pH составляет 4-5), образуя дисульфидные связи, соединяющие XTEN с нагрузочными веществами (смотрите ФИГ. 5). Как дисульфиды, конъюгаты, полученные с применением этих реагентов, являются отщепляемыми. Во время реакции между –SH группой и 2-пиридилдитиоловой группой молекулы происходит дисульфидный обмен. В результате происходит высвобождение пиридин-2-тиона. Эти реагенты можно использовать в качестве кросс-линкеров и для того, чтобы вносить в белки сульфгидрильные группы. Дисульфидный обмен можно проводить при физиологическом уровне pH, хотя скорость реакции при этом снижается.

[00327] Конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие активные синтетические пептиды или полипептиды, можно изготовить, используя химически активные аминокислотные остатки или их производные; например, N-концевую α-аминогруппу, ε-аминогруппу лизина, тиоловую группу цистеина, карбоксильную группу С-концевой аминокислоты, карбоксильную группу аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты. Каждый пептид содержит N-концевую α-аминогруппу вне зависимости от первичной аминокислотной последовательности. При необходимости N-концевую α-аминогруппу можно оставить защищенной/заблокированной при химическом синтезе активного пептида/полипептида. Синтетический пептид/полипептид может содержать дополнительную ε-аминогруппу(ы)

лизина, которая может иметь природное происхождение или быть специально замещенной для конъюгации. Как описано выше, α- и ε-аминогруппы можно избирательно модифицировать при различных уровнях pH. Другой подход к избирательной модификации α- или ε-аминогруппы в синтетическом пептиде состоит в реверсивной защите аминогрупп ди-*терт*-бутилдикарбонатом (BOC_2). Например, избирательная защита BOC пептида вапреотида (синтетического аналога соматостатина) была достигнута путем модификации при pH 6 (защита α-группы) или pH 8,5 (защита ε-группы). Затем оставшиеся свободные аминогруппы специфически модифицировали при помощи ПЭГ-N-гидроксисукцинимида или ПЭГ-альдегида. В конце защиту BOC устраняли при помощи обработки кислотой, чтобы получить мономодифицированные пептиды (Morpurgo, M. et al. Selective Alkylation and Acylation of α and ε Amino Groups with PEG in a Somatostatin Analogue: Tailored Chemistry for Optimized Bioconjugates. *Bioconjugate Chem.* 2002. 13:1238-1243).

[00328] Так как цистеины, в общем случае, реже встречаются в пептидных и белковых последовательностях природного происхождения, чем лизины, использование цистеинов в качестве участка для конъюгации снижает вероятность множественных конъюгаций с молекулами XTEN-кросс-линкер в реакции. Также это снижает вероятность деактивации пептида/белка при конъюгации. Более того, конъюгацию с цистеиновыми участками часто можно проводить четко определенным способом, что приводит к образованию одиночных продуктов конъюгации полимер XTEN-пептид или полимер XTEN-полипептид. В некоторых случаях в аминокислотной последовательности пептида, подлежащего конъюгации, может отсутствовать цистеин. В таком случае остаток цистеина можно присоединить к N- или C-концу пептида рекомбинантно или синтетически при помощи стандартных методов. В альтернативном варианте выбранную аминокислоту можно химически или генетически модифицировать в цистеин. Как один из примеров, модификация серина в цистеин считается консервативной мутацией. Другим подходом к внесению тиоловой группы в пептиды, в которых отсутствует цистеин, является химическая модификация ε-аминогруппы лизина при помощи тиолирующих реагентов, таких как 2-иминотиолан (реагент Траута), САТА (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), САТП (N-сукцинимидил-S-ацетилтиопропионат), САТ-PEO_4-Ac (N-сукцинимидил-S-ацетил(тиотетраэтиленгликоль)), СПДП (*N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил-6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат) (более полно описаны ниже). После того, как индивидуальная тиоловая группа внесена в пептид, его можно избирательно модифицировать при помощи соединений, содержащих сульфгидрильные реакционно-способными группы, такие как N-малеинимиды, галоацетилы и пиридилдисульфиды, как описано выше.

[00329] Конъюгации между полипептидом XTEN и пептидом, белком или низкомолекулярным лекарственным веществом можно достичь при помощи большого количества соединительных химических веществ, включая коммерчески доступные кросс-линкерные соединения нулевой длины, гомо- или гетеробифункциональные и мультифункциональные, согласно способам известным и доступным в данной области, таким как описанные, например, в R. F. Taylor (1991) "Protein immobilization. Fundamentals and Applications", Marcel Dekker Inc., N.Y.; G. T. Hermanson et al. (1992) "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, San Diego; G. T. Hermanson (2008) "Bioconjugate Techniques", 2nd. ed. Elsevier, Inc., S. S. Wong (1991) "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton. Подходящие перекрестносшивающие вещества для применения в получении конъюгатов, являющихся объектами изобретения, являются коммерчески производимыми такими компаниями как Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific (Pierce Protein Research Products), Invitrogen, ProteoChem, G-Biosciences. Предпочтительные варианты реализации кросс-линкеров содержат тиол- реакционно-способную функциональную группу или амино-реакционно-способную функциональную группу. Список примеров кросс-линкеров приведен в Таблице 13.

Таблица 13: Примеры кросс-линкеров

Кросс-линкер
Малеинимиды, галоацетилы, пиридилдисульфиды, галоацетилы, пиридилдисульфиды, АБГ (*n*-азидобензоилгидразид), АМАС (*N*-(α-малеинимидоацетокси)-сукцинимид эфир), АНБ-НОС (*N*-5-азидо-2-нитробензилокси-сукцинимид), АПДП (*N*-(4-[*n*-азидосалициламидо]бутил)-3'-(2'-пиридилдитио) пропионамид), АСБА (4-(*n*- азидосалициламидо)-бутиламин), БАСЭД (*Бис* (β-[4-азидосалициламидо]этил) дисульфид), БМБ (1,4-*Бис*-малеинимидобутан), БМДБ (1,4 Бисмалеинимидил-2,3-дигидроксибутан), БМГ (*Бис*-малеинимидогексан), БМОЭ (*Бис*-малеинимидоэтан), БМПГ (*N*-(β-малеинимидопропионовой кислоты)гидразид), БМПС (*N*-(β-малеинимидопропилокси) сукцинимид эфир), БМ(ПЭГ)$_2$ (1,8-*Бис*-малеинимидоэтиленгликоль), БМ(ПЭГ)$_3$ (1,11-*Бис*-малеинимидотриэтиленгликоль), БС^{2}Г (*Бис* (сульфосукцинимидил)глутарат), БС^3 (сульфо-ДСС) (*Бис* (сульфосукцинимидил)суберат), БС[ПЭГ]$_5$ (*Бис* (NHS)ПЭГ5), БС(ПЭГ)$_9$ (*Бис* (NHS)ПЭГ9), БСОКОЭС (Бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), С6-САНГ (С6-сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоат), ДЦК (*N,N*-дициклогексилкарбодиимид), ДФДНБ (1-5-дифтор-2,4-динитробензен), ДМА (диметил адипимидат), ДМП (диметил пимелимидат), ДМС (диметил суберимидат), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'пиридилдитио]пропионамидо) бутан), ДСГ (дисукцинимидил глутарат), ДСП (дитиобис(сукцимидилпропионат), реагент Ломанта), ДСС (дисукцинимидил суберат), ДСТ (дисукцинимидил тартарат), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат)), ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид), ЭГС (этиленгликоль *бис*(сукцинимидилсукцинат)), ЭМКК (*N*-ε-малеинимидокапроновая кислота), ЭМКГ (*N*-(ε-малеинимидокапроновой кислоты)гидразид), ЭМКС (*N*-(ε-малеинимидокапроилокси)сукцинимид эфир), ГМБС (*N*-(γ-малеинимидобутирилокси)сукцинимид эфир), КМУК (*N*-к-малеинимидоундекановая кислота), КМУГ (*N*-(к-малеинимидоундекановой кислоты)гидразид), ЛЦ-SDA (NHS-ЛЦ-диазирин), ЛЦ-СМЦК (сукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил) циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), МБС (*m*-малеинимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид эфир), МФБГ (4-(4-N-малеинимидофенил)-масляной кислоты гидразид), NHS-АСК (*N*-гидроксисукцинимидил-4-азидосалициловая кислота), ПДПГ (3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид), ПМПИ (*N*-(*n*-малеинимидофенил)изоцианат), САДП (сукцинимидил

Кросс-линкер
(4-азидофенил дитио) пропионат), САЭД (сукцимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), САНД (сукцинимидил-2-(м-азидо-*о*-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), САНГ (сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), САНФАГ (*N*-сукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), САСД (сукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), СБАП (сукцинимидил 3-(бромоацетамидо)пропионат), СДА (NHS-диазирин), СДАД (NHS-СС-диазирин), СФАД (сукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоат), СГТГ (сукцинимидил 4-гидразидотерефталат), СИА (*N*-сукцинимидил йодоацетат), СИАБ (*N*-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), СМФБ (сукцинимидил 4-(п-малеинимидофенил) бутират), СМЦК (сукцинимидил 4-(*N*-малеинимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат), СМ[ПЭГ]$_2$ (NHS-ПЭГ2-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_4$ (NHS-ПЭГ4-малеинимид), СМ(ПЭГ)$_6$ (NHS-ПЭГ6-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_8$ (NHS-ПЭГ8-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_{12}$ (NHS-ПЭГ12-малеинимид), СМ(ПЭГ)$_{24}$ (NHS-ПЭГ24-малеинимид), СМФБ (сукцинимидил 4-(*n*-малеинимидо-фенил)бутират), СМПГ (сукцинимидил-6-(β-малеинимидопропионамидо)гексаноат), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол), СПБ (сукцинимидил-(4-псорален-8-илокси)бутират), СПДП (*N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ДСТ (сульфодисукцинимидил тартрат), сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис (сульфо-сукцинимидил сукцинат)), сульфо-ЭМКС (*N*-(ε-малеинимидокапроилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГМБС (*N*-(γ-малеинимидобутрилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГСАБ (*N*-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат), сульфо-КМУС (*N*-(к-малеинимидоундеканоилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ЛЦ-СДА (сульфо-NHS-ЛЦ-диазирин), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]-толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-МБС (*m*-малеинимидобензоил-*N*-гидроксисульфосукцинимид эфир), сульфо-NHS-ЛЦ-АСА (сульфосукцинимидил(4-азидо-салициламидо) гексаноат), сульфо-САДП (сульфосукцинимидил (4-азидофенил дитио) пропионат), сульфо-САЭД (сульфосукцимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНД (сульфосукцинимидил-2-(м-азидо-*о*-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНФАГ (сульфосукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), сульфо-САСД (сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), сульфо-СДА (сульфо-NHS-диазирин), сульфо-СДАД (сульфо-NHS-СС-диазирин), сульфо-СФАД (сульфосукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-СИАБ (сульфосукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-СМФБ (сульфосукцинимидил 4-(*n*-малеинимидофенил)бутират), ТГФП (β-(трис[гидроксиметил]фосфиновая)пропионовая кислота (бетаин)), ТМЭА (*трис*-(2-малеинимидоэтил)амин), ТСАТ (*трис*-(сукцинимидил аминотриацетат)), 3-пропаргилоксипропановая кислота, NHS эфир, ацетилен-ПЭГ-NHS эфир, дибензилциклооктин, (ДБЦО)-NHS эфир, ДБЦО-ПЭГ-NHS эфир, циклооктин (ЦОТ)-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ-пентафторфенил (ПФФ) эфир, БЦОТ-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ-пентафторфенил (ПФФ) эфир, ацетилен-ПЭГ4-малеинимид, ДБЦО-малеинимид, ЦОТ-малеинимид, БЦОТ-малеинимид, 3-азид-пропионовая кислота, NHS эфир, 6-азид-гексановая кислота, NHS эфир, 3- азид-пропионовая кислота, ПФФ эфир, 6- азид-гексановая кислота, ПФФ эфир, азид-ПЭГ-NHS эфир, азид-ПЭГ-ПФФ эфир, азид-ПЭГ-малеинимид, N-(5-аминопентил)малеинимид, аминопентил-малеинимид

[00330] Неограничивающими примерами кросс-линкеров являются АБГ (*n*-азидобензоилгидразид), АМАС (*N*-(α-малеинимидоацетокси)-сукцинимид эфир), АНБ-НОС (*N*-5-азидо-2-нитробензилокси-сукцинимид), АПДП (*N*-(4-[*n*-азидосалициламидо]бутил)-3'-(2'-пиридилдитио) пропионамид), АСБА (4-(*n*- азидосалициламидо)-бутиламин), БАСЭД (*Бис* (β-[4-азидосалициламидо]этил) дисульфид), БМБ (1,4-*Бис*-малеинимидобутан), БМДБ (1,4 Бисмалеинимидил-2,3-дигидроксибутан), БМГ (*Бис*-малеинимидогексан), БМОЭ (*Бис*-малеинимидоэтан), БМПГ (*N*-(β-малеинимидопропионовой кислоты)гидразид), БМПС (*N*-(β-малеинимидопропилокси) сукцинимид эфир), БМ(ПЭГ)$_2$ (1,8-*Бис*-малеинимидоэтиленгликоль),

БМ(ПЭГ)$_3$ (1,11-*Бис*- малеинимидотриэтиленгликоль), БС^{2}Г (*Бис* (сульфосукцинимидил)глутарат), БС^3 (сульфо-ДСС) (*Бис* (сульфосукцинимидил)суберат), БС[ПЭГ]$_5$ (*Бис* (NHS)ПЭГ5), БС(ПЭГ)$_9$ (*Бис* (NHS)ПЭГ9), БСОКОЭС (Бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), С6-САНГ (С6-сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоат), ДЦК (*N,N*-дициклогексилкарбодиимид), ДФДНБ (1-5-дифтор-2,4-динитробензен), ДМА (диметил адипимидат), ДМП (диметил пимелимидат), ДМС (диметил суберимидат), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'пиридилдитио]пропионамидо) бутан), ДСГ (дисукцинимидил глутарат), ДСП (дитиобис(сукцимидилпропионат), реагент Ломанта), ДСС (дисукцинимидил суберат), ДСТ (дисукцинимидил тартарат), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат)), ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид), ЭГС (этиленгликоль *бис*(сукцинимидилсукцинат)), ЭМКК (*N*-ε-малеинимидокапроновая кислота), ЭМКГ (*N*-(ε-малеинимидокапроновой кислоты)гидразид), ЭМКС (*N*-(ε-малеинимидокапроилокси)сукцинимид эфир), ГМБС (*N*-(γ-малеинимидобутирилокси)сукцинимид эфир), КМУК (*N*-к-малеинимидоундекановая кислота), КМУГ (*N*-(к-малеинимидоундекановой кислоты)гидразид), ЛЦ-СДА (NHS-ЛЦ-диазирин), ЛЦ-СМЦК (сукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил) циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), МБС (*м*-малеинимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид эфир), МФБГ (4-(4-N-малеинимидофенил)-масляной кислоты гидразид), NHS-АСК (*N*-гидроксисукцинимидил-4-азидосалициловая кислота), ПДПГ (3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид), ПМПИ (*N*-(*п*-малеинимидофенил)изоцианат), САДП (сукцинимидил (4-азидофенил дитио) пропионат), САЭД (сукцимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), САНД (сукцинимидил-2-(м-азидо-*о*-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), САНГ (сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразон), САНФАГ (*N*-сукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), САСД (сукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), СБАП (сукцинимидил 3-(бромоацетамидо)пропионат), СДА (NHS-диазирин), СДАД (NHS-СС-диазирин), СФАД (сукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоат), СГТГ (сукцинимидил 4-гидразидотерефталат), СИА (*N*-сукцинимидил йодоацетат), СИАБ (*N*-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), СМФБ (сукцинимидил 4-(п-малеинимидофенил) бутират), СМЦК (сукцинимидил 4-(*N*-малеинимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат), СМ[ПЭГ]$_2$ (NHS-ПЭГ2-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_4$ (NHS-ПЭГ4-малеинимид), СМ(ПЭГ)$_6$ (NHS-ПЭГ6-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_8$ (NHS-ПЭГ8-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_{12}$ (NHS-ПЭГ12-малеинимид), СМ(ПЭГ)$_{24}$

(NHS-ПЭГ24-малеинимид), СМФБ (сукцинимидил 4-(*п*-малеинимидо-фенил)бутират), СМПГ (сукцинимидил-6-(β-малеинимидопропионамидо)гексаноат), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол), СПБ (сукцинимидил-(4-псорален-8-илокси)бутират), СПДП (*N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ДСТ (сульфодисукцинимидил тартрат), сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис (сульфо-сукцинимидил сукцинат)), сульфо-ЭМКС (*N*-(ε-малеинимидокапроилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГМБС (*N*-(γ-малеинимидобутрилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГСАБ (*N*-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат), сульфо-КМУС (*N*-(к-малеинимидоундеканоилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ЛЦ-СДА (сульфо-NHS-ЛЦ-диазирин), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]-толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-МБС (*м*-малеинимидобензоил-*N*-гидроксисульфосукцинимид эфир), сульфо-NHS-ЛЦ-АСА (сульфосукцинимидил(4-азидо-салициламидо) гексаноат), сульфо-САДП (сульфосукцинимидил (4-азидофенил дитио) пропионат), сульфо-САЭД (сульфосукцимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНД (сульфосукцинимидил-2-(м-азидо-*о*-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНФАГ (сульфосукцинимидил 6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат), сульфо-САСД (сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3-дитиопропионат), сульфо-СДА (сульфо-NHS-диазирин), сульфо-СДАД (сульфо-NHS-СС-диазирин), сульфо-СФАД (сульфосукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-СИАБ (сульфосукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-СМФБ (сульфосукцинимидил 4-(*п*-малеинимидофенил)бутират), ТГФП (β-(трис[гидроксиметил]фосфиновая)пропионовая кислота (бетаин)), ТМЭА (*трис*-(2-малеинимидоэтил)амин), ТСАТ (*трис*-(сукцинимидил аминотриацетат)).

[00331] В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, в которых используются перекрестносшивающие реагенты, включают в себя спейсерную “ножку” неприродного происхождения. Однако, в тех случаях, когда предпочтительной является пептидная связь природного происхождения, изобретение предполагает, что реакцию можно проводить, применяя кросс-линкеры нулевой длины, которые действуют посредством активации карбоксилатной группы. В соответствующих вариантах реализации для того, чтобы достичь избирательности реакции, первый полипептид должен содержать только свободную С-концевую карбоксильную группу, в то время как все боковые цепи лизина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты являются

защищенными, а N-концевой α-амин второго пептида/белка должен являться единственной доступной незащищенной аминогруппой (то есть, необходимо, чтобы любые лизины, аспарагины или глутамины были защищены). В таких случаях предпочтительным является применение последовательностей семейства XTEN AG из Таблицы 2, в которых отсутствует глутаминовая кислота в качестве первого полипептида в XTEN-нагрузочное вещество или XTEN-кросс-линкер. Соответственно, в одном варианте реализации в изобретении предложены XTEN-кросс-линкер или XTEN-нагрузочное вещество, содержащие последовательности AG XTEN, при этом композиции соединены с нагрузочными веществами посредством кросс-линкеров нулевой длины. Примеры кросс-линкеров нулевой длины, применяемых в данном варианте реализации изобретения, включают, но не ограничиваются этим, ДЦК (N,N-дициклогексилкарбодиимид) и ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид), при этом кросс-линкеры используются для прямой конъюгации карбоксильных функциональных групп одной молекулы (такой как нагрузочное вещество) с первичным амином другой молекулы, такой как нагрузочное вещество с подобной функциональной группой (смотрите ФИГ. 6). Сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид) и NHS (N-гидроксисукцинимид) применяют в качестве катализаторов для конъюгации, повышая тем самым эффективность реакции (Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. (1990) Anal. Biochem. 185(1), 131-135). ЭДК реагирует с группой карбоновой кислоты и активирует карбоксильную группу до образования активного промежуточного продукта О-ацилизомочевины, обеспечивая возможность ее сопряжения с аминогруппой в реакционной смеси. Промежуточный продукт О-ацилизомочевина нестабильна в водных растворах, что делает ее неэффективной в двухэтапных процессах конъюгации без повышения стабильности промежуточного продукта при помощи N-гидроксисукцинимида. Этот промежуточный продукт реагирует с первичным амином до образования производного амида. Реакция перекрестного сшивания обычно проходит при уровне pH между 4,5 и 5, и для многих применений она требует всего нескольких минут. При этом выход реакции является одинаковым для pH от 4,5 до 7,5. Гидролиз ЭДК является параллельной реакцией, проходящей во время сопряжения, и зависит от температуры, pH и буферного состава. 4-морфолиноэтансульфоновая кислота (МЭС) является эффективным карбодиимидным реакционным буфером. Фосфатные буферы снижают эффективность реакции ЭДК, но увеличение количества ЭДК может компенсировать сниженную эффективность. Трис-буферы, а также глициновые и ацетатные буферы лучше не применять в качестве конъюгационных буферов.

[00332] Также в изобретении предложены композиции, в которых XTEN связаны посредством трехвалентных кросс-линкеров, что приводит к образованию тримерных

конъюгатов XTEN-кросс-линкер. Тримерные кросс-линкеры можно создать путем соединения трехвалентной основы, такой как третичный амин, тризамещенный метан или 1,3,5-тризамещенный бензен, или ассиметричной трехвалентной молекулы, такой как дипептид LysLys, или дипептид GluGlu, или дипептид AspAsp, или трипептид CysCysCys, посредством спейсеров с различными реакционно-способными боковыми группами, перечисленными в Таблице 14, при помощи стандартных конъюгационных методов. В одном варианте реализации в изобретении предложены композиции, в которых три XTEN ковалентно связаны трехвалентным кросс-линкером, выбранным из группы, состоящей из тиол- реакционно-способного Трис-(2-малеинимидоэтил)амина (ТМЭА), амин- реакционно-способного Трис-(сукцинимидил аминотриацетата) (TCAT) и кросс-линкеров, приведенных в Таблице 14.

Таблица 14: Трехвалентные кросс-линкеры

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

* Состоящий из трехвалентной основы + любой компонент из Группы 1 + любой компонент из Группы 2 + любой компонент из Группы 3

[00333] В других вариантах реализации изобретения XTEN и нагрузочные вещества можно конъюгировать посредством широкой группы кросс-линкеров, включая те, которые состоят из спейсерной “ножки” (линейной или разветвленной) и двух или более реакционно-способных концов, которые способны присоединяться к определенным функциональным группам (например, первичным аминам, сульфгидрилам и т.д.) на белках или других молекулах. Линейные кросс-линкеры могут быть гомобифункциональными или

гетеробифункциональными. Гомобифункциональные кросс-линкеры содержат две идентичные реакционно-способные группы, которые используются для перекрестного сшивания белков в одноэтапном процессе реакции. Неограничивающими примерами амин- реакционно-способных гомобифункциональных кросс-линкеров являются БС2Г (*Бис* (сульфосукцинимидил)глутарат), БС3 (сульфо-ДСС) (*Бис* (сульфосукцинимидил)суберат), БС[ПЭГ]5 (*Бис* (NHS)ПЭГ5), БС(ПЭГ)9 (*Бис* (NHS)ПЭГ9), БСОКОЭС (Бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), ДФДНБ (1-5-дифтор-2,4-динитробензен), ДМА (диметил адипимидат), ДМП (диметил пимелимидат), ДМС (диметил суберимидат), ДСГ (дисукцинимидил глутарат), ДСП (дитиобис(сукцимидилпропионат), реагент Ломанта), ДСС (дисукцинимидил суберат), ДСТ (дисукцинимидил тартарат), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат)), ЭГС (этиленгликоль *бис*(сукцинимидилсукцинат)), сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис (сульфо-сукцинимидил сукцинат)).

[00334] Вдобавок примерами гомобифункциональных кросс-линкеров, применяемых в композициях и в способах для создания композиций XTEN-нагрузочное вещество и/или XTEN-кросс-линкер, являются сульфгидрил- реакционно-способные вещества, такие как БМБ (1,4-*Бис*-малеинимидобутан), БМГ (*Бис*-малеинимидогексан), БМДБ (1,4 Бисмалеинимидил-2,3-дигидроксибутан), БМОЭ (*Бис*-малеинимидоэтан), БМ(ПЭГ)2 (1,8-*Бис*-малеинимидоэтиленгликоль), БМ(ПЭГ)3 (1,11-*Бис*- малеинимидотриэтиленгликоль), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'пиридилдитио]пропионамидо) бутан), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан).

[00335] Для создания конъюгатов XTEN-кросс-линкер для последующей конъюгации с нагрузочными веществами, а также конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, предпочтительными являются гетеробифункциональные кросс-линкеры, так как они обеспечивают возможность управления последовательными реакциями. Так как гетеробифункциональные кросс-линкеры содержат две разные реакционно-способные группы, их использование в композициях обеспечивает возможность последовательной двухэтапной конъюгации. Гетеробифункциональный реагент вступает в реакцию с первым белком посредством более лабильной группы. В одном варианте реализации изобретения конъюгация гетеробифункционального кросс-линкера с реакционно-способной группой XTEN приводит к образованию конъюгата XTEN-кросс-линкер. После завершения реакции и удаления излишка непрореагировавшего кросс-линкера модифицированный белок (такой как XTEN-кросс-линкер) можно добавлять к нагрузочному веществу, которое взаимодействует со второй реакционно-способной группой кросс-линкера, что приводит к образованию конъюгата XTEN-нагрузочное вещество. Наиболее часто применяемые гетеробифункциональные кросс-линкеры содержат амин- реакционно-способную группу на одном конце и сульфгидрил- реакционно-

способную группу на другом конце. Соответственно, эти кросс-линкеры подходят для применения с цистеин- или лизин-сконструированными XTEN или с альфа-аминогруппой N-конца XTEN. Неограничивающими примерами гетеробифункциональных кросс-линкеров являются АМАС (*N*-(α-малеинимидоацетокси)-сукцинимид эфир), БМПС (*N*-(β-малеинимидопропилокси) сукцинимид эфир), ЭМКС (*N*-(ε-малеинимидокапроилокси)сукцинимид эфир), ГМБС (*N*-(γ-малеинимидобутирилокси)сукцинимид эфир), ЛЦ-СМЦК (сукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил) циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), МБС (*m*-малеинимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид эфир), СБАП (сукцинимидил 3-(бромоацетамидо)пропионат), СИА (*N*-сукцинимидил йодоацетат), СИАБ (*N*-сукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), СМФБ (сукцинимидил 4-(п-малеинимидофенил) бутират), СМЦК (сукцинимидил 4-(*N*-малеинимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат), СМ[ПЭГ]$_2$ (NHS-ПЭГ2-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_4$ (NHS-ПЭГ4-малеинимид), СМ(ПЭГ)$_6$ (NHS-ПЭГ6-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_8$ (NHS-ПЭГ8-малеинимид), СМ[ПЭГ]$_{12}$ (NHS-ПЭГ12-малеинимид), СМ(ПЭГ)$_{24}$ (NHS-ПЭГ24-малеинимид), СМФБ (сукцинимидил 4-(*n*-малеинимидо-фенил)бутират), СМПГ (сукцинимидил-6-(β-малеинимидопропионамидо)гексаноат), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол), СПДП (*N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ЭМКС (*N*-(ε-малеинимидокапроилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ГМБС (*N*-(γ-малеинимидобутрилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-КМУС (*N*-(к-малеинимидоундеканоилокси)сульфосукцинимид эфир), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]-толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-МБС (*m*-малеинимидобензоил-*N*-гидроксисульфосукцинимид эфир), сульфо-СИАБ (сульфосукцинимидил(4-йодоацетил)аминобензоат), сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-СМФБ (сульфосукцинимидил 4-(*n*-малеинимидофенил)бутират). Примером гетеробифункционального кросс-линкера, который обеспечивает возможность ковалентной конъюгации амин- и сульфгидрил-содержащих молекул, является сульфо-СМЦК (сульфосукцинимидил 4-(*N*-малеинимидометил)циклогексан-1-карбоксилат). Сульфо-СМЦК представляет собой водорастворимый аналог СМЦК, который можно получать в водных буферах вплоть до концентрации в 10 мМ. Циклогексановое кольцо в составе спейсерной “ножки” данного кросс-линкера снижает скорость гидролиза малеинимидной группы по сравнению с аналогичными реагентами, не содержащими такое кольцо. Данный факт делает возможными лиофилизацию XTEN, который был малеинимид-активирован при помощи СМЦК или сульфо-СМЦК, и его сохранение для дальнейшей

конъюгации с сульфгидрил-содержащей молекулой. Таким образом, в одном варианте реализации в изобретении предложен XTEN-кросс-линкер, содержащий XTEN, обладающий по меньшей мере около 80% идентичности в последовательности, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% идентичности в последовательности, либо является идентичным последовательности или фрагменту последовательности, выбранной из Таблицы 3, в случае оптимального выравнивания, при этом XTEN-кросс-линкер содержит один или более кросс-линкеров сульфо-СМЦК, связанных с α-аминогруппой XTEN или ε-амином лизин-сконструированного XTEN. В другом варианте реализации в изобретении предложен XTEN-кросс-линкер, содержащий XTEN, обладающий по меньшей мере около 80% идентичности в последовательности, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% идентичности в последовательности, либо является идентичным последовательности или фрагменту последовательности, выбранной из Таблицы 2, в случае оптимального выравнивания, при этом XTEN-кросс-линкер содержит один сульфо-СМЦК, связанный с аминогруппой N-конца XTEN. Вышеописанные гетеробифункциональные кросс-линкеры соединяют две молекулы посредством одиночного амина или одиночного цистеина. Для сайт-специфической конъюгации к дисульфидным мостикам в белках был разработан особый тип кросс-линкеров (Balan S. et al. Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge. (2007) Bioconjugate Chem. 18, 61-76; Brocchini S. et al. Disulfide bridge based PEGylation of proteins. (2008) Advanced Drug Delivery Reviews 60, 3-12). Сначала синтезируют линкер в виде амин-специфичного эфира 4-[2,2-бис[*n*-толилсульфонил)метил]ацетил) бензойной кислоты-NHS. Эту молекулу можно ковалентно присоединить к аминогруппе XTEN, чтобы получить XTEN-бис(сульфон). Инкубация последней молекулы в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,8, приведет к устранению толуолсульфиновой кислоты и получению XTEN-α,β-ненасыщенного β'-моносульфона. Полученная в результате молекула будет вступать в реакцию с содержащим дисульфидный мостик нагрузочным белком сайт-специфическим способом. На первом этапе дисульфидный мостик преобразуется посредством восстановления в два тиола. На втором этапе XTEN-моносульфон бис-алкилирует два цистеина, что приводит к образованию химически стабильного трехуглеродного мостика. Тот же самый α,β-ненасыщенный β'-моносульфон можно применять не только для конъюгации двух тиоловых групп, полученных из дисульфидного мостика, но также для конъюгации с полигистидиновыми маркерами (Cong Y. et al. Site-specific PEGylation at histidine tags. (2012) Bioconjugate Chem. 23, 248-263).

[00336] Конъюгацию с использованием композиций XTEN-кросс-линкер с сульфо-СМЦК обычно проводят в два этапа. В одном варианте реализации изобретения амин-содержащий белок готовят в конъюгационном буфере, например, фосфатно-солевом буфере (ФСБ = 100 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, pH 7,2) или подобном, буфере, не содержащем аминов и сульгидрилов, при pH 6,5-7,5. Добавление ЭДТК до 1-5 мМ помогает хелатировать двухвалентные металлы, тем самым снижая образование дисульфидов в сульфгидрил-содержащем белке. Концентрация амин-содержащего белка определяет необходимый молярный выход кросс-линкера. В общем случае в белковых образцах < 1 мг/мл используется 40-80-кратный молярный выход, в белковых образцах в 1-4 мг/мл используется 20-кратный молярный выход, а в белковых образцах в 5-10 мг/мл используется 5-10-кратный молярный выход кросс-линкера. Реакционную смесь (амин-содержащий белок и кросс-линкер) инкубируют на протяжении 30 минут при комнатной температуре или на протяжении 2 часов при 4°С, а затем излишек кросс-линкеров удаляют при помощи обессоливающей колонки, уравновешенной конъюгационным буфером. В случае получения XTEN-кросс-линкер, композицию удерживают в этой точке. В вариантах реализации, в которых XTEN-кросс-линкер конъюгируют с нагрузочным веществом, сульфгидрил-содержащее нагрузочное вещество и конъюгат XTEN-кросс-линкер смешивают в молярном соотношении, соответствующим тому, которое требуется для результирующего конъюгата (принимая во внимание количество ожидаемых кросс-линкеров, конъюгированных с одной или более аминогруппами, на молекулу XTEN), и в соответствии с единственной сульфгидрильной группой, содержащейся в нагрузочном веществе. Реакционную смесь инкубируют на протяжении 30 минут или 2 часов при 4°С. Эффективность конъюгации можно оценить при помощи SDS-PAGE, сопровождающимся окрашиванием белка, или при помощи соответствующего метода аналитической хроматографии, такого как обращенно-фазовая HPLC или катионо/анионообменная хроматография.

[00337] В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции XTEN-кросс-линкер, созданные с применением мультивалентных кросс-линкеров, что приводит к образованию композиций, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6 или более XTEN. В другом варианте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции XTEN-кросс-линкер-нагрузочное вещество, созданные с применением мультивалентных кросс-линкеров, что приводит к образованию композиций, которые содержат 2, 3, 4, 5, 6 или более XTEN, связанных с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более различными нагрузочными веществами. Неограничивающими примерами мультивалентных трифункциональных кросс-линкеров являются “Y-образный” сульфгидрил- реакционно-способный ТМЭА (*трис*-(2-малеинимидоэтил)амин) и ТСАТ (*трис*-(сукцинимидил аминотриацетат)). Используя

каркасный полимер, как линейный, так и разветвленный, можно разработать любую комбинацию реакционно-способных веществ для мультивалентных композиций. Примеры показаны на ФИГ. 7, где конструкции могут содержать любую комбинацию гомо- или гетерофункциональных реакционно-способных групп. Особый интерес представляют тримерные конфигурации, схематически показанные на ФИГ. 21-23 и 97-105, а также тетрамерные конфигурации, показанные на ФИГ. 21 и 105-106. Не привязываясь к конкретной теории, предполагается, что в конъюгационной композиции, содержащей три XTEN, связанных трифункциональным линкером (с нагрузочными веществами, в свою очередь связанными с XTEN посредством включенных остатков лизина или цистеина), можно использовать пропорционально более короткий XTEN для каждой “ножки” конструкции по сравнению с моновалентной композицией XTEN-нагрузочное вещество, в которой такое же самое количество нагрузочных веществ связано с цистеином или лизином либо N-концевыми аминоостатками каждого из XTEN, а результирующая тримерная композиция XTEN-нагрузочное вещество будет иметь кажущуюся молекулярную массу и гидродинамический радиус сравнимые с мономерной композицией XTEN-нагрузочное вещество, но при этом будет иметь меньшую вязкость, что способствует введению композиции пациенту через иглы малого диаметра, и обеспечит равноценное или лучшее действие нагрузочных веществ благодаря сниженному стерическому несоответствию и повышенной гибкости композиции по сравнению с мономерной композицией XTEN-нагрузочное вещество, содержащей такое же самое количество аминокислот.

[00338] В одном варианте реализации в изобретении предложена композиция, содержащая три XTEN, связанных трехвалентным кросс-линкером, при этом раствор, содержащий приблизительно 100 мг/мл белка данной композиции, имеет вязкость, которая по меньшей мере на около 5 сП, или около 6 сП, или около 7 сП, или около 8 сП, или около 9 сП, или около 10 сП ниже, чем соответствующая ей величина для линейного XTEN с такими же молекулярной массой и концентрацией. В другом варианте реализации в изобретении предложена композиция, содержащая четыре XTEN, связанных четырехвалентным кросс-линкером, при этом раствор, содержащий приблизительно 100 мг/мл белка данной композиции, имеет вязкость, которая по меньшей мере на около 5 сП, или около 6 сП, или около 7 сП, или около 8 сП, или около 9 сП, или около 10 сП ниже, чем соответствующая ей величина для линейного XTEN с такими же молекулярной массой и концентрацией.

[00339] В способах получения таких композиций, в которых используются мультивалентные кросс-линкеры, можно применять такие же условия реакций, так те, что описаны в данном тексте выше, а пример реализации данного способа и сопутствующие данные приведены ниже в Примерах. Вдобавок, мультивалентные кросс-линкеры можно легко получить посредством

модификации олигомеров лизина. Например, пептид Lys-Lys содержит три аминогруппы, одну альфа-аминогруппу и две эпсилон-аминогруппы на каждом остатке Lys. Эти аминогруппы можно преобразовать в большое количество других реакционно-способных групп, посредством проведения реакции с бифункциональными кросс-линкерами, которые имеют одну амин-реакционно-способную группу. Например, реакция Lys-Lys с кросс-линкером ДБЦО-NHS дает на выходе продукт, который содержит три ДБЦО группы. Реакция Lys-Lys с кросс-линкером N-мал-NHS дает на выходе продукт, который содержит три N-мал группы. Аналогичным путем можно получить четырехвалентные кросс-линкеры на основе Lys-Lys-Lys и кросс-линкеры большей валентности при помощи более длинных пептидов лизина.

[00340] Кросс-линкеры могут быть классифицированы как “гомобифункциональные” или “гетеробифункциональные”, при этом гомобифункциональные кросс-линкеры содержат две или более идентичных реакционно-способные группы и применяются в одноэтапных реакционных процессах для произвольного связывания или полимеризации молекул, содержащих подобные функциональные группы, а гетеробифункциональные кросс-линкеры обладают различными реакционно-способными группами, которые обеспечивают возможность одноэтапной конъюгации молекул, которые имеют соответствующие целевые функциональные группы, или обеспечивают возможность последовательной (двухэтапной) конъюгации, что минимизирует нежелательную полимеризацию или самоконъюгацию. В предпочтительном варианте реализации изобретения, в котором XTEN-кросс-линкеры получены и выделены в виде композиций для последующей реакции, XTEN-кросс-линкер связан с гетеробифункциональным кросс-линкером и содержит по меньшей мере одну реакционно-способную группу, доступную для последующей реакции.

[00341] В одном варианте реализации в изобретении предложены XTEN-кросс-линкеры и XTEN-нагрузочные вещества, которые конъюгированы посредством отщепляемых кросс-линкеров с дисульфидными связями. Обычно отщепление стимулируется веществами, восстанавливающими дисульфидные связи, такими как β-меркаптоэтанол, ДТТ, ТХЭФ, при этом предполагается, что такие композиции будут эндогенно отщепляться эндогенными восстановительными веществами (такими как цистеин и глутатион) способом, предусматривающим медленное высвобождение. Далее приведены неограничивающие примеры таких кросс-линкеров: АПДП (*N*-(4-[*n*-азидосалициламидо]бутил)-3'-(2'-пиридилдитио) пропионамид), БАСЭД (*Бис* (β-[4-азидосалициламидо]этил) дисульфид), ДПДПБ (1,4-ди-(3'-[2'пиридилдитио]пропионамидо) бутан), ДСП (дитиобис(сукцимидилпропионат), реагент Ломанта), ДТБП (диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат), ДТМЭ (дитиобис-малеинимидоэтан), ДТССП (сульфо-ДСП) (3,3'-дитиобис (сульфосукцинимидилпропионат)), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2-

пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), ПДПГ (3-(2-пиридилдитио)пропионилгидразид), СДАД (NHS-СС-диазирин), СМПТ (4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-α-(2-пиридилдитио)толуол), СПДП (*N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), сульфо-ЛЦ-СМПТ (сульфосукцинимидил 6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]-толуамидо)гексаноат), сульфо-ЛЦ-СПДП (сульфосукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат), сульфо-САЭД (сульфосукцимидил 2-[7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо]этил-1,3'-дитиопропионат), сульфо-САНД (сульфосукцинимидил-2-(м-азидо-*о*-нитробензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат), сульфо-СДАД (сульфо-NHS-СС-диазирин), сульфо-СФАД (сульфосукцинимидил(перфторазидобензамидо)этил 1,3'-дитиопропионат). В другом варианте реализации изобретения конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие БСОКОЭС (Бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этил)сульфон), могут расщепляться в щелочных средах. В другом варианте реализации изобретения конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие ДСТ (дисукцинимидил тартарат) и БМДБ (1,4 бисмалеинимидил1-2,3-дигидроксибутан), могут расщепляться посредством окисления периодатом. ЭГС (этиленгликоль *бис*(сукцинимидилсукцинат)) и сульфо-ЭГС (этиленгликоль бис(сульфо-сукцинимидилсукцинат)) расщепляются гидроксиламином, но, как ожидается, должны расщепляться эндогенно так, что будет происходить высвобождение активного нагрузочного вещества из конъюгата.

[00342] В общем случае для вышеописанных конъюгационных реагентов предполагается, что кросс-линкер вступает в реакцию с группами, являющимися в других случаях стабильными и инертными, такими как амины, сульфгидрилы и карбоксилы. В других вариантах реализации в изобретении предложен отличный подход к конъюгации, основанный на отдельных модификациях XTEN и нагрузочного вещества с двумя функциональными группами, которые в общем случае являются стабильными и неактивными в отношении биополимеров, но при этом высокореактивны по отношению друг к другу. В соответствии с концепцией клик-химии было отобрано несколько ортогональных реакций, которые обеспечивают выход реактантов XTEN-азид/алкин, которые обладают высокостабильными свойствами и, следовательно, исключительно подходят для последующей конъюгации с нагрузочными веществами в отдельной реакции (Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40(11), 2004-2021). В общем случае клик-химия используется в качестве концепции для проведения реакций, которые включают реакции с участием (1) алкин-азида; (2) “ен”-тиола и (3) альдегид-гидразида, а в изобретении предусматривается применение всех трех этих реакций. Одним из примеров является реакция Хьюсгена – 1,3-диполярное циклоприсоединение алкинов к азидам до образования 1,4-двузамещенных-1,2,3-триазолов, как показано на ФИГ. 8. Азидные и

алкиновые компоненты можно внести в пептид/белок, или нагрузочные лекарственные вещества, или в XTEN путем химической модификации N-концевых α-аминогрупп, ε-аминогрупп лизина и сульфгидрильных групп цистеина. В Таблице 15 приведены неограничивающие примеры реактантов клик-химии, предназначенных для применения в получении конъюгационных композиций, причем один компонент предполагаемого конъюгата (и XTEN либо нагрузочное вещество) реагирует с реактантом 1 из Таблицы, а второй компонент (нагрузочное вещество или XTEN) реагирует с азидным реактантом 2 из Таблицы. Например, одну молекулу модифицируют при помощи алкинового компонента, используя амин- реакционно-способный алкин, такой как 3-пропаргилоксипропановая кислота, NHS эфир, ацетилен-ПЭГ4-NHS эфир, дибензилциклооктин (ДБСО)-NHS эфир, ДБСО-ПЭГ4-NHS эфир, циклооктин (ЦОТ)-ПЭГ2-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ3-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ4-NHS эфир, ЦОТ-ПЭГ2-пентафторфенил (ПФФ) эфир, ЦОТ-ПЭГ3-ПФФ эфир, ЦОТ-ПЭГ4-ПФФ эфир, БЦОТ-ПЭГ2-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ3-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ4-NHS эфир, БЦОТ-ПЭГ2-ПФФ эфир, БЦОТ-ПЭГ3-ПФФ эфир, БЦОТ-ПЭГ4-ПФФ эфир. В альтернативном варианте молекулу модифицируют сульфгидрил- реакционно-способным алкином, таким как ацетилен-ПЭГ4-малеинимид, ДБЦО-малеинимид или ДБЦО-ПЭГ4-малеинимид. Вторую молекулу модифицируют азид-ПЭГ2-NHS эфиром, азид-ПЭГ3-NHS эфиром, азид-ПЭГ4-NHS эфиром, азид-ПЭГ2-ПФФ эфиром, азид-ПЭГ3-ПФФ эфиром, азид-ПЭГ4-ПФФ эфиром или азид-ПЭГ4-малеинимидом. Азидный и алкиновый компоненты можно использовать взаимозаменяемо; они являются биологически уникальными, стабильными и инертными в отношении биологических молекул и водных сред. При смешивании азидные и алкиновые реактанты образуют необратимую ковалентную связь без каких-либо побочных реакций (Moses J.E. and Moorhouse A.D. The growing applications of click chemistry. (2007) Chem. Soc. Rev. 36, 1249–1262; Breinbauer R. and Köhn M. Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry. (2003) ChemBioChem 4(11), 1147–1149; Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes.(2002) Angew Chem Int Ed Engl. 41(14), 2596-2599). В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий первый XTEN, соединенный со вторым XTEN, при этом первый XTEN связан с алкиновым реактантом 1 из Таблицы 15, второй XTEN связан с азидным реактантом 2 из Таблицы 15, и первый XTEN и второй XTEN соединяют в условиях, стимулирующих реакцию между алкиновым реактантом 1 и азидным реактантом 2, что приводит к образованию конъюгата XTEN-XTEN. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий первый XTEN, соединенный с нагрузочным веществом, при этом XTEN связан с алкиновым реактантом 1 из Таблицы 15, нагрузочное вещество связано с азидным реактантом 2 из Таблицы 15, и затем XTEN и

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

Таблица 15: Алкиновые и азидные реактанты клик-химии

Алкиновый реактант 1	Присоединен к:	Азидный реактант 2	Присоединен к:
3-пропаргилоксипропановая ксилота, NHS эфир*	Амин	3-азид-пропионовая кислота, NHS эфир*	Амин
ацетилен-(оксиэтил)$_n$-NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин	6-азид-гексановая кислота, NHS эфир*	Амин
дибензилциклооктин (ДБЦО)-NHS эфир*	Амин	3-азид- пропионовая кислота, ПФФ эфир	Амин
ДБЦО-(оксиэтил)$_n$- NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин	6-азид- гексановая кислота, ПФФ эфир	Амин
циклооктин (ЦОТ)-NHS эфир*	Амин	азид-(оксиэтил)$_n$NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин
ЦОТ-(оксиэтил)$_n$- NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин	азид-(оксиэтил)$_n$- PFP эфир, где n равно 1-10	Амин
ЦОТ-(оксиэтил)$_n$-пентафторфенил (ПФФ) эфир, где n равно 1-10	Амин	1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-овая кислота N-гидроксисукцинимид эфир	Амин
БЦОТ-NHS эфир*	Амин	азид-(оксиэтил)$_n$-	Тиол

		малеинимид, где n равно 1-10	
БЦОТ-(оксиэтил)$_n$- NHS эфир*, где n равно 1-10	Амин		
БЦОТ-(оксиэтил)$_n$-пентафторфенил (ПФФ) эфир, где n равно 1-10	Амин		
6-(11,12-дидегидродибензо[b,f]азоцин-5(6H)-ил)-6-оксогексановая кислота N-гидроксисульфосукцинимид эфир	Амин		
ацетилен-(оксиэтил)$_n$-малеинимид, где n равно 1-10	Тиол		
ДБЦО-малеинимид	Тиол		
ЦОТ-малеинимид	Тиол		
БЦОТ-малеинимид	Тиол		

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

[00343] В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты XTEN-XTEN и конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество конъюгированы при помощи клик-химии на основании тио-енов, реакции которой протекают как свободнорадикальная реакция, называемая тиол-еновой реакцией, или как анионная реакция, называемая тиоловым присоединением по Михаэлю (смотрите ФИГ. 9) (Hoyle C. E. and Bowman C.N. Thiol-ene click chemistry. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 1540-1573). В частности, считается, что тиоловое присоединение по Михаэлю больше подходит для конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество в случае, если нагрузочное вещество является белком (Pounder R. J. et. al. Metal free thiol-maleimide 'Click' reaction as a mild functionalisation strategy for degradable polymers. (2008) *Chem Commun (Camb).* 41, 5158-5160). Так как необходимо, чтобы по меньшей мере одна молекула содержала тиоловую группу, цистеин-сконструированный XTEN можно использовать в случае, если нагрузочное вещество не содержит цистеин. В альтернативном варианте тиоловую группу можно внести путем химической модификации N-концевой α-аминогруппы или ε-аминогрупп лизина, принадлежащих XTEN или пептиду/белку нагрузочного вещества, при помощи тиолирующих реагентов, таких как 2-иминотиолан (реагент Траута), САТА (N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат), САТП (N-сукцинимидил S-ацетилтиопропионат), САТ-PEO$_4$-Ац (N-сукцинимидил S-ацетил(тиотетраэтиленгликоль)), СПДП (*N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат), ЛЦ-СПДП (сукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат). Подобные методы известны в данной области (Carlsson J. et al. (1978) *Biochem. J.* 173, 723-737; Wang D. et al. (1997) *Bioconjug. Chem.* 8, 878-884; Traut R.R. et al. (1973) *Biochemistry* 12(17), 3266-3273; Duncan, R.J.S. et.al. (1983) *Anal. Biochem.* 132. 68-73; патент США № 5,708,146). Для второго компонента реакции тиолового

присоединения по Михаэлю необходим реагент с электронодефицитной двойной связью углерод-углерод, такой, какая существует в (мет)акрилатах, малеинимидах, α,β-ненасыщенных кетонах, эфирах фумаровой кислоты, акрилонитриле, циннаматах и кротонатах. Обычно в качестве сульфгидрил- реакционно-способных функциональных элементов применяют N-малеинимиды, которые можно внести в белок нагрузочного вещества или молекулу XTEN путем модификации N-концевой α-аминогруппы или ε-аминогруппы лизина, используя коммерчески доступные гетеробифункциональные кросс-линкеры, такие как АМАС (*N*-(α-малеинимидоацетокси)-сукцинимид эфир), БМПС (*N*-(β-малеинимидопропилокси) сукцинимид эфир) и другие вышеописанные линкеры. Полученные в результате две молекулы, содержащие свободные тиоловые и малеинимидные компоненты соответственно, образуют стабильную ковалентную связь в нежестких условиях, что приводит к образованию XTEN-нагрузочное вещество, связанного малеинимидом.

[00344] В других вариантах реализации изобретения конъюгаты XTEN-XTEN и конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество создают, используя клик-химию, основанную на реакциях между гидразидами и альдегидами, такими как те, что описаны у Ganguly et al. и показаны на ФИГ. 10 (Ganguly T. et al. The hydrazide/hydrazone click reaction as a biomolecule labeling strategy for M(CO)3 (M = Re, 99mTc) radiopharmaceuticals. (2011) *Chem. Commun.* 47, 12846-12848). Например, XTEN можно модифицировать так, чтобы он содержал гидразин или гидразид, который смешан с нагрузочным веществом, содержащим альдегидную группу, чтобы получить необходимый конъюгат XTEN-нагрузочное вещество. В одном варианте реализации в изобретении предложен XTEN с по меньшей мере одним гидразином или гидразидом, внесенным в α-N-концевую аминогруппу или, в альтернативном варианте, с модифицированными одной или более ε-аминогруппами лизина, для того, чтобы получить XTEN, подходящий в качестве реагента для конъюгации с целевым нагрузочным веществом, так как он считается стабильным. Полученные в результате бис-арилгидразоны, образуемые ароматическими гидразинами и ароматическими альдегидами, стабильны вплоть до 92°C в широком диапазоне величин pH от 2,0-10,0 (Solulink, Inc., Protein-Protein Conjugation Kit, Technical Manual, Catalog # S-9010-1). Замещаемой группой в реакции является вода, и для стабилизации связи не требуются восстанавливающие вещества (например, цианоборогидрид натрия). Молекулы, модифицированные гидразин/гидразидными или альдегидными компонентами, обладают высокой стабильностью в водных средах и остаются активными, не требуя специальной обработки. Аминогруппу(ы) молекулы XTEN модифицируют при помощи NHS-эфир/гидразида, такого как САНГ (сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразона), С6-САНГ (С6-сукцинимидил 4-гидразиноникотинат ацетон гидразона), СГТГ (сукцинимидил 4-гидразидотерефталат гидрохлорида). В стандартной реакции белок готовят в

виде 1-5 мг/мл раствора в модифицирующем буфере (100 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 7,4), модифицирующее вещество добавляют с 5-20-кратным молярным избытком, а реакцию проводят на протяжении 2 часов при комнатной температуре. Молекулу нагрузочного вещества отдельно модифицируют при помощи NHS-эфир/альдегида СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоата) или С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоата) в аналогичных условиях. Затем обе модифицированные молекулы обессоливают в конъюгационном буфере (100 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 6,0). Полученные в результате компоненты смешивают вместе, используя 1 мольный эквивалент ограничивающего белка и 1,5-2 мольных эквивалента белка, который можно использовать в большом количестве. Каталитический буфер из 100 мМ анилина в 100 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 6,0, добавляют для доведения конечной концентрации анилина до 10 мМ, а реакцию проводят на протяжении 2 часов при комнатной температуре.

[00345] В другом варианте реализации изобретения конъюгат XTEN-нагрузочное вещество можно получить посредством реакции между альдегидом и первичной аминогруппой с последующим восстановлением основания Шиффа борогидридом или цианоборогидридом натрия. На первом этапе данного способа молекулу XTEN, такую как XTEN с первичной α-аминогруппой или Lys-содержащий XTEN с ε-аминогруппой, модифицируют при помощи NHS-эфир/альдегида СФБ (сукцинимидил 4-формилбензоата), С6-СФБ (С6-сукцинимидил 4-формилбензоата) или СФФА (сукцинимидил 4-формилфеноксиацетата), используя стандартную химию амин-NHS в не содержащем аминов соединительном буфере, таком как 0,1 М фосфата натрия, 0,15 М NaCl, pH 7,2. Полученный в результате модифицированный альдегид-XTEN можно удерживать в этой точке в качестве композиции XTEN-кросс-линкер либо можно использовать в качестве реагента для создания конъюгата XTEN-нагрузочное вещество. Для получения XTEN-нагрузочное вещество модифицированный альдегид-XTEN смешивают с нагрузочным веществом с реакционно-способной аминогруппой и слабым восстанавливающим веществом, таким как 20-100 мМ цианоборогидрид натрия. Реакционную смесь инкубируют до 6 часов при комнатной температуре либо на протяжении ночи при 4°С. Затем непрореагировавшие альдегидные группы блокируют 50-500 мМ Трис·HCl, pH 7,4 и 20-100 мМ цианоборогидрида натрия, делая возможным отделение конъюгированного очищенного XTEN-нагрузочное вещество.

[00346] В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие пептидные или белковые нагрузочные вещества, при этом нагрузочное вещество присоединено посредством химического лигирования на основе реакционной способности С-концевого ацилазида пептида/белка нагрузочного вещества. Как пример, когда пептид либо белок получают, используя твердофазный пептидный синтез

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

[00347] В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество, в которых конъюгацию проводят при помощи метода ортогонального лигирования белка, в котором начальный хемоселективный захват сопровождается внутримолекулярной перегруппировкой ацила, как показано на ФИГ. 12. Для хемоселективного захвата необходим нуклеофил или электрофил, расположенный непосредственно вблизи N-концевого амина, и другой совместимый электрофил или нуклеофил, расположенный непосредственно вблизи С-концевого эфира карбоновой кислоты. В одном варианте реализации изобретения отдельно предусматривается, что XTEN может служить как в качестве Белка1, так и Белка2 на ФИГ. 12. Таким образом, в альтернативных вариантах реализации изобретения XTEN может вступать в реакцию с соответствующими реагентами для получения тиоэфира на С-конце или вносить цистеин в N-конец для получения альтернативных композиций XTEN-кросс-линкер. При использовании вышеописанных конъюгатов XTEN-кросс-линкер для получения XTEN-нагрузочное вещество хемоселективный захват нуклеофильной и электрофильной пары, образующей эфир или тиоэфир, приводит N-концевую аминогруппу или С-концевой эфир соответствующих реактантов в такую непосредственную близость, которая обеспечивает возможность спонтанного внутримолекулярного перемещения ацила до образования амидной связи. Для большинства

реакций ортогонального лигирования не требуется защита групп боковых цепей, и они проходят в нежестких условиях, которые сходны с биологическими средами (Tam J. P., Xu J., Eom K. D. Methods and strategies of peptide ligation. (2001) *Biopolymers (Peptide Science)* 60, 194-205).

[00348] В другом варианте реализации изобретения конъюгаты можно создавать при помощи способа реакции, известной как нативное химическое лигирование (НХЛ), в котором участвует С-концевой тиоэфир в качестве электрофила и N-концевой цистеин в качестве нуклеофила. Результатом этой реакции является образование нативной амидной связи на участке лигирования конъюгата XTEN-нагрузочное вещество (Dawson P. E., Muir T. W., Clark-Lewis I., Kent S. B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. (1994) *Science* 266, 776-779; Tam J. P.; Lu Y.-A.; Liu C. F.; Shao, J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92, 12485–12489; Johnson, E.C.B.; Kent, S.B.H. J. Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 6640-6646; Kent S. B. (2009) Total chemical synthesis of proteins. (2009) *Chem. Soc. Rev.* 38:338–351). Первой аминокислотой С-концевого компонента в реакции НХЛ (показан как Белок2 на ФИГ. 12) является цистеин. Таким белком может являться XTEN, содержащий цистеин в первой позиции или любой другой белок, полученный посредством стандартного рекомбинантного белкового биосинтеза, включая пептидное/белковое нагрузочное вещество. N-концевой компонент (показан как Нагрузочное вещество на ФИГ. 13) приготовлен как С-концевой тиоэфир при помощи химического синтеза. Примеры способов синтеза тиоэфиров известны и доступны в данной области, например, такие, которые описаны в Li X., Kawakami T., Aimoto S., Direct preparation of peptide thioesters using an Fmoc solid-phase method. (1998) *Tetrahedron Lett.,* 39, 8660-8672; Ingenito R., Bianchi E., Fattori D., Pessi A. Solid-phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/tBu chemistry. (1999) *J. Am. Chem. Soc.,* 121, 11369-11374; Sewing A., Hilvert D. Fmoc-compatible solid-phase peptide synthesis of long C-terminal peptide thioesters. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 3395-3398; Brask J., Albericio F., Jensen K. J. ,Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters by masking as trithioorthoesters. (2003) *Org. Lett.,* 2003, 5, 2951-2953; Ollivier N., Behr J.-B., El-Mahdi O., Blanpain A., Melnyk O. Fmoc-solid-phase synthesis of peptide thioesters using an intramolecular N, S-acyl shift. (2005) *Org. Lett.,* 7, 2647-2650. Обычно предпочтительными являются α-алкилтиоэфиры, так как они просты в получении и хранении. Однако, из-за того, что они довольно инертны, реакцию лигирования катализируют путем *in situ* транстиоэтерификации с тиоловыми добавками, при этом наиболее обычными тиоловыми катализаторами являются меркаптоэтансульфонат (МЭСНа) или 4-меркаптофенилуксусная кислота (МФУК). Химическая конъюгация обычно длится несколько часов и дает высокий выход. В то время как все 20 аминокислот природного происхождения

подходят в качестве последнего остатка N-концевого компонента, наиболее высокие уровни лигирования наблюдали для глицина и гистидина, что делает XTEN исключительно подходящим для подобной реакции, так как примеры XTEN, приведенные в Таблице 2, практически все являются полипептидами, содержащими глицин в N-конце (Hackeng T.M. et al. Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10068-10073). В других вариантах реализации данного конъюгационного способа реакции ортогонального лигирования включают: (1) C-концевую тиокислоту с N-концевым бромаланином или N-концевым азиридином (Tam J. P.; Lu Y.-A.; Liu C. F.; Shao, J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 12485–12489); (2) C-концевую тиокислоту с N-концевым цистеин-пертиоэфиром (Liu, C. F., Rao, C., Tam, J. P. (1996) *Tetrahedron Lett.,* 37, 933–936); (3) C-концевую тиокислоту с N-концевым гомоцистеином (Tam J.P., Yu Q. Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones. (1998) *Biopolymers* 46(5), 319-327); и (4) C-концевую тиокислоту и N-концевой гистидин (Zhang L., Tam J. P. (1997) *Tetrahedron. Lett.* 38, 3–6). В данном способе получение C-концевых тиоэфиров при помощи химического синтеза накладывает ограничение на размер N-концевого компонента в реакции НХЛ. Однако применение метода лигирования экспрессированного белка (ЛЭБ) преодолевает ограничения по размеру пептидного α-тиоэфира, налагаемые особенностями химического синтеза (Muir T. W.; Sondhi D.; Cole P. A. Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6705-6710; Muir T.W. Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* 72, 249–289). Метод ЛЭБ основан на белковом сплайсинге – процессе, в котором белок подвергается внутримолекулярной перегруппировке, которая приводит к вытеснению внутренней последовательности (интеина) и присоединению боковых последовательностей (экстеинов). Последний процесс включает образование эфирных или тиоэфирных промежуточных продуктов. В практической реализации изобретения коммерчески доступные белковые экспрессионные векторы *Escherichia coli* обеспечивают возможность получения представляющих интерес белков, таких как XTEN, экспрессируемых в рамке, сшитой с последовательностью интеин-хитин-связывающего домена (CBD). В данном способе гибридный белок подвергается N-S-сдвигу, когда боковая цепь первого остатка цистеина интеиновой части белка-предшественника нуклеофильно воздействует на пептидную связь остатка, находящегося непосредственно выше (которым, например, является последний остаток XTEN), для образования линейного тиоэфирного промежуточного продукта, как показано на ФИГ. 13. Этап химического лигирования стимулируют посредством инкубации белка с тиофенолом (или другим тиоловым катализатором, таким как МЭСНа или МФУК) и цистеин-содержащим синтетическим пептидом или белком. Это приводит к *in situ* образованию

высокореактивного фенил-α-тиоэфир производного, например, белка XTEN, который затем быстро лигируется с синтетическим пептидным/белковым нагрузочным веществом для того, чтобы дать в результате необходимый конъюгат XTEN-нагрузочное вещество. В другом варианте реализации изобретения XTEN-тиоэфирный промежуточный продукт может быть отщеплен при помощи 50 мМ 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (МЭСК) в 20 мМ Na-ГЭПЭС, pH 8,5, 50–1000 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТК (по усмотрению), а полученный в результате меченный МЭСК белок может быть очищен и храниться при -80°C в 5 мМ бис Трис, pH 6,5, 250 мМ NaCl до применения его как конъюгата XTEN-кросс-линкер для реакций НХЛ в качестве N-концевого компонента вышеописанной конъюгации. С-концевым компонентом может быть нагрузочное вещество с пептидом/белком, как природного происхождения, так и синтетическим, с N-концевым цистеином.

[00349] В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество, в которых конъюгацию между XTEN и нагрузочным веществом проводят при помощи бесследного лигирования по Штаудингеру, которое, как и нативное химическое лигирование (НХЛ), приводит к образованию нативной амидной связи в участке лигирования. Преимуществом данного метода является отсутствие необходимости в цистеине в месте лигирования (Saxon, E.; Armstrong, C.R.; Bertozzi, C.R. A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds. (2000) *Org. Lett.* 2, 21412143; Nilsson, B.L.; Kiessling, L.L.; Raines, R.T. Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide. (2000) *Org. Lett.* 2, 1939-1941). Вместо этого, N-концевой Белок1 получают как С-концевой тиоэфир, используя дифенилфосфинметантиол (смотрите ФИГ. 14), а С-концевой Белок2 получают как N-концевой азид, который может быть образован в процессе реакции диазо-перемещения (Cavender C. J.; Shiner V. J., Jr. (1972) *J. Org. Chem.* 22, 3567–3569; Lundquist J. T., IV, Pelletier J. C. Improved solid-phase peptide synthesis method utilizing alpha-azide-protected amino acids. (2001) *Org. Lett.* 3, 781–783). Остаток фосфина вступает в реакцию с азидом Белка2 до образования иминофосфорана после удаления азота (реакция Штаудингера). Полученный в результате иминофосфоран со своим высоконуклеофильным атомом азота также может считаться аза-илидом. Затем нуклеофильный атом азота аза-илида воздействует на карбонильную группу Белка1, отщепляя тиоэфир. Нужно отдельно отметить, что как XTEN, так и нагрузочное вещество могут быть в этой реакции Белком1 или Белком2. Гидролиз перегруппированного продукта XTEN-нагрузочное вещество дает в конце нативный амид и выделяет фосфиновый компонент в виде оксида фосфина (V). Бис(*n*-диметиламиноэтилфенил)фосфинометантиол – водорастворимый вариант дифенилфосфинметантиола – опосредует быстрое лигирование эквимолярных субстратов в воде (Tam, A.; Soellner, M.B.; Raines, R.T. Water-soluble

phosphinothiols for traceless Staudinger ligation and integration with Expressed Protein Ligation. (2007) *J. Am. Chem. Soc.,* 129, 1142111-430).

[00350] В другом варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, полученные при помощи ферментативного лигирования. Трансглутаминазы представляют собой ферменты, которые катализируют образование изопептидной связи между γ-карбоксамидной группой глутамина нагрузочного пептида или белка и ε-аминогруппой лизина в лизин-сконструированном XTEN, тем самым создавая между- и внутримолекулярные перекрестные связи между XTEN и нагрузочным веществом (смотрите ФИГ. 15), что приводит к образованию композиции (Lorand L, Conrad S.M. Transglutaminases.(1984) Mol. Cell Biochem. 58(1-2), 9-35). Неограничивающими примерами ферментов, которые успешно применялись для лигирования, являются фактор XIIIa (Schense J.C., Hubbell J.A. Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa. (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(1):75-81) и тканевая трансглутаминаза (Collier J.H., Messersmith P.B. Enzymatic modification of self-assembled peptide structures with tissue transglutaminase. (2003) *Bioconjug. Chem.* 14(4), 748-755; Davis N. E., Karfeld-Sulzer L. S., Ding S., Barron A. E. Synthesis and characterization of a new class of cationic protein polymers for multivalent display and biomaterial applications. (2009) *Biomacromolecules* 10 (5), 1125-1134). Известно, что последовательность глутаминового субстрата GQQQL обладает высокой специфичностью к тканевой трансглутаминазе (Hu B.H., Messersmith P.B. Rational design of transglutaminase substrate peptides for rapid enzymatic formation of hydrogels.(2003*) J. Am. Chem. Soc.* 125(47), 14298-14299). Специфичность последовательности тканевой трансглутаминазы оказалась менее жесткой для ацил-акцептора (лизина), чем для ацил-донора (глутамина) (Greenberg C. S., Birckbichler P. J., Rice R. H. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. (1991) *FASEB J.* 1991, 5, 3071–3077).

[00351] В альтернативном варианте реализации ферментативно-созданной композиции XTEN-нагрузочное вещество используется фермент сортаза A транспептидаза из *Staphylococcus aureus* для катализирования расщепления короткой 5-аминокислотной последовательности распознавания LPXTG между остатками треонина и глицина Белка1 и последующего переноса ацил-фрагмента к N-концевому нуклеофилу олигоглицина Белка1 (смотрите ФИГ. 16). Функционализируя Белок2 так, чтобы он содержал олигоглицин, возможно ферментативно конъюгировать два белка сайт-специфическим способом для получения необходимой композиции XTEN-нагрузочное вещество. (Поли)пептид, несущий распознающий сортазу сайт (LPXTG) можно легко изготовить, используя стандартные протоколы молекулярного биологического клонирования. Глутаминовую кислоту удобно вносить в X-позицию сайта распознавания, так как этот остаток обычно обнаруживается в природных субстратах для

сортазы A (Boekhorst J., de Been M.W., Kleerebezem M., Siezen R. J. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 4928-4934). Высокого уровня трансацилирования можно достичь путем размещения сайта расщепления сортазой в С-конце субстрата (Popp M.W., Antos J.M., Grotenbreg G.M., Spooner E., Ploegh H.L. Sortagging: A versatile method for protein labeling. (2007) *Nat. Chem. Biol.* 311,707-708) и в гибких петлях (Popp M.W., Artavanis-Tsakonas K., Ploegh H.L. Substrate filtering by the active-site crossover loop in UCHL3 revealed by sortagging and gain-of-function mutations. (2009) *J. Biol. Chem.* 284(6), 3593-3602). Для белков, меченных в С-конце, важно, чтобы глицин в минимальном маркере LPETG не был размещен в С-конце; он должен находиться в пептидной связи с по меньшей мере одной дополнительной С-концевой аминокислотой. Вдобавок, лучшее связывание достигается путем добавления избыточного глицина в С-конец сайта расщепления для получения LPETGG (Pritz S., Wolf Y., Kraetke O., Klose J., Bienert M., Beyermann M. Synthesis of biologically active peptide nucleic acid-peptide conjugates by sortase-mediated ligation. (2007) *J. Org. Chem.* 72, 3909-3912; Tanaka T., Yamamoto T., Tsukiji S., Nagamune T. Site-specific protein modification on living cells catalyzed by sortase. (2008) *Chembiochem* 95, 802-807). Нуклеофилы, совместимые с опосредованной сортазой транспептидацией, имеют единственное структурное требование к удлинению остатков глицина со свободным аминоконцом. Успешной транспептидации можно достичь при помощи нуклеофилов, содержащих в любом месте от одного до пяти глицинов; при этом, в предпочтительном варианте реализации изобретения максимальную скорость реакции получали в присутствии двух или трех глицинов.

[00352] Хотя различные варианты реализации конъюгационной химии были описаны в контексте белок-белковой конъюгации, стоит отдельно отметить, что в практической реализации изобретения нагрузочный компонент конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество может являться низкомолекулярным лекарственным веществом в тех конъюгационных способах, которые применимы к функциональным группам, таким как амины, сульфгидрилы, карбоксилы, которые присутствуют в целевых низкомолекулярных лекарственных веществах. Специалисту в данной области будет понятно, что здесь можно применять более широкий диапазон химических методов по сравнению с белками и пептидами, чьи функциональные элементы обычно ограничены амино-, сульфгидрильными и карбоксильными группами. Лекарственные нагрузочные вещества можно конъюгировать к XTEN посредством функциональных групп, включая, но не ограничиваясь этим, первичные аминогруппы, аминокси, гидразид, гидроксил, тиол, тиолат, сукцинат (СУК), сукцинимидил сукцинат (СС), сукцинимидил пропионат (СПА), сукцинимидил бутаноат (СБА), сукцинимидил карбоксиметилат (СКМ), бензотриазол карбонат (БТК), N-гидроксисукцинимид (NHS), п-нитрофенилкарбонат (НФК). Другие подходящие реакционно-способные функциональные

группы нагрузочных лекарственных молекул включают ацеталь, альдегиды (например, ацетальдегид, пропиональдегид и бутиральдегид), альдегид гидрат, алкенил, акрилат, метакрилат, акриламид, активный сульфон, кислотный галид, изоцианат, изотиоцианат, малеинимид, винилсульфон, дитиопиридин, винилпиридин, йодоацетамид, эпоксид, глиоксал, дион, мезилат, тозилат и трезилат.

[00353] В другом варианте реализации изобретения нагрузочные лекарственные вещества можно также конъюгировать с конъюгатами XTEN-кросс-линкер, используя гетероциклическую кольцевую систему, в которой один или более из атомов кольца является гетероатомом, например, атомом азота, кислорода, фосфора или серы. Гетероциклическая группа содержит по меньшей мере от одного и вплоть до 20 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. В одном из вариантов реализации изобретения гетероцикл может являться моноциклом, содержащим от 3 до 7 элементов кольца (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов выбранных из N, O, P и S), или бициклом, содержащим от 7 до 10 элементов кольца (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов выбранных из N, O, P и S), например: бицикло [4,5], [5,5], [5,6], или [6,6] систему. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A. “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry”, W. A. Benjamin, New York, (1968); “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности, в томах 13, 14, 16, 19 и 28. Неограничивающие примеры гетероциклов, которые можно обнаружить в лекарственных веществах, подходящих для конъюгации, включают пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, тетрагидротиофенил, сернокислый тетрагидротиофенил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталенил, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азоцинил, триазинил, 6H-1,2,5-тиадиазинил, 2H,6H-1,5,2-дитиадиазинил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксантинил, 2H-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3H-индолил, 1H-индазолил, пиринил, 4H-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4Ah-карбазолил, карбазолил, β-карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперазинил, индолинил, изоиндолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолинил и изатиноил.

[00354] В некоторых вариантах реализации конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество с лекарственным веществом в качестве нагрузочного молекулы лекарственного вещества присоединены к лизин- или цистеин-сконструированному XTEN (такому, как последовательности из Таблицы 3) посредством кросс-линкеров, содержащих два реакционно-способных участка для связывания с лекарственным веществом и XTEN. Предпочтительными перекрестносшивающими группами являются те, которые относительно стабильны к гидролизу во время циркуляции, биоразлагаемы и нетоксичны во время отщепления от конъюгата. Вдобавок, использование кросс-линкеров может обеспечить возможность создания конъюгатов, обладающих большей вариативностью между лекарственным веществом и XTEN, либо обеспечить достаточное пространство между лекарственным веществом и XTEN так, что XTEN не будет препятствовать связыванию между фармакофором и участком связывания. В одном варианте реализации изобретения кросс-линкер содержит реакционно-способный участок, который содержит электрофильную группу, которая является реакционно-способной по отношению к нуклеофильной группе, присутствующей в составе XTEN. Предпочтительные нуклеофилы включают тиол, тиолат и первичный амин. Гетероатом нуклеофильной группы лизин- или цистеин-сконструированного XTEN является реакционно-способным по отношению к электрофильной группе в составе кросс-линкера и образует ковалентную связь с единицей кросс-линкера, что приводит к образованию конъюгата XTEN-кросс-линкер. Подходящие электрофильные группы для кросс-линкеров включают, но не ограничиваются этим, малеинимидные и галоацетамидные группы, и обеспечивают наличие участка, подходящего для присоединения к XTEN. В другом варианте реализации изобретения кросс-линкер содержит реакционно-способный участок, который содержит нуклеофильную группу, которая является реакционно-способной по отношению к электрофильной группе, присутствующей в составе лекарственного вещества, так, что конъюгация может произойти между XTEN-кросс-линкером и нагрузочным лекарственным веществом, что приводит к образованию конъюгата XTEN-лекарственное вещество. Подходящие электрофильные группы для лекарственного вещества включают, но не ограничиваются этим, гидроксильные, тиоловые, альдегидные, алкеновые, алкановые, азидные группы и карбонильные группы кетонов. Гетероатом нуклеофильной группы кросс-линкера может реагировать с электрофильной группой в составе лекарственного вещества и образовывать ковалентную связь. Подходящие нуклеофильные группы в составе кросс-линкера включают, но не ограничиваются этим, гидразид, оксим, амино, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразид. Электрофильная группа в составе лекарственного вещества обеспечивают наличие участка, подходящего для присоединения к кросс-линкеру.

[00355] В конкретном варианте реализации изобретения для конъюгации лекарственных веществ к эпсилон аминогруппе лизина лизин-сконструированных XTEN, являющихся предметом изобретения, используется реакционно-способное соединение лекарственное вещество-N-гидроксилсукцинимид или эфиры, такие как лекарственное вещество-сукцинимидил пропионат, или лекарственное вещество-сукцинимидил бутаноат, или другие конъюгаты лекарственное вещество-сукцинимид. В альтернативном варианте остатки лизина лизин-сконструированных XTEN, являющихся предметом изобретения, можно использовать для внесения свободных сульфгидрильных групп при помощи реакции с 2-иминотиоланом. В альтернативном варианте нацеленные на вещество лизины лизин-сконструированных XTEN, являющихся предметом изобретения, могут быть связаны с гетеробифункциональным реагентом, содержащим свободную гидразидную или альдегидную группу, доступную для конъюгации с активным лекарственным веществом. Реакционно-способные эфиры могут конъюгироваться при физиологическом уровне pH, но для менее активных производных обычно требуются более высокие значения pH. При применении лабильного белка можно также использовать низкие температуры. В условиях низкой температуры для реакции конъюгации может понадобиться более длительное реакционное время.

[00356] В другом конкретном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество с конъюгацией аминогруппы с остатками лизина лизин-сконструированных XTEN, являющихся предметом изобретения, при этом конъюгация стимулируется разницей между величинами pKa α-аминогруппы N-концевой аминокислоты (приблизительно от 7,6 до 8,0) и pKa ε-аминогруппы лизина (приблизительно 10). Для конъюгации концевой аминогруппы часто используют реакционно-способные соединения лекарственное вещество-альдегид (такие как лекарственное вещество-пропиональдегид или лекарственное вещество-бутилальдегид), которые являются более избирательными в отношении аминов и, таким образом, существует меньшая вероятность, что они будуть реагировать, например, с имидазольной группой гистидина. Вдобавок, аминоостатки вступают в реакцию с ангидридами янтарной или другой карбоновой кислоты, или с N,N′-дисукцинимидил карбонатом (ДСК), N,N′-карбонил диимидазолем (КДИ), или п-нитрофенил хлороформатом для получения активированного сукцинимидилкарбоната, имидазолкарбамата или п-нитрофенилкарбоната соответственно. Дериватизация этими веществами приводит к эффекту изменения заряда остатков лизина. Конъюгацию соединения лекарственное вещество-альдегид к концевой аминогруппе XTEN, являющегося предметом изобретения, обычно проводят в подходящем буфере при уровне pH, который дает возможность получить преимущество из разницы в pKa между ε-аминогруппами остатков лизина и α-аминогруппой N-концевого остатка белка. В способе данного варианта реализации изобретения в реакции

сопряжения используют pH в диапазоне от около pH 7 до около 8. Способы, подходящие для конъюгации эпсилон аминогруппы лизина были описаны в патенте США № 4,904,584 и в патенте США № 6,048,720.

[00357] Специалист в данной области примет во внимание то, что активационный способ и/или конъюгационная химическая реакция для применения в создании конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество зависит от реакционно-способных групп полипептида XTEN, а также от функциональных групп лекарственного компонента (например, амино, гидроксильных, карбоксильных, альдегидных, сульфгидрильных, алкеновых, алкановых, азидных и т.д.), функциональной группы реактанта лекарственное вещество-кросс-линкер или функциональной группы реактанта XTEN-кросс-линкер. Конъюгация лекарственного вещества может происходить в направлении конъюгации ко всем доступным присоединенным группам сконструированного полипептида XTEN, таким как специально сконструированные присоединенные группы инкорпорированных остатков цистеина или остатков лизина. Для того чтобы контролировать реактанты таким образом, чтобы конъюгация происходила в направлении подходящего реакционно-способного участка, в изобретении предусматривается использование защитных групп во время реакции конъюгации. “Защитная группа” представляет собой компонент, который предотвращает или блокирует реакцию конкретной химически реакционно-способной функциональной группы в молекуле при определенных условиях. Защитная группа будет варьироваться в зависимости от типа химически реакционно-способной группы, которую нужно защитить, а также от наличия дополнительных реакционно-способных групп в молекуле. Неограничивающие примеры функциональных групп, которые могут быть защищены, включают группы карбоновой кислоты, гидроксильные группы, аминогруппы, тиоловые группы и карбонильные группы. Типичные защитные группы для карбоновых кислот и гидроксилов включают эфиры (такие как п-метоксибензилэфир), амиды и гидразиды; для аминогрупп это карбаматы (такие как терт-бутоксикарбонил) и амиды; для карбонильных групп это ацетали и кетали и тому подобные. Такие защитные группы хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в T. W. Greene and G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis* , Third Edition, Wiley, New York, 1999, и перечисленных в работе ссылках. Конъюгацию можно провести в один этап или постадийным способом (например, как описано в WO 99/55377), например, посредством добавления промежуточного реакционного кросс-линкера, используя описанные в данном тексте кросс-линкеры или те, которые, как известно в данной области, подходят для конъюгации с остатками цистеина или лизина полипептидов, которые необходимо присоединить к реакционно-способным функциональным группам лекарственных молекул.

[00358] В некоторых вариантах реализации изобретения способ конъюгации кросс-линкера с цистеин-сконструированным XTEN может предполагать, что XTEN был предварительно обработан восстанавливающим веществом, таким как дитиотреитол (ДТТ) для того, чтобы восстановить любые дисульфидные остатки цистеина до образования высоконуклеофильных тиоловых групп цистеина (—CH_2 SH). Восстанавливающее вещество удаляют впоследствии при помощи любого стандартного метода, такого как обессоливание. Восстановленный XTEN реагирует, таким образом, с соединениями лекарственное вещество-линкер или перекрестносшивающими реагентами с электрофильными функциональными группами, такими как малеинимид или α-галокарбонил, в соответствии с, например, конъюгационным методом по Klussman et al. (2004) *Bioconjugate Chemistry* 15(4), 765-773. Конъюгацию кросс-линкера или лекарственного вещества с остатком цистеина обычно проводят в подходящем буфере с уровнем pH 6-9 при температурах, составляющих от 4°C до 25°C на протяжении периодов времени до около 16 часов. В альтернативном варианте остатки цистеина могут быть дериватизированы. Подходящие дериватизационные вещества и способы хорошо известны в данной области. Например, остатки цистеина наиболее часто вступают в реакцию с α-галоацетатами (и соответствующими аминами), такими как йодоуксусная кислота или йодоацетамид, до образования карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Остатки цистеина также дериватизируют при помощи реакции с бромтрифторацетоном, α-бромо-β-(4-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеинимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил 2-пиридилдисульфидом, п-хлоромутьбензоатом, 2-хлоромуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-пиразолом.

[00359] В некоторых случаях конъюгацию проводят в условиях, которые требуют, чтобы как можно больше доступных присоединенных групп XTEN прореагировало с молекулами лекарственного вещества или молекулами лекарственное вещество-линкер. Этого достигают посредством подходящего молярного избытка лекарственного вещества по отношению к полипептиду. Типичные молярные соотношения между молекулами активированного лекарственного вещества или молекулами лекарственное вещество-линкер и полипептидом составляют вплоть до приблизительно 1000-1, например, вплоть до приблизительно 200-1 или вплоть до приблизительно 100-1. В некоторых случаях соотношение может быть несколько ниже, например, вплоть до 50-1, 10-1 или 5-1. Также можно использовать эквимолярные соотношения.

[00360] В вариантах реализации конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, являющиеся объектами изобретения, сохраняют по меньшей мере часть фармакологической активности по сравнению с соответствующим нагрузочным веществом, неприсоединенным к XTEN. В одном

варианте реализации изобретения XTEN-нагрузочное вещество сохраняет по меньшей мере около 1%, или по меньшей мере около 5%, или по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% фармакологической активности нагрузочного вещества, неприсоединенного к XTEN.

[00361] В одном варианте реализации конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество можно сконструировать так, чтобы при попадании в организм происходило высвобождение нагрузочного вещества посредством неспецифического или ферментативного гидролиза линкера, включая восстановление дисульфидной связи, pH-зависимое высвобождение, либо при помощи экзогенных или эндогенных протеаз, включая протеазы из таблицы 9. Макромолекулы могут поглощаться клеткой вследствие рецептор-опосредованного эндоцитоза, адсорбционного эндоцитоза или пиноцитоза (Jain R.K. Transport of molecules across tumor vasculature. (1987) *Cancer Metastasis Rev.* 6(4), 559-593; Jain R.K. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. (1999) *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 1, 241-263; Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.R. Endocytosis. (1997) *Physiol. Rev.* 77(3), 759-803). После клеточного поглощения конъюгата XTEN-нагрузочное вещество, нагрузочное вещество может высвобождаться вследствие низких величин pH в эндосомах (pH 5,0 – 6,5) и лизосомы (pH 4,5 – 5,0), а также при помощи липосомных ферментов (например, эстераз и протеаз). Примером кислотно-чувствительного кросс-линкера является 6-малеинимидокапроил гидразон, который может сочетаться с тиол-содержащими носителями. Гидразонные линкеры быстро отщепляются при величинах pH < 5, обеспечивая возможность высвобождения нагрузочного вещества в кислой pH-среде эндосом и липосом с последующей интернализацией конъюгата (Trail P.A. et al. Effect of linker variation on the stability, potency, and efficacy of carcinoma-reactive BR64-doxorubicin immunoconjugates. (1997) *Cancer Res.* 57(1), 100-105; Kratz F. et al. Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6-maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin. (2007) *Hum. Exp. Toxicol.* 26(1), 19-35). Клинически одобренный конъюгат mAb-лекарственное вещество гемтузумаб озогамицин (Милотарг™) представляет собой конъюгат лекарственное вещество-антитело, содержащий гуманизированное mAb P67.6 против CD33, химически связанное с цитотоксическим антибиотическим веществом калихеамицином. Линкер между антителом и лекарственным веществом содержит две лабильные связи: гидразона и стерически затрудненную дисульфидную связь. Было показано, что кислотно-чувствительная связь гидразона является фактическим сайтом расщепления (Jaracz S., Chen J., Kuznetsova L.V., Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. (2005) *Bioorg. Med. Chem.* 13(17), 5043-5054).

[00362] Для тех конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество, в которых нагрузочное вещество присоединено посредством дисульфидной связи, нагрузочное вещество может отделяться от XTEN при помощи восстановления дисульфидной связи в составе лабильного линкера. Например, huN901–DM1 представляет собой активирующееся при наличии опухоли иммунотерапевтический пролекарственное вещество, разработанное ImmunoGen, Inc. для лечения мелкоклеточного рака легких. Пролекарственное вещество состоит из гуманизированного анти-CD56 mAb (huN901), коньюгированного с микротрубочным ингибитором майтанзиноидом DM1. В среднем 3,5 – 3,9 молекул DM1 связываются с каждым антителом при помощи затрудненных дисульфидных связей. Хотя в крови дисульфидная связь является стабильной, она быстро расщепляется при попадании в клетку, являющуюся мишенью для huM901, высвобождая, таким образом, активный DM1 (Smith S.V. Technology evaluation: huN901-DM1, ImmunoGen. (2005) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7(4), 394-401). Также DM1 соединяли с MLN-591 от Millennium Pharmaceuticals - специфическим мембранным антигеном простаты mAb. DM1 присоединен к антителу посредством затрудненной дисульфидной связи, которая обеспечивает сывороточную стабильность и в то же время делает возможным внутриклеточное высвобождение лекарственного вещества при интернализации (Henry M.D. et al. A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer. (2004) *Cancer Res.* 64(21), 7995-8001).

[00363] Высвобождения нагрузочного вещества из XTEN-носителя можно достичь путем создания композиций с содержанием коротких отщепляемых пептидов в качестве линкеров между нагрузочным веществом и XTEN. Примером клинически определенного конъюгата является конъюгат доксорубицин-ГПМА (N-(2-гидроксипропил)метакриламид), в котором доксорубицин присоединен через свой аминосахар к кополимеру ГПМА посредством тетрапептидного спейсера GlyPheLeuGly, который отщепляется лизосомными протеазами, такими как катепсин B (Vasey P.A. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5(1), 83-94). Другими примерами конъюгатов носитель-лекарственное вещество, содержащими пептидные линкеры и достигнувшими клинической стадии разработки, являются макромолекулярные комплексы платины. Два кандидатных лекарственных вещества на основе ГПМА состоят из кополимерного остова ГПМА, к которому присоединены два комплексообразующих комплекса аминомалоната платины посредством отщепляемого катепсином B пептидного спейсера GlyPheLeuGly или трипептидного спейсера GlyGlyGly (Rademaker-Lakhai J.M. et al. A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10(10), 3386-3395; Sood P. et

al. Synthesis and characterization of AP5346, a novel polymer-linked diaminocyclohexyl platinum chemotherapeutic agent. (2006) Bioconjugate Chem. 17(5), 1270-1279).

[00364] Был разработан высокоселективный метод, нацеленный на рак простаты, включающий применение протеазы специфического антигена простаты (САП), которая экспрессируется фактически только в тканях простаты и карциномах простаты. Было синтезировано новое альбумин-связывающее пролекарственное вещество паклитаксел, ЭМК-ArgSerSerTyrTyrSerLeu-ПАБК-паклитаксел (ЭМК: ε-малеинимидокапроил; ПАБК: п-аминобензилоксикарбонил). Это пролекарственное вещество растворялось в воде и связывалось с эндогенным и экзогенным альбумином. Альбумин-связанная форма пролекарственного вещества отщеплялась САП, высвобождая дипептид паклитаксела Ser-Leu-ПАБК-паклитаксел. Благодаря включению самоустраняющегося линкера ПАБК данный дипептид быстро разлагался, высвобождая в качестве конечного продукта расщепления паклитаксел (Elsadek B. et al. Development of a novel prodrug of paclitaxel that is cleaved by prostate-specific antigen: an in vitro and in vivo evaluation study. (2010) *Eur. J. Cancer* 46(18), 3434-3444).

[00365] Значительный интерес вызывают самоуничтожающиеся спейсеры благодаря своему применению в системах доставки пролекарственных веществ. В нескольких работах были описаны самоустраняющиеся системы или дендримерные структуры, которые могут высвобождать все свои структурные единицы путем домино-подобной фрагментации цепи, инициируемой единичным актом расщепления (Haba K. et al. Single-triggered trimeric prodrugs. (2005) *Angew. Chem., Int. Ed.* 44, 716-720; Shabat D. Self-immolative dendrimers as novel drug delivery platforms. (2006*) J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 44, 1569-1578.Warnecke A., Kratz F. 2,4-Bis(hydroxymethyl)aniline as a building block for oligomers with self-eliminating and multiple release properties. (2008) *J. Org. Chem.* 73, 1546-1552; Sagi A. et al. Self-immolative polymers. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* 130, 5434–5435). В одной работе было разработано и синтезировано самоуничтожающееся дендритное пролекарственное вещество, несущее четыре молекулы противоракового вещества камптотецина и две молекулы ПЭГ5000. Пролекарственное вещество эффективно активировалось пенициллин-G-амидазой в физиологических условиях, а свободный камптотецин высвобождался в реакционную среду для подавления клеточного роста (Gopin A. et al. Enzymatic activation of second-generation dendritic prodrugs: conjugation of self-immolative dendrimers with poly(ethylene glycol) via click chemistr y. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17, 1432-1440). Внесение специфического ферментативного субстрата, расщепляемого протеазой, которая сверхэкспрессируется в опухолевых клетках, может привести к созданию высокоэффективных активационных систем для специфического к раковым клеткам

дендритного пролекарственного вещества. Неограничивающие примеры спейсерных последовательностей, которые расщепляются протеазами, перечислены в Таблице 9.

[00366] В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены конфигурации XTEN-нагрузочное вещество, включающие димерные, тримерные, тетрамерные и конъюгаты более высоких порядков, в которых нагрузочное вещество присоединено к XTEN посредством лабильного линкера, как описано выше в данном тексте. В одном варианте реализации вышеупомянутых конъюгатов композиция дополнительно содержит нацеленный компонент для доставки композиции, или лиганда, или рецептора к клетке-мишени. В другом варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых одна, две, три или четыре композиции XTEN-нагрузочное вещество конъюгированы посредством лабильных линкеров к антителам или фрагментам антител, что обеспечивает наличие растворимых композиций для применений в нацеленной терапии клинических признаков, таких как, без ограничений, различного вида лечение опухолей и других раков, при этом антитело обеспечивает наличие нацеленного компонента, а затем, когда происходит интернализация клеткой-мишенью, лабильный линкер обеспечивает возможность диссоциации XTEN-нагрузочное вещество из композиции и способствует необходимой активности (например, цитотоксичности в опухолевой клетке). Следовательно, представленные в изобретении композиции являются иммуноконъюгатами.

[00367] Неструктурные характеристики и одинаковый состав и заряд XTEN приводят к наличию свойств, которые можно использовать для очистки конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество после реакции конъюгации. Исключительно целесообразным является применение к конъюгатам XTEN ионного обмена, который дает возможность удалить непрореагировавшие нагрузочные вещества и производные нагрузочных веществ. Исключительно целесообразным является применение к конъюгатам хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ХГВ). Благодаря своей гидрофильной природе большинство полипептидов XTEN проявляют низкое связывание со смолами ХГВ, что стимулирует захват конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество вследствие гидрофобных взаимодействий между нагрузочным веществом и материалом колонки, и их отделение от неконъюгированных XTEN, которым не удалось соединиться с нагрузочным веществом во время процесса конъюгации. Высокая степень очистки XTEN и конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество обеспечивает значительное преимущество по сравнению с большинством химических или природных полимеров, в частности, пэгилированными нагрузочными веществами. Большинство химических и природных полимеров получают при помощи случайной или полуслучайной полимеризации, которая приводит к образованию большого количества гомологов. Такие полимеры можно фракционировать различными способами для того, чтобы увеличить часть целевого вещества в

продукте. Однако даже после обогащения большинство препаратов природных полимеров и их конъюгатов с нагрузочными веществами содержат менее чем 10% целевого вещества. Примеры ПЭГ-конъюгатов с Г-КСФ были описаны в [Bagal, D., et al. (2008) Anal Chem, 80: 2408-18]. Эта публикация показывает, что даже ПЭГ-конъюгат, который был одобрен для терапевтического применения, содержит более 100 гомологов, которые присутствуют в концентрации, составляющей по меньшей мере 10% от целевого вещества.

[00368] Вариабельность случайных полимеров, таких как ПЭГ, является существенным препятствием для осуществления мониторинга и контроля качества во время конъюгации и очистки. В противоположность этому, XTEN, очищенный при помощи описанных в данном тексте способов, обладает высоким уровнем очистки и однородности. Вдобавок, конъюгаты, полученные так, как это описано в данном тексте, обычно содержат более чем около 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% необходимого целевого вещества в необходимой конфигурации, результатом чего является легкость интерпретации масс-спектров и хроматограмм.

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

[00369] В другом аспекте в изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество с одним XTEN, при этом конъюгат разработан в разных конфигурациях. Примеры конфигураций таких конъюгатов приведены далее.

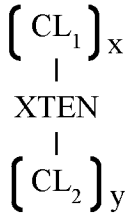
[00370] В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле IV:

$$\begin{array}{c}(CL_1)_x \\ | \\ XTEN\end{array} \qquad \text{IV}$$

где независимо в случае каждого появления CL1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV, CL1 является кросс-линкером, выбранным из Таблицы 13. В другом варианте реализации конъюгата,

соответствующего формуле IV, x принадлежит вышеприведенным диапазонам, а кросс-линкер из Таблицы 13 связан с каждым атомом серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV, x принадлежит вышеприведенным диапазонам, а кросс-линкер связан с каждой эпсилон аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IV, x равен 1, а кросс-линкер из Таблицы 13 связан с N-концевой аминогруппой XTEN. Для специалиста в данной области очевидно, что композиции вышеприведенных вариантов реализации, содержащие кросс-линкер, присоединенный к XTEN при помощи определенных компонентов, представляют собой продукт реакции отдельных реактантов и, таким образом, отличаются от точного состава реактантов. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле IV, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00371] В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле V:



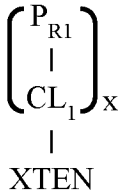
V

где независимо в случае каждого появления CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; CL_2 является кросс-линкером, отличным от CL_1; y является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что x + y является ≥ 2; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле V, каждый из CL_1 и CL_2 выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в Таблице 13. В одном варианте

реализации конъюгата, соответствующего формуле V, x принадлежит вышеприведенным диапазонам, и каждый CL_1 связан с эпсилон аминогруппой каждого лизина XTEN, а y принадлежит вышеприведенным диапазонам, и каждый CL_2 связан с группой серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле V, x равен 1, и CL_1 связан с N-концевой аминогруппой XTEN, а каждый CL_2 связан с группой серы цистеина XTEN. Для специалиста в данной области очевидно, что композиции вышеприведенных вариантов реализации, содержащие кросс-линкер, присоединенный к XTEN при помощи определенных компонентов, представляют собой продукт реакции отдельных реактантов и, таким образом, отличаются от точного состава реактантов. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле V, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00372] В другом аспекте в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, имеющие определенные конфигурации. В изобретении используется преимущество описанных в данном тексте композиций реакционно-способных участников конъюгации XTEN-кросс-линкер, к которым при помощи химической реакции можно присоединить реакционно-способные молекулы нагрузочного вещества.

[00373] В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле VI:

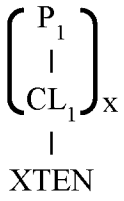


VI

где независимо в случае каждого появления P_{R1} является одноатомным остатком нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 3, или равен 2, или равен 1; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую

100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, одноатомный остаток нагрузочного вещества принадлежит нагрузочному веществу, выбранному из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, CL_1 является кросс-линкером, выбранным из Таблицы 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, каждый кросс-линкер связан с атомом серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, каждый кросс-линкер связан с эпсилон аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, x равен 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VI, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле VI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00374] В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле VII:



VII

где независимо в случае каждого появления P_1 является нагрузочным веществом, выбранным из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21; CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы

последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, CL_1 является кросс-линкером, выбранным из Таблицы 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, каждый кросс-линкер связан с атомом серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, каждый кросс-линкер связан с эпсилон аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, x равен 1, а кросс-линкер связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В одном варианте реализации конъюгат, соответствующий формуле VII, выбран из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в Таблице 21. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VII, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. Для специалиста в данной области очевидно, что композиции вышеприведенных вариантов реализации, содержащие нагрузочное вещество, присоединенное к XTEN-кросс-линкеру при помощи определенных компонентов, представляют собой продукт реакции отдельных реактантов и, таким образом, отличаются от точного состава реактантов. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле VII, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00375] В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле VIII:

VIII

где независимо в случае каждого появления P_{R1} является одноатомным остатком нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; P_{R2} является одноатомным остатком нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2,

или равен 1; CL_2 является кросс-линкером, отличным от CL_1; у является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что x + у является $\geq$ 2; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, одноатомный остаток нагрузочного вещества принадлежит нагрузочному веществу, выбранному из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, каждый из CL_1 и CL_2 выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в Таблице 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, каждый CL_1 связан с эпсилон аминогруппой лизина XTEN, а каждый CL_2 связан с группой серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, x равен 1, и CL_1 связан с N-концевой аминогруппой XTEN, а CL_2 связан с группой серы цистеина или эпсилон аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле VIII, CL_2 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле VIII, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00376] В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле IX:

IX

где независимо в случае каждого появления P_1 является нагрузочным веществом, выбранным из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21; P_2 является нагрузочным веществом, выбранным из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, и отличным от P_1; CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; CL_2 является кросс-линкером, отличным от CL_1; y является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что x + y является ≥ 2; а XTEN представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, одноатомный остаток нагрузочного вещества принадлежит нагрузочному веществу, выбранному из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, каждый из CL_1 и CL_2 выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в Таблице 13. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, каждый CL_1 связан с эпсилон аминогруппой лизина XTEN, а каждый CL_2 связан с группой серы цистеина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, x равен 1, и CL_1 связан с N-концевой аминогруппой XTEN, а CL_2 связан с группой серы цистеина или эпсилон аминогруппой лизина XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле IX, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата,

соответствующего формуле IX, CL_2 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В одном варианте реализации конъюгат, соответствующий формуле IX, выбран из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в Таблице 21. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле IX, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

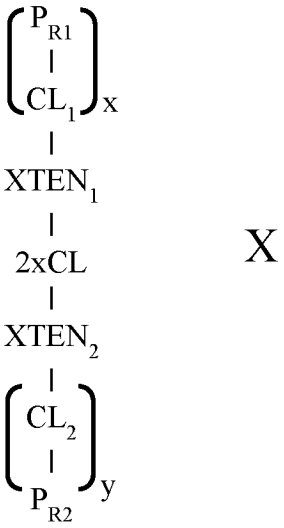
3. Димерные, тримерные, тетрамерные и мультимерные конфигурации конъюгатов XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество

[00377] В одном аспекте реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых различные количества XTEN или участников конъюгации XTEN-нагрузочное вещество соединены посредством линкеров в определенной количественной конфигурации; например, димерной, тримерной, тетрамерной или мультимерной. Предполагается, что употребляемый в данном тексте термин “предшественник” включает в себя компоненты, применяемые в качестве реактантов в реакции конъюгации, которая приводит к образованию промежуточной или конечной композиции, и включает, но не ограничивается этим, фрагменты XTEN различной длины (включая XTEN из Таблиц 2 и 3 либо те, которые показаны выше в виде различных формул), XTEN-кросс-линкеры, сегменты XTEN-нагрузочное вещество-кросс-линкер, нагрузочные вещества с реакционно-способными группами, линкеры и другие описанные в данном тексте подобные компоненты.

[00378] В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых два XTEN или сегменты предшественника XTEN-нагрузочное вещество соединены посредством двухвалентного линкера, что приводит к образованию двухвалентной конфигурации, такой, как та, что показана на ФИГ. 19C и ФИГ. 27B. В одном варианте реализации двухвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться мономерным гибридным белком, содержащим биологически активный пептид или полипептид, при этом каждый сегмент предшественника гибридного белка соединен с двухвалентным линкером при помощи альфа аминогруппы N-конца, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В другом варианте реализации двухвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый сегмент предшественника XTEN-нагрузочное вещество представляет собой мономерный гибридный белок, содержащий биологически активный пептид или полипептид, при этом каждый гибридный белок соединен с двухвалентным линкером в С-конце, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В другом варианте реализации двухвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый

XTEN содержит одно или более нагрузочных веществ (которые могут являться пептидами, полипептидами либо лекарственными веществами), соединенных с XTEN, при этом каждый предшественник XTEN связан с другим предшественником XTEN, содержащим одну или более молекул второго отличного нагрузочного вещества, посредством двухвалентного линкера в N-конце, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В другом варианте реализации двухвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый XTEN содержит одно или более нагрузочных веществ (которые могут являться пептидами, полипептидами либо лекарственными веществами), соединенных с XTEN, при этом каждый предшественник XTEN связан с другим предшественником XTEN, содержащим одну или более молекул второго отличного нагрузочного вещества, посредством двухвалентного линкера через карбоксильную группу или модифицированную группу в С-конце (включая, но не ограничиваясь XTEN, модифицированный при помощи вставки цистеина в С-конце), что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В приведенных выше в данном параграфе вариантах реализации, как будет очевидно для специалиста в данной области, в контексте настоящего изобретения существуют различных подходы для создания предшественников, предназначенных для связывания, например, это конъюгация линкера с первым предшественником XTEN-нагрузочное вещество и дальнейшее стимулирование второй реакции для того, чтобы присоединить предшественника к реакционно-способной группе, находящейся на конце второго предшественника XTEN-нагрузочное вещество. В альтернативном варианте оба конца XTEN могут быть модифицированы как предшественники, которые затем можно соединить при помощи клик-химии или при помощи других описанных и проиллюстрированных в данном тексте способов, оставив несколько или не оставив остаточных атомов для соединения с участком сопряжения XTEN. В другом варианте реализации изобретения две последовательности предшественника XTEN-нагрузочное вещество соединены дисульфидным мостиком посредством цистеинов или тиоловых групп, в или вблизи конца реактантов-предшественников XTEN-нагрузочное вещество, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество. Примеры конфигураций таких двухвалентных конъюгатов приведены далее.

[00379] В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле X

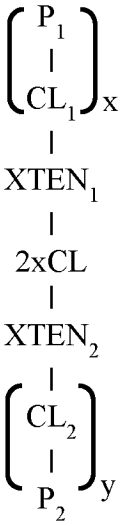


X

где независимо в случае каждого появления P_{R1} является одноатомным остатком первого нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; P_{R2} является одноатомным остатком второго нагрузочного вещества, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; CL_2 является кросс-линкером, отличным от CL_1; y является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что x + y является $\geq$ 2; 2xCL представляется собой либо двухвалентный кросс-линкер либо продукт реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15; $XTEN_1$ представляет собой полипептид, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_2$ представляет собой полипептид, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый из CL_1 и

CL_2 выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в Таблице 13. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, x равен 1, а CL_1 связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, CL_2 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый CL_1 связан с группой серы цистеина $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с группой серы цистеина $XTEN_2$. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый CL_1 связан с эпсилон аминогруппой лизина $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон аминогруппой лизина $XTEN_2$. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, каждый CL_1 связан с группой серы цистеина $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон аминогруппой лизина $XTEN_2$. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются одинаковыми. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле X, $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются разными. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле X, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% молекул XTEN данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00380] В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, обладающий конфигурацией согласно формуле XI



XI

где независимо в случае каждого появления P_1 является нагрузочным веществом, выбранным из группы нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21; P_2 является

нагрузочным веществом, выбранным из группы нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, и отличным от P_1; CL_1 является кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; CL_2 является кросс-линкером, отличным от CL_1; y является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что x + y является ≥ 2; 2xCL представляется собой либо двухвалентный кросс-линкер либо продукт реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15; $XTEN_1$ представляет собой первый в основном гомогенный XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; а $XTEN_2$ представляет собой второй в основном гомогенный XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый из CL_1 и CL_2 выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в Таблице 13. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, x равен 1, а CL_1 связан с N-концевой аминогруппой XTEN. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, CL_1 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, CL_2 является продуктом реакции первого и второго реактантов клик-химии, выбранных из Таблицы 15. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый CL_1 связан с группой серы цистеина $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с группой серы цистеина $XTEN_2$. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый CL_1 связан с эпсилон аминогруппой лизина $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон аминогруппой лизина $XTEN_2$. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, каждый CL_1 связан с группой серы цистеина $XTEN_1$, а каждый CL_2 связан с эпсилон аминогруппой лизина $XTEN_2$. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, $XTEN_1$ и

$XTEN_2$ являются одинаковыми. В другом варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XI, $XTEN_1$ и $XTEN_2$ являются разными. В другом варианте реализации изобретения конъюгат, соответствующий формуле XI, выбран из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в Таблице 21. В другом варианте реализации в изобретении предложен препарат конъюгата, соответствующего формуле XI, в котором по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95% соответствующих молекул $XTEN_1$ и $XTEN_2$ данного препарата конъюгата имеют одинаковую длину последовательностей.

[00381] В других вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-линкер и XTEN-линкер нагрузочное вещество с тримерной конфигурацией, такой, как показано на ФИГ. 21-23.

[00382] В изобретении предложены тримерные конъюгаты, в которых три конъюгата XTEN-кросс-линкер связаны трехвалентным линкером, что приводит к образованию тримерной конфигурации XTEN-кросс-линкер. В одном варианте реализации в изобретении предложен тримерный XTEN-кросс-линкер, обладающий конфигурацией согласно формуле XII

$$(CL1)_x\text{-}(XTEN_1)\text{-}3xCL\text{-}(XTEN_2)\text{-}(CL2)_y$$
$$|$$
$$(XTEN_3)\text{-}(CL3)_z \qquad \text{XII}$$

где независимо в случае каждого появления 3xCL является трехвалентным кросс-линкером, CL1 является первым кросс-линкером, соединенным с XTEN1, CL2 является вторым кросс-линкером, соединенным с XTEN2, CL3 является третьим кросс-линкером, соединенным с XTEN3, x является целым числом от 1 до около 10, y является целым числом от 1 до около 10, z является целым числом от 1 до около 10, при условии, что x + y + z является > 3, $XTEN_1$ представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_2$ представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и

3, а $XTEN_3$ представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, при этом $XTEN_1$, $XTEN_2$ и $XTEN_3$ являются одинаковыми либо разными. В одном варианте реализации конъюгата, соответствующего формуле XII, каждый из CL1, CL2 и CL3 выбран из группы кросс-линкеров, приведенных в Таблице 13, при этом они являются одинаковыми либо разными. В одном варианте реализации конъюгат, соответствующий формуле XII, дополнительно содержит одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, соединенный с каждым кросс-линкером первого в основном гомогенного XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы, одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, соединенный с каждым кросс-линкером второго в основном гомогенного XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы, и одноатомный остаток третьего нагрузочного вещества, соединенный с каждым кросс-линкером третьего в основном гомогенного XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы.

[00383] В другом варианте реализации в изобретении предложены тримерные конъюгаты, в которых три предшественника конъюгатов XTEN-нагрузочное вещество связаны трехвалентным линкером, что приводит к образованию тримерной концигурации XTEN-нагрузочное вещество, такой, как показана на ФИГ. 21 и 97-106. В одном варианте реализации в изобретении предложены тримерные конъюгаты XTEN-кросс-линкер, обладающие конфигурацией согласно формуле XIII

$$P_1\text{-}(CL1)_x\text{-}(XTEN_1)\text{-}3xCL\text{-}(XTEN_2)\text{-}(CL2)_y\text{-}P_2$$
$$|$$
$$(XTEN_3)\text{-}(CL3)_z\text{-}P_3 \qquad \text{XIII}$$

где независимо в случае каждого появления 3xCL является трехвалентным кросс-линкером, выбранным из группы трехвалентных кросс-линкеров, приведенных в Таблицах 13 и 14; P_1 соединен с каждым кросс-линкером первого XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21; P_2 является вторым нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером второго XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого нагрузочного вещества, а P_3 является третьим нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-

линкером третьего XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого или второго нагрузочного вещества; CL_1 является первым кросс-линкером; x является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1; CL_2 является вторым кросс-линкером; y является целым числом от 1 до около 100, или от 1 до около 50, или от 1 до около 40, или от 1 до около 20, или от 1 до около 10, или от 1 до около 5, или равен 9, или равен 3, или равен 2, или равен 1, при условии, что x + y является ≥ 3; $XTEN_1$ представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_2$ представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, а $XTEN_3$ представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, при этом $XTEN_1$, $XTEN_2$ и $XTEN_3$ являются одинаковыми либо разными последовательностями. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгат, соответствующий формуле XIII, дополнительно содержит первое нагрузочное вещество, при этом нагрузочное вещество представляет собой нацеленный компонент, обладающий специфической аффинностью связывания с мишенью, нацеленный компонент выбран из группы, состоящей из нацеленных компонентов, приведенных в Таблицах 17-19 и 21, а по меньшей мере одно из нагрузочных веществ представляет собой лекарственное вещество, причем лекарственное вещество выбрано из группы, состоящей из лекарственных веществ, приведенных в Таблице 11, Таблице 19 и Таблице 21. В одном варианте реализации

вышесказанного нацеленный компонент является LHRH или фолатом, а лекарственное вещество выбрано из доксорубицина, паклитаксела, ауристатина, монометил ауристатина E (MMAE), монометил ауристатина F, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина.

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

$(CL1)_x$-$(XTEN_1)$-3xCL-$(XTEN_2)$-$(CL2)_y$

|

$(XTEN_3)$ XIV

где независимо в случае каждого появления 3xCL является трехвалентным кросс-линкером; CL1 является первым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_1$; CL2 является вторым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_2$; x является целым числом от 1 до около 10; y является целым числом от 1 до около 10 при условии, что x + y является ≥ 2, $XTEN_1$ представляет собой первый XTEN; $XTEN_2$ представляет собой второй XTEN, и $XTEN_3$ представляет собой третий XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в Таблице 2. В одном варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XIV, данная композиция дополнительно содержит одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, соединенный с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы; и одноатомный остаток второго нагрузочного вещества, соединенный с каждым вторым кросс-линкером XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XIV, данная композиция дополнительно содержит первое нагрузочное вещество, соединенное с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 6, 7, 18 и 21; и второе нагрузочное вещество, соединенное с каждым вторым кросс-линкером второго XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 6, 7, 18 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным или отличным от первого нагрузочного вещества. В одном варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество представляет собой нацеленный компонент, обладающий специфической аффинностью связывания с мишенью, нацеленный компонент выбран из группы, состоящей из нацеленных компонентов, приведенных в Таблицах 17-19 и 21, а второе нагрузочное вещество представляет собой лекарственное вещество, выбранное из группы, состоящей из лекарственных веществ, приведенных в Таблице 6, Таблице 18 и Таблице 21. В одном варианте

реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество представляет собой нацеленный компонент, выбранный из группы, состоящей из LHRH и фолата, а второе нагрузочное вещество представляет собой лекарственное вещество, выбранное из группы, состоящей из доксорубицина, паклитаксела, ауристатина, монометил ауристатина E (MMAE), монометил ауристатина F, майтанзина, доластатина, калихеамицина, алкалоида барвинка, камптотецина, митомицина C, эпотилона, hTNF, IL-12, бортезомиба, ранпирназы, экзотоксина синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицина. В одном варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество представляет собой лекарственное вещество, выбранное из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблицы 11 и белков из Таблицы 12, а второе нагрузочное вещество отличается от первого нагрузочного вещества и выбрано из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблицы 11 и белков из Таблицы 12. В другом варианте реализации вышесказанного первое нагрузочное вещество и второе нагрузочное вещество одинаковы и выбраны из группы, состоящей из лекарственных веществ из Таблицы 11 и белков из Таблицы 12. В другом варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, данная композиция обладает конфигурацией согласно формуле XV:

$(CL1)_x$-$(XTEN_1)$-3xCL-$(XTEN_2)$

|

$(XTEN_3)$ XV

где независимо в случае каждого появления 3xCL является трехвалентным кросс-линкером, соединенным с $XTEN_1$; CL1 является первым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_1$; x является целым числом от 1 до около 10; $XTEN_1$ представляет собой первый XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в Таблице 3; $XTEN_2$ представляет собой второй XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в Таблице 2; и $XTEN_3$ представляет собой третий XTEN, при этом XTEN выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в Таблице 2. В одном варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XV, данная композиция дополнительно содержит одноатомный остаток первого нагрузочного вещества, соединенный с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, при этом остаток выбран из группы, состоящей из углерода, азота, кислорода и серы. В другом варианте реализации тримерной конъюгационной композиции XTEN, соответствующей формуле XV, данная композиция дополнительно содержит первое нагрузочное вещество, соединенное с каждым первым кросс-линкером первого XTEN, выбранное из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 6, 7, 18 и 21.

[00384] В другом варианте реализации тримерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться мономерным гибридным белком, содержащим биологически активный пептид или полипептид, при этом гибридный белок соединен с трехвалентным линкером на участке аминогруппы или тиоловой группы XTEN. В другом варианте реализации тримерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться конъюгатом нагрузочного вещества, соединенного с XTEN, который может быть биологически активным пептидом или полипептидом либо фармакологически активным низкомолекулярным веществом или токсином, соединенным с XTEN, который, в свою очередь, соединен с трехвалентным линкером в N-конце XTEN. В вышеприведенных вариантах реализации XTEN-линкер-нагрузочное вещество, которые описаны в этом параграфе, три нагрузочных вещества могут быть одинаковыми либо они могут быть разными. В одном варианте реализации тримерного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество данный конъюгат содержит по меньшей мере один биологически активный белок и по меньшей мере одно лекарственное вещество, соединенные с другим XTEN, который, в свою очередь, соединен с трехвалентным линкером в N-конце XTEN. В конкретном варианте реализации вышеприведенной конфигурации по меньшей мере один биологически активный белок представляет собой нацеленный компонент, а по меньшей мере одно лекарственное вещество представляет собой токсин, включая, но не ограничиваясь этим, доксорубицин, паклитаксел, ауристатин, монометил ауристатин E (MMAE), монометил ауристатин F, майтанзин, доластатин, калихеамицин, алкалоид барвинка, камптотецин, митомицин C, эпотилон, hTNF, IL-12, бортезомиб, ранпирназу, экзотоксин синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицин. В зависимости от позиции тиоловой или эпсилон аминогруппы в XTEN можно контролировать то, находится ли нагрузочное вещество внутри (как показано на ФИГ. 23B) или в конце перекрестносшитого XTEN (как показано на ФИГ. 23A). В вышеприведенных вариантах реализации неограничивающие примеры нацеленных компонентов включают LHRH, фолат, октреотид, пасиреотид, бомбезин, моноклональные антитела, оцВФ, центрин и фрагменты антител, каркасы и миметики из Таблицы 17. Примеры конфигураций таких двухвалентных конъюгатов приведены далее.

[00385] В изобретении дополнительно предложены конъюгаты XTEN-линкер и XTEN-нагрузочный линкер с тетрамерной конфигурацией. В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты, в которых четыре последовательности XTEN соединены посредством четырехвалентного линкера, что приводит к образованию тетрамерной конфигурации XTEN-кросс-линкер, такой, как показано на ФИГ. 22D. Неограничивающие примеры четырехвалентных линкеров включают четырехвалентный тиоловый,

четырехвалентный N-малеинимидный линкер, такой как описан в патенте США № 7,524,821, либо антитело или фрагмент антитела с четырьмя реакционно-способными группами.

[00386] В данном изобретении предложены конъюгаты, в которых четыре последовательности предшественников XTEN-кросс-линкер соединены четырехвалентным линкером, что приводит к образованию четырехвалентной конфигурации XTEN-кросс-линкер. В одном варианте реализации в изобретении предложен тетрамерный XTEN-кросс-линкер, обладающий конфигурацией, соответствующей формуле XVI

$(CL_1)_v$-$(XTEN_1)$-4xCL-$(XTEN_2)$-$(CL_2)_x$
/ \
$(CL_3)_y$-$(XTEN_3)$ $(XTEN_4)$-$(CL_4)_z$ XVI

где независимо в случае каждого появления 4xCL является четырехвалентным кросс-линкером; CL_1 является первым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_1$; CL_2 является вторым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_2$; CL_3 является третьим кросс-линкером, соединенным с $XTEN_3$; CL_4 является четвертым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_4$; x является целым числом от 1 до около 10; y является целым числом от 1 до около 10; z является целым числом от 1 до около 10 при условии, что x + y + z является ≥ 4; $XTEN_1$ представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_2$ представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_3$ представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, при этом $XTEN_1$, $XTEN_2$ и $XTEN_3$ являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN; $XTEN_4$ представляет

собой четвертый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, при этом $XTEN_1$, $XTEN_2$, $XTEN_3$ и $XTEN_4$ являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN.

[00387] В изобретении предложены конъюгаты, в которых четыре последовательности предшественников XTEN-нагрузочное вещество соединены четырехвалентным линкером, что приводит к образованию четырехвалентной конфигурации XTEN-нагрузочное вещество, как показано на ФИГ. 22C и 105. В одном варианте реализации в изобретении предложен тетрамерный XTEN-нагрузочное вещество, обладающий конфигурацией, соответствующей формуле XVII

P_1-$(CL_1)_v$-$(XTEN_1)$-4xCL-$(XTEN_2)$-$(CL_2)_x$-P_2

/ \

P_3-$(CL_3)_y$-$(XTEN_3)$ $(XTEN_4)$-$(CL_4)_z$-P_4 XVII

где независимо в случае каждого появления 4xCL является четырехвалентным кросс-линкером; P_1 соединен с каждым кросс-линкером первого XTEN и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, P_2 является вторым нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером второго XTEN, и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого нагрузочного вещества, P_3 является третьим нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером третьего XTEN, и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого или второго нагрузочного вещества; P_4 является четвертым нагрузочным веществом, соединенным с каждым кросс-линкером четвертого XTEN, и выбран из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблицах 11, 12, 18, 19 и 21, при этом нагрузочное вещество является аналогичным либо отличным от первого, второго или третьего нагрузочного вещества; CL_1 является первым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_1$; CL_2 является вторым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_2$; CL_3 является третьим кросс-линкером, соединенным с $XTEN_3$; CL_4 является четвертым кросс-линкером, соединенным с $XTEN_4$; v является целым числом от 1 до около 10; x является целым числом от 1 до около 10; y является целым числом от 1 до около 10; z является целым числом от 1 до

около 10 при условии, что x + y + z является ≥ 4; $XTEN_1$ представляет собой первый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_2$ представляет собой второй XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3; $XTEN_3$ представляет собой третий XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, при этом $XTEN_1$, $XTEN_2$ и $XTEN_3$ являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN; $XTEN_4$ представляет собой четвертый XTEN, имеющий по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющий 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблицах 2 и 3, при этом $XTEN_1$, $XTEN_2$, $XTEN_3$ и $XTEN_4$ являются одинаковыми либо разными последовательностями XTEN.

[00388] В другом варианте реализации четырехвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться мономерным гибридным белком, содержащим биологически активный пептид или полипептид, при этом гибридный белок соединен с четырехвалентным линкером на участке аминогруппы или тиоловой группы XTEN. В другом варианте реализации четырехвалентного конъюгата XTEN-нагрузочное вещество каждый элемент XTEN-нагрузочное вещество может являться конъюгатом нагрузочного вещества, соединенного с XTEN, который может быть биологически активным пептидом или полипептидом либо фармакологически активным низкомолекулярным

веществом или токсином, соединенным с XTEN, который, в свою очередь, соединен с четырехвалентным линкером в N-конце XTEN. В вышеприведенных вариантах реализации XTEN-линкер-нагрузочное вещество, которые описаны в этом параграфе, четыре нагрузочных вещества могут быть одинаковыми либо они могут быть разными. В конкретном варианте реализации вышеприведенной конфигурации по меньшей мере один биологически активный белок представляет собой нацеленный компонент, а по меньшей мере одно лекарственное вещество представляет собой токсин, включая, но не ограничиваясь этим, доксорубицин, паклитаксел, ауристатин, монометил ауристатин E (MMAE), монометил ауристатин F, майтанзин, доластатин, калихеамицин, алкалоид барвинка, камптотецин, митомицин C, эпотилон, hTNF, IL-12, бортезомиб, ранпирназу, экзотоксин синегнойной палочки, SN-38 и рахелмицин. В зависимости от позиции тиоловой или эпсилон аминогруппы в XTEN можно контролировать то, находится ли нагрузочное вещество внутри или в конце перекрестносшитого XTEN.

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

[00389] Применяя XTEN из Таблицы 3 можно создать композиции, содержащие четыре или более молекул XTEN-нагрузочное вещество, связанных с цистеин- или лизин-сконструированным остовом, что приводит к образованию “гребенчатой” мультивалентной конфигурации, или к связыванию множественных разветвленных предшественников для образования “дендримерной” конфигурации, как проиллюстрировано на ФИГ. 7. В одном варианте реализации изобретения мультивалентный конфигурационный конъюгат создают путем проведения реакции между цистеин- или лизин-сконструированным XTEN и XTEN-нагрузочным веществом, содержащим линкер, подходящий для реакции с цистеин- или лизин-сконструированным XTEN (как проиллюстрировано на ФИГ. 24), что приводит к образованию конечного продукта. В другом варианте реализации изобретения мультивалентный конфигурационный конъюгат создают путем проведения реакции между цистеин- или лизин-сконструированным XTEN и XTEN-нагрузочным веществом, содержащим цистеин либо первичную или эпсилон аминогруппу, подходящую для реакции с линкером, соединенным с цистеин- или лизин-сконструированным XTEN, что приводит к образованию конечного продукта. В данных вариантах реализации валентность конечного продукта регулируют посредством количества реакционно-способных групп, включенных в XTEN, в случае, как реакционно-способной аминокислоты, так и линкера. Вдобавок предполагается, что конечный продукт можно сконструировать так, чтобы расположить нагрузочное вещество либо вблизи концов XTEN, что улучшает взаимодействия с лигандом, либо вблизи точек разветвления для

того, чтобы экранировать нагрузочное вещество и уменьшить степень взаимодействий с лигандом.

5. Конфигурации биспецифического нагрузочного вещества на мономерном остове XTEN

[00390] В другом аспекте реализации в изобретении предложены конъюгаты, содержащие две различные молекулы нагрузочных веществ, соединенные с одним цистеин- или лизин-сконструированным остовом XTEN, как проиллюстрировано на ФИГ. 27А, что приводит к образованию двухвалентного конъюгата. В одном варианте реализации изобретения конъюгат с двухвалентной конфигурацией создают путем проведения реакции между сконструированным XTEN, таким как те, которые приведены конкретно в Таблице 3, и первым элементом XTEN-нагрузочное вещество, содержащим линкер, подходящий для реакции с цистеин-сконструированным XTEN, и следующей за ней второй реакции между вторым сконструированным XTEN и вторым элементом XTEN-нагрузочное вещество, содержащим линкер, подходящий для реакции с лизин-сконструированным XTEN, что приводит к образованию конечного продукта. Количество и месторасположение нагрузочных веществ регулируют посредством проектирования конструируемых XTEN, в котором решающим фактором есть расположение реакционно-способной тиоловой или аминогруппы. В одном варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат содержит одну молекулу первого нагрузочного вещества и одну молекулу второго нагрузочного вещества, связанные с цистеин-лизин-сконструированным XTEN посредством линкеров. В другом варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат содержит одну, или две, или три, или четыре, или пять молекул первого нагрузочного вещества и одну молекулу второго нагрузочного вещества, связанных с цистеин-лизин-сконструированным XTEN посредством линкеров. В другом варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат содержит одну, или две, или три, или четыре, или пять молекул первого нагрузочного вещества и одну, или две, или три, или четыре, или пять молекул второго нагрузочного вещества, связанных с цистеин-лизин-сконструированным XTEN посредством линкеров.

[00391] В другом варианте реализации изобретения двухвалентный конъюгат создают путем проведения реакции между цистеин- или лизин-сконструированным XTEN, таким как те, которые приведены в Таблице 3, с первым линкером, подходящим для реакции с цистеин-сконструированным XTEN, и следующей за ней второй реакции с линкером, подходящим для реакции с лизин-сконструированным XTEN, затем проводя реакцию остова XTEN-кросс-линкер и первого нагрузочного вещества с тиоловой реакционно-способной группой, способной вступать в реакцию с первым линкером, и следующую за ней реакцию второго

нагрузочного вещества с аминогруппой, способной вступать в реакцию со вторым кросс-линкером, что приводит к образованию конечного продукта.

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

[00392] В другом аспекте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-кросс-линкер и XTEN-нагрузочное вещество с конфигурацией, предусматривающей наличие одного или более спейсеров, инкорпорированных в или сопряженных с XTEN, которые сконструированы для того, чтобы привнести или усилить функциональность или какое-либо свойство композиции, либо в качестве вспомогательных элементов при составлении или производстве композиций. Такие свойства включают, но не ограничиваются этим, включение последовательности, которая может протеолитически расщепляться, или лабильной функциональной группы для того, чтобы сделать возможным высвобождение нагрузочного вещества, либо спейсер можно вносить между последовательностью XTEN и компонентом нагрузочного вещества, чтобы уменьшить стерическое несоответствие так, что компонент нагрузочного вещества сможет необходимым образом взаимодействовать со своим целевым лигандом.

[00393] В одном варианте реализации в линкеры конъюгатов, являющихся объектами изобретения, инкорпорирован один или более спейсеров. Информацию по спейсерам и способам выявления необходимых спейсеров смотрите, например, в George, *et al.* (2003) Protein Engineering 15:871–879, отдельно включенную в данный текст посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения спейсер содержит одну или более пептидных последовательностей, длина которых составляет между 1-50 аминокислотными остатками, или около 1-25 аминокислотных остатков, или около 1-10 аминокислотных остатков. Спейсерные последовательности, за исключением сайтов расщепления, могут содержать любые из 20 природных L-аминокислот, и предпочтительно будут обладать XTEN-подобными свойствами, поскольку большинство остатков будут гидрофильными аминокислотами, которые являются стерически незатрудненными. Спейсер может представлять собой полиглицин или полиаланин или являться комбинацией преимущественно из остатков глицина, серина и аланина. В одном варианте реализации изобретения спейсерная последовательность является последовательностью из Таблицы 15. В другом варианте реализации изобретения спейсерная последовательность является GPEGPS.

[00394] Вдобавок спейсерные последовательности сконструированы так, чтобы избежать внесения эпитопов Т-клеток, что может быть частично достигнуто путем недопущения наличия или ограничения количества гидрофобных аминокислот в составе спейсера; определение эпитопов описано выше и в Примерах.

[00395] В одном варианте реализации изобретения спейсер содержит отделяемую группу, которая делает возможным высвобождение нагрузочного вещества из конъюгата. В другом варианте реализации изобретения кросс-линкер содержит отделяемую группу, которая делает возможным высвобождение нагрузочного вещества из конъюгата. Отделяемая группа может быть любой лабильной группой, обеспечивающей наличие подобного отделяемого дополнения. В одном варианте реализации изобретения отделяемая группа является химически расщепляемым соединением или лабильным химическим соединением. Обычно подобные соединения можно расщепить при помощи способов, которые хорошо известны специалистам в данной области, например, обработки кислотой, основанием, окислением, восстановлением, перемещением или удалением. В конкретном варианте реализации изобретения химически расщепляемое соединение содержит модифицированное основание, модифицированный сахар, дисульфидную связь, химически расщепляемую группу, внесенную в кросс-линкер или спейсер. Некоторые примеры таких соединений описаны в заявке согласно PCT WO 96/37630 и патенте США № 7,132,519, включенным в данный текст посредством ссылки. Отделяемые группы, которые входят в объем изобретения, включают группы или соединения, расщепляемые ферментами. Ферментативно-расщепляемые отделяемые группы включают фосфодиэфирные или амидные соединения, а также участки распознавания рестрикционной эндонуклеазы. В одном варианте реализации в изобретении предложены композиции, содержащие одно или более нагрузочных веществ, в которых отщепляемый валин-цитруллиновый линкер размещен между нагрузочным веществом и XTEN, делая возможным отщепление катепсином, когда композиция интернализована внутриклеточно; например, внутри опухолевой клетки. В другом варианте реализации изобретения отделяемые группы расщепляются нуклеазами. Эти нуклеазы, как правило, являются экзонуклеазами или рестрикционными эндонуклеазами. Типичные экзонуклеазы включают экзонуклеазы, специфические как к двухцепочечным, так и одноцепочечным полинуклеиновым кислотам. Вдобавок, рестрикционные эндонуклеазы, применяемые в отдельных вариантах реализации, включают рестрикционные эндонуклетазы типа IIS и типа II. В других вариантах реализации изобретения отделяемая группа может представлять собой последовательность, которая расщепляется протеазой, при этом последовательность выбрана из последовательностей, приведенных в Таблице 9. Типичные протеазы, воздействующие на последовательности, подходящие для включения в композиции данного изобретения, включают эндопротеиназы, включая протеиназы из Таблицы 9.

7. Библиотеки конфигураций XTEN-нагрузочное вещество

[00396] В другом аспекте реализации в изобретении предложены библиотеки предшественников XTEN-нагрузочное вещество, способы создания таких библиотек и способы комбинирования предшественников из библиотек в комбинаторных подходах, как

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

[00397] В других вариантах реализации изобретения библиотеки составляют, используя три или более нагрузочных веществ, которые, как известно, оказывают положительный эффект в лечении общего заболевания. В одном варианте реализации изобретения библиотека содержит нагрузочные вещества, присоединенные к XTEN, при этом каждое нагрузочное вещество является лекарственным веществом или биологически эффективно для облегчения симптомов

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

Таблица 16: Заболевания, для которых определены нагрузочные вещества

Заболевание		
Ахондроплазия	Диабетическая нефропатия	Мукозит
Акромегалия	Диабетическая невропатия	Множественный склероз
СПИД	Диагностика	Мышечная дистрофия
Болезнь Альцгеймера	Нарушение питания	Скелетно-мышечное
Анемия	Эритропоэтическая протопорфирия	Инфаркт/ишемия миокарда
Артрит	Желудочно-кишечное расстройство	Нейтропения
Астма	Подагра	Ожирение
Атеросклероз	Дефицит гормона роста	Остеоартрит
Аутизм	Гемофилия	Остеопороз
Аутоиммунное заболевание	Гепатит B	Боль
Болезнь Баттена	Гепатит C	Болезнь Паркинсона
Восстановление костной и хрящевой ткани	Наследственная эмфизема	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия
Кахексия	ВИЧ	Фенилкетонурия
Рак (все типы)	Гиперлипидемия/ дислипидемия	Псориаз

Заболевание		
Кардиоваскулярные заболевания	Гиперпаратиреоз	Легочная артериальная гипертензия
Заболевания, вызванные химиотерапией	Гипертония	Легочная гипертензия
Осложнения, вызванные хроническими заболеваниями почеу	Гипогликемия	Заболевания, вызванные лучевой терапией
Нарушение свертывания крови	Гипопаратиреоз	Сепсис
Колит	Гипотиреоз	Сексуальная дисфункция
Врожденный гиперинсулинизм	Инфекционные заболевания	Синдром короткого кишечника
Врожденный порок сердца	Бесплодие	Апоплексический удар
ХОБЛ	Воспалительное заболевание	Тромбоцитопения
Болезнь Крона	Липодистрофия	Заболевание щитовидной железы
Кистозный фиброз	Лимфопения	Трансплантация
Диабет Осложнения, вызванные диабетом	Макулярная дегенерация Нарушения обмена веществ	Вирусная инфекция

[00398] В одном варианте реализации изобретения, как проиллюстрировано на ФИГ. 37, биспецифический конъюгат содержит модуль лекарственного вещества, соединенный с XTEN посредством отщепляемого или лабильного линкера, при этом линкер может отщепляться либо диссоциировать после введения пациенту, включая случай внутриклеточной интернализации в клетке-мишени для нацеленных модулей. В другом варианте реализации изобретения лекарственное вещество соединено с XTEN посредством неотщепляемого линкера, но при этом конъюгат остается восприимчивым к разложению. При интернализации XTEN расщепляется протеазами, а лекарственное вещество, связанное с его линкером, высвобождается, что приводит к цитотоксичности.

[00399] В одном примере реализации нацеленный модуль является лютеинизирующим релизинг-гормоном (также называемым LHRH, GnRH и гонадотропин-рилизинг гормоном), лекарственное вещество является доксорубицином, при этом соотношение между LHRH и доксорубицином составляет 1:1, или 1:1.5, или 1:2, или 1:3, или 1:9, или 2:3, или 3:1, или 3:2, или 2:1 или 1.5:1. Конъюгат можно создать, начиная с предшественников XTEN. Один предшественник XTEN может нести 1, 2 или более молекул лекарственного вещества и реакционно-способный кросс-линкер, или реактант клик-химии, или реакционно-способную аминокислоту. Второй предшественник XTEN несет 1, 2 или более доменов LHRH для нацеливания и реакционно-способный кросс-линкер, или реактант клик-химии, или реакционно-способную аминокислоту. Оба сегмента-предшественника затем соединяют посредством реакции между реакционно-способными группами соответствующего XTEN. В

одном примере реализации реакционно-способная группа является азидом, который соединен посредством кросс-линкера с N-концом первого сегмента XTEN; а реакционно-способная группа второго XTEN является алкином, который соединен посредством кросс-линкера с N-концом второго сегмента XTEN. В другом варианте реализации конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество лекарственное вещество является майтанзином. В другом варианте реализации конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество лекарственное вещество является ауристатином.

8. Конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, присоединенные к нацеленным компонентам

[00400] В другом аспекте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции, содержащие одну или более композиций XTEN-нагрузочное вещество, присоединенных к нацеленным компонентам. Данные нацеленные композиции находят применение в лечении различных болезненных состояний, для которых необходима избирательная доставка терапевтического средства или токсического нагрузочного вещества в клетку, ткань или орган. В изобретении предусматривается вариабельность нацеленных компонентов для применения в данных композициях, включая антитела, фрагменты антител и миметики антител, включая, но не ограничиваясь этим, те, которые приведены в Таблице 17, а также пептиды и низкомолекулярные вещества, способные связывать лиганды или рецепторы, связанные с заболеванием или метаболическими либо физиологическими нарушениями. В одном варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий по меньшей мере один нацеленный компонент из Таблиц 17, 18 или 21, соединенный с по меньшей мере одним XTEN. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий по меньшей мере один нацеленный компонент из Таблиц 17, 18 или 21, соединенный с каждым из по меньшей мере двух, или трех, или четырех XTEN. В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат, содержащий по меньшей мере один нацеленный компонент из Таблиц 17, 18 или 21, соединенный с по меньшей мере одним XTEN, и по меньшей мере одно лекарственное вещество или биологическое нагрузочное вещество, выбранные из группы, состоящей из нагрузочных веществ, приведенных в Таблице 11, Таблице 12, Таблице 18 или Таблице 21, соединенное с по меньшей мере одним XTEN. В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгационные композиции нацеленный компонент-XTEN-лекарственное вещество, в которых осуществляется избирательная доставка к лиганду или рецептору клетки-мишени композиции, которая затем может быть интернализированной клеткой, как проиллюстрировано на ФИГ. 37, что приводит к фармакологическому эффекту, известному в данной области для лекарственных компонентов.

[00401] Как проиллюстрировано на ФИГ. 21-24 и 28-32, такие конъюгационные композиции могут иметь разные валентности и содержать одну, две, три или четыре или более молекул XTEN-нагрузочное вещество, соединенных с одним или более нацеленным антителом или нацеленным компонентом. В случае, когда нацеленными компонентами являются антитела, в одном варианте реализации изобретения конъюгат XTEN-нагрузочное вещество соединен посредством кросс-линкера с цистеином в шарнирном участке антитела. В другом варианте реализации изобретения конъюгат XTEN-нагрузочное вещество соединен дисульфидным мостиком с цистеином в шарнирном участке антитела. Соответственно, конъюгат антитело-XTEN-нагрузочное вещество может содержать 1, 2, 3 или 4 либо более сегментов XTEN-нагрузочное вещество, присоединенных к антителу, фрагменту антитела или миметику. В другом варианте реализации изобретения XTEN присоединен снаружи шарнирного участка, что включает внесение цистеина в антитело для контроля за участками конъюгации, или посредством конъюгации с имеющимися боковыми цепями лизина. Присоединение XTEN-нагрузочное вещество для того, чтобы создавать конъюгаты с антителами, имеет много преимуществ: a) XTEN-нагрузочное вещество служит в качестве отщепляемого линкера, b) он обеспечивает растворимость, c) он дает возможность установить соотношение нагрузочного лекарственного вещества с IgG, и d) он может быть предварительно конъюгирован с лекарственным веществом, чтобы упростить производство.

Таблица 17: Нацеленные компоненты: Фрагменты антител, каркасы и миметики

Нацеленные компоненты
ABDURINS
Аднектин/Домен фибронектина типа III domain
Аднексин/Фибронектин
Аффитела/Протеин Z
Аффилин
AFFINILUTE
AFFINIMIP
AFIM
Антикалины/Липокалины
Аптатело
Аптамеры
Повторяющиеся белки армадилла
Авимеры
Азиметрик
Биспецифические диатела
BiTEs
Двухвалентные диатела
Центирины
DARPins/белки с анкириновым повтором
Диатела
Доменные антитела/dAbs/человеческая Vh
Сконструированные аффинные белки
Эвителa

Нацеленные компоненты
Fabs
Fv
Финомеры
Глутело
Im7/ColE7 иммунный белок
iMabs
Ноттин/Цистеин-узловые минибелки
Домены Кунитца
Максителa
Микротела
Минителa
Молекулярно импринтированные полимеры (МИП)
Монотела
Моноклональные рецепторы Т-клетки (мМРТ)
МоноЛекс
Нанотела
Нанофитины
Филомеры
Акулий Vhh
SMIPs
COMAмеры
Устойчивый scFV
Шпигельмеры
Синтела
TandAbs®
Телотела
Тетратела
Тетранектины
Четырехвалентные биспецифические антитела
Транс-тело
Триатела

[00402] В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты, содержащие нацеленный компонент в качестве одного из нагрузочных веществ и токсин в качестве второго нагрузочного вещества с одной или более копиями каждого типа нагрузочного вещества, соединенными с XTEN, принадлежащим композиции. В одной из вариаций вышесказанного конъюгат в некоторых случаях может содержать токсин, соединенный с XTEN посредством лабильного или отщепляемого линкера так, что после доставки или интернализации внутри мишени токсин высвобождается. В другой вариации вышесказанного нацеленный компонент является антителом или фрагментом антитела с одной, двумя, тремя или четырьмя композициями XTEN-нагрузочное вещество, соединенными посредством линкеров с антителом (например, соединенными с цистеином в шарнирном участке, как проиллюстрировано на ФИГ. 28-29), что обеспечивает создание конъюгатов для применения в нацеленной терапии клинических показаний, таких как, без ограничений, различные виды лечения опухолей и других раков, в которых антитело обеспечивает наличие

нацеленного компонента, а XTEN-нагрузочное вещество обеспечивает необходимую активность (например, цитотоксичность в опухолевой клетке). Следовательно, конъюгаты, являющиеся объектами данного изобретения, представляют собой иммуноконъюгаты. Нацеленные конъюгаты можно сконструировать так, чтобы они содержали нацеленные компоненты, полученные из антител или миметиков антител, либо являлись пептидами или низкомолекулярными веществами, которые связывают лиганды, связанные с заболеваниями клеток или органов. Неограничивающие примеры категорий фрагментов антител, каркасов и миметиков приведены в Таблице 17. Неограничивающие примеры специфических нацеленных компонентов, мишеней, на которые они нацелены, и токсинов, которые можно использовать в качестве нагрузочных веществ в конъюгатах согласно изобретению, приведены в Таблице 18. Отдельно предусматривается, что нацеленные конъюгационные композиции настоящего изобретения включают композиции любого заданного нацеленного компонента, который можно использовать в комбинации с одним или более из токсинов из Таблицы 18 или нагрузочными веществами, приведенными в Таблице 11 или Таблице 12. Дополнительно предусматривается, что конъюгат XTEN-нагрузочное вещество может содержать два или более нацеленных компонентов, которые могут быть одинаковыми либо разными. Предусматривается, что подобные конъюгаты можно применять в лечении болезненных состояний, таких как, без ограничений, те, которые приведены в Таблице 15.

Таблица 18: Примеры нацеленных компонентов, нагрузочных токсинов и мишеней, на которые могут быть нацелены конъюгационные композиции

Класс	Мишень	Нацеленный компонент	Токсин
Пептид	LHRHR	LHRH и аналоги (например, D-Lys-(6)-LHRH)	доксорубицин паклитаксел ауристатин (например, монометил ауристатин E; монометил ауристатин F) майтансин (например, майтанзиноид DM1; майтанзиноид DM4) доластатин калихеамицин алкалоид барвинка (например, дезацетилвинбластин моногидразид) камптотецина митомицин C эпотилон hTNF
	CD13, Аминопептидаза	Класс NGR (например, CNGRC, CNGRCG, GNGRG, KNGRE, (GNGRG)2KGK, CVLNGRMEC, NGRAHA, CNGRCVSGCAGRC)	
	Фолатный рецептор	Фолат и аналоги (напрмиер, γ-фолат, α-фолат; птероат-gly)	
	Интегрин	Циленгитид; RGD-4C; iRGD	
	ЛПНП-подобный рецептор	Ангиопеп-2	
	Рецептор соматостатина	Соматостатин и аналоги (например, октреотид; пасиреотид; ланреотид; вапреотид, JF-07-69)	
	Нуклеолин	F3 пептид	
	PDGFR-бета	RGR	
	Рецептор LyP-1	LyP-1; CGNKRTRGC	
	Хондроитин сульфат протеоглиган NG2	TAASGVRSMH; LTLRWVGLMS	

Класс	Мишень	Нацеленный компонент	Токсин
	VPAC1 и VPAC2	Вазоактивный интестинальный пептид	IL-12 бортезомиб ранпирназа экзотоксин синегнойной палочки SN-38 рахелмицин ингибитор m-TOR рапамицин тубулизин (тубулизин B; тубулизин M) дуокармицин
	CCK1 и CCK2	Холецитокинин	
	Рецептор гастрина, CCK1 и CCK2	Гастрин	
	Подтип рецептора GRP	Гастрин-отделяемый пептид	
	Рецептор нейротензина	Нейротензин	
	Рецептор альфа-MSH	Альфа-меланоцит стимулирующий гормон	
	Рецептор окситоцина	Окситоцин	
	Лимфатические сосуды	LyP-2; CNRRTKAGC	
	Лимфатические сосуды	LSD; CLSDGKRKC	
	Лимфатические сосуды	REA; CREAGRKAC	
	Лимфатические сосуды	AGR, CAGRRSAYC	
	Перициты и клетки эндотелия	RSR; CRSRKG	
	Перициты и клетки эндотелия	KAA; CKAAKNK	
	Кровеносные сосуды	CSRPRRSEC	
	Ангиогенные кровеносные сосуды и опухолевые клетки	KRK; CGKRK	
	Ангиогенные кровеносные сосуды	CDTRL	
	Ангиогенные кровеносные сосуды и опухолевые клетки	CGTKRKC	
Белок	DR4, DR5	TRAIL	
Антитело-подобный каркас	Разные	DARPINS	
	Разные	Центирины	
Антитело	Ley-подобный антиген	Br96; антитело к Ley-подобному антиген	
	HER2	Трастузумаб; Пертузумаб; антитело к HER2	
	EGFR	Цетуксимаб; антитело к EGFR	
	Нектин-4	антитело к нектину-4	
	CanAg (гликопротеин муцин-типа)	huC242, антитело к CanAg	
	CD138	антитело к CD138	
	CD19	MDX-1342; MOR-208; HuB4; антитело к CD19	
	CD22	Эпратузумаб; Бектумомаб; Инотузумаб; Моксетумомаб, RFB4; антитело к CD22	
	CD23	Лумиликсимаб, антитело к CD23	
	CD25 (рецептор IL-2)	Даклизумаб, антитело к CD25	
	CD30	Xmab2513; cAC10; MDX-060; антитело к CD30	
	CD33	Гемтузумаб; HuM195; huMy9-6; антитело к CD33	

Класс	Мишень	Нацеленный компонент	Токсин
	CD38	Даратумумаб, антитело к CD38	
	CD40	SGN-40; HCD122; антитело к CD40	
	CD56	huN901; антитело к CD56	
	CD70	MDX-1411; антитело к CD70	
	CD74	Милатузумаб; антитело к CD74	
	CD79b	антитело к CD79b	
	CD80	Галиксимаб; антитело к CD80	
	Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	Лапетузумаб, hCOL-1 антитело к CEA	
	Крипто	антитело к Крипто	
	cMET	CE-355621, DN30, MetMAb; антитело к антагонисту cMET	
	EpCAM	Адекатумумаб; Эдреколомаб; Катумаксомаб; антитело к EpCAM	
	EphA2	1C1, антитело к EphA2	
	GPNMB (человеческий гликопротеин NMB (остеоактивин))	глембатумумаб, антитело к GPNMB	
	Интегрины	антитело к интегрину	
	MUC-1 (эпитоп CA6)	антитело к MUC-1	
	PSMA	MDX-070, MLN591, антитело к PSMA	
	TGFa	антитело к TGFa	
	TIM1	антитело к TIM1	
	Фолатный рецептор 1	M9346A, фарлетузумаб, антитело к фолатному рецептору	
	Рецептор IL-13	антитело к рецептору IL-13	

[00403] В конкретном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие один или более нацеленных LHRH-компонентов, выбранных из таблицы 19, и один или более лекарственных компонентов, выбранных из Таблицы 11. В вышеприведенных вариантах реализации LHRH может быть соединен с сегментом XTEN, который, в свою очередь, соединен с одним или более сегментами XTEN, к которым присоединены лекарственные компоненты. В альтернативном варианте LHRH и лекарственный компонент могут быть присоединены к мономерному XTEN. В некоторых случаях лекарственные компоненты могут быть дополнительно присоединены к XTEN посредством лабильных или отщепляемых линкеров, которые обеспечивают возможность высвобождения лекарственного вещества из конъюгата после введения пациенту.

Таблица 19: Примеры LHRH

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

[00404] Дополнительные предусмотренные мишени, на которые могут быть нацелены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, включают опухолеассоциированные антигены, перечисленные в Таблице 20. В одном варианте реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие один или более нацеленных компонентов, способных связываться с одной или более мишенями из Таблицы 20.

Таблица 20: Мишени – опухолеассоциированные антигены

ОАА мишени (синонимы)	Номер доступа и ссылки
Her2 (ErbB2)	Номер доступа GenBank M11730; Пат. США № 5,869,445; WO2004048938; WO2004027049; WO2004009622; WO2003081210; WO2003089904; WO2003016475; US2003118592; WO2003008537; WO2003055439; WO2003025228; WO200222636; WO200212341; WO200213847; WO200214503; WO200153463; WO200141787; WO200044899; WO200020579; WO9630514; EP1439393; WO2004043361; WO2004022709; WO200100244
BMPR1B (рецептор костного морфогенетического белка типа IB)	Номер доступа GenBank NM _ 001203; WO2004063362; WO2003042661; US 2003134790; WO2002102235; WO2003055443; WO200299122; WO2003029421; WO2003024392; WO200298358' WO200254940; WO200259377; WO200230268
E16 (LAT1, SLC7A5)	Номер доступа GenBank NM _ 003486); WO2004048938; WO2004032842; WO2003042661; WO2003016475; WO200278524; WO200299074; WO200286443; WO2003003906; WO200264798; WO200014228; US2003224454; WO2003025138
STEAP1 (шесть трансмембранных эпителиальных антигена простаты)	Номер доступа GenBank NM _ 012449; WO2004065577; WO2004027049; EP1394274; WO2004016225; WO2003042661; US2003157089; US2003185830; US2003064397; WO200289747618; WO2003022995
STEAP2 (шесть трансмембранных эпителиальных антигена простаты 2)	Номер доступа GenBank AF455138; WO2003087306; US2003064397; WO200272596; WO200172962; WO2003104270; WO2003104270; US2004005598; WO2003042661; US2003060612; WO200226822; WO200216429
CA125/0772P (MUC16)	Номер доступа GenBank AF361486; WO2004045553; WO200292836; WO200283866; US2003124140
Фактор стимуляции мегакариоцитов (MPF, мезотелин)	Номер доступа GenBank NM _ 005823; WO2003101283; WO2002102235; WO2002101075; WO200271928; WO9410312

ОАА мишени (синонимы)	Номер доступа и ссылки
Котранспортер Na/Pi типа IIb (NaPi3b)	Номер доступа GenBank NM _ 006424; WO2004022778; EP1394274; WO2002102235; EP875569; WO200157188; WO2004032842; WO200175177
Семафорин 5b (SEMA5B, SEMAG)	Номер доступа GenBank AB040878; WO2004000997; WO2003003984; WO200206339; WO200188133; WO2003054152; WO2003101400
Антиген стволовых клеток рака простаты (PSCA hlg)	Номер доступа GenBank AY358628; US2003129192; US2004044180; US2004044179; US2003096961; US2003232056; WO2003105758; US2003206918; EP1347046; WO2003025148
ETBR (рецептор эндотелина типа B)	Номер доступа GenBank AY275463; WO2004045516; WO2004048938; WO2004040000; WO2003087768; WO2003016475; WO2003016475; WO200261087; WO2003016494; WO2003025138; WO200198351; EP522868; WO200177172; US2003109676; Пат. США № 6,518,404; Пат. США № 5,773,223; WO2004001004
TRPV4 (катионный канал транзиторного рецепторного потенциала, подсемейство V)	Пат. заявка США № 20090208514
CDC45L	Номер доступа GenBank AJ223728; Пат. заявка США № 20090208514
CRIPTO (CR, CR1, CRGF)	Номер доступа GenBank NP _ 003203 or NM _ 003212; US2003224411; WO2003083041; WO2003034984; WO200288170; WO2003024392; WO200216413; WO200222808; U.S. 5,854,399; Пат. США № 5,792,616
CD21 (CR2 (Комплементарный рецептор 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барр)	Номер доступа GenBank M26004; WO2004045520; US2004005538; WO2003062401; WO2004045520; WO9102536; WO2004020595
CD79b (CD79B, CD79β, IGb (иммуноглобулин-ассоциированный бета), B29)	Номер доступа GenBank NM _ 000626 or 11038674; WO2004016225; WO2003087768; US2004101874; WO2003062401; WO200278524; US2002150573; Пат. США № 5,644,033; WO2003048202; WO 99/558658, Пат. США № 6,534,482; WO200055351
FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 якорный белок фосфатазы 1a), SPAP1B, SPAP1C)	Номер доступа GenBank NM _ 030764, AY358130; WO2004016225; WO2003077836; WO200138490; WO2003097803; WO2003089624
NCA (CEACAM6)	Номер доступа GenBank M18728; WO2004063709; EP1439393; WO2004044178; WO2004031238; WO2003042661; WO200278524; WO200286443; WO200260317
MDP (DPEP1)	Номер доступа GenBank BC017023; WO2003016475; WO200264798
IL20Rα (IL20Ra, ZCYTOR7)	Номер доступа GenBank AF184971; EP1394274; US2004005320; WO2003029262; WO2003002717; WO200222153; US2002042366; WO200146261; WO200146232; WO9837193
BECAN (ядерный белок бревикан)	Номер доступа GenBank AF229053; US2003186372; US2003186373; US2003119131; US2003119122; US2003119126; US2003119121; US2003119129; US2003119130; US2003119128; US2003119125; WO2003016475; WO200202634
EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)	Номер доступа GenBank NM _ 004442; WO2003042661; WO200053216; WO2004065576 (п. 1); WO2004020583; WO2003004529; WO200053216
B7h (ASLG659)	Номер доступа GenBank AX092328; US20040101899; WO2003104399; WO2004000221; US2003165504; US2003124140; US2003065143; WO2002102235; US2003091580; WO200210187; WO200194641; WO200202624;

ОАА мишени (синонимы)	Номер доступа и ссылки
	US2002034749; WO200206317; WO200271928; WO200202587; WO200140269; WO200036107; WO2004053079; WO2003004989; WO200271928
PSCA (предшественник антигена стволовых клеток простаты)	Номер доступа GenBank AJ297436; WO2004022709; EP1394274; US2004018553; WO2003008537 (п. 1); WO200281646; WO2003003906; WO200140309; US2001055751; WO200032752; WO9851805; WO9851824; WO9840403
BAFF-R (рецептор фактора, активирующего B-клетки, BLyS рецептор 3, BR3)	Номер доступа GenBank AF116456; WO2004058309; WO2004011611; WO2003045422; WO2003014294; WO2003035846; WO200294852; WO200238766; WO200224909
CD22 (рецептор B-клеток CD22-β-форма, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)	Номер доступа GenBank AK026467; WO2003072036
CD79a (иммуноглобулин-ассоциированный альфа)	Номер доступа GenBank NP _001774.10; WO2003088808, US20030228319; WO2003062401; US2002150573; WO9958658; WO9207574; Пат. США № 5,644,033
CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта)	Номер доступа GenBank NP _001707.1; WO2004040000; WO2004015426; US2003105292; Пат. США № 6,555,339; WO200261087; WO200157188; WO200172830; WO200022129; WO9928468; Пат. США № 5,440,021; WO9428931; WO9217497
HLA-DOB	Номер доступа GenBank NP _002111.1; WO9958658; Пат. США № 6,153,408; Пат. США № 5,976,551; Пат. США № 6,011,146
P2X5	Номер доступа GenBank NP _002552.2; WO2004047749; WO2003072035; WO200222660; WO2003093444; WO2003087768; WO2003029277
CD72 (антиген дифференцирования B-клеток CD72, Lyb-2)	Номер доступа GenBank NP _001773.1; WO2004042346; WO2003026493; WO200075655
CD180 (LY64)	Номер доступа GenBank NP _005573.1; US2002193567; WO9707198; WO2003083047; WO9744452
FcRH1 (Fc-рецептор-подобный белок 1)	Номер доступа GenBank NP _443170.1) WO2003077836; WO200138490; WO2003089624; EP1347046; WO2003089624
IRTA2 (Рецептор суперсемейства иммуноглобулинов транслокационно-ассоциированный 2)	Номер доступа GenBank Human:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453; WO2003024392; WO2003077836; WO200138490
TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1)	Номер доступа GenBank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO2004074320; WO2003042661; WO2003009814; EP1295944; WO200230268; WO200190304; US2004249130; US2004022727; WO2004063355; US2004197325; US2003232350; US2004005563; US2003124579
CS1 (CRACC, 19A, APEX-1, FOAP12)	Номер доступа GenBank NM 021181; US 20100168397
DLL4	Номер доступа GenBank NM 019074; US 20100303812
Ley	ADB235860; US 7879983
CD40 (Bp50, CDW40, MGC9013, TNFRSF5, p50)	AL035662.65; US 6946129
OBA1 (5T4)	Номер доступа GenBank NP_001159864.1; US 20100021483
p97	Woodbury et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2183-2186; Brown et al., 1981, J. Immunol. 127: 539-546
Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	Номер доступа GenBank NP_004354.2; US 6,676,924
TAG-72	US 7256004
ДНК	
Нейропилин-1 (NRP1)	Номер доступа GenBank NP_001019799.1; US 20080213268
A33	Номер доступа GenBank NP_005805.1; US 7579187
Муцин-1 (MUC1)	Номер доступа GenBank NP_001018016.1; NP_001018017.1;

ОАА мишени (синонимы)	Номер доступа и ссылки
	US 7183388
ED-B фибронектин	US 7785591
Антиген Томсона-Фриденрайха (TF)	US 7374755; US 20100297159
Рецептор бомбезина	US5750370
CanAg	
Карциноэмбриональный антиген (КЭА)	US4818709
CD13	
CD138	
CD30	
CD47	
CD56	
CD70	
Хондроитин сульфат протеогликан NG2	
EphA2	
Фолатный рецептор 1	US5547668
Рецептор гастрина	
GPNMB (человеческий гликопротеин)	
NMB (остеоактивин)	
Рецепторный подтип GRP	
Интегрин avb3	US20110166072
LHRHP	US20110104074
Рецептор LRP	
Рецептор LyP-1	
Нектин-4	
Рецептор нейротензина	US8058230
Нуклеолин	
Рецептор соматостатина	
TIM1	
VPAC1	
VPAC2	
Рецептор альфа-MSH	
CD25	
Рецептор интерлейкина-1	

[00405] В конкретных вариантах реализации в изобретении предложены конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, содержащие один, два или более нацеленных компонентов и один, два или более лекарственных компонентов, соединенных с XTEN. Неограничивающие варианты реализации отдельных конъюгационных композиций приведены в Таблице 21, в которой композиция из колонки 2 содержит определенные компоненты из: i) последовательностей XTEN из Таблицы 3, приведенных в Таблице в колонке XTEN; ii) нацеленных нагрузочных компонентов, приведенных в Таблице в колонке Нацеленный компонент, которые обеспечивают композиции способность нацеливания (при этом указано количество компонентов; например, 1x или 3x); и iii) лекарственного фармакофора, приведенного в Таблице в колонке Лекарственный компонент (при этом указано количество молекул лекарственного вещества, соединенных с XTEN; например, 3x или 9x). Специалисту в данной области понятно, что изобретение предусматривает существование других комбинаций

описанных компонентов, а также различных количеств и соотношений соответствующих определенных компонентов, а также различных последовательностей XTEN, к которым присоединены нагрузочные вещества. Например, в изобретении предусматривается, что количество лекарственных компонентов, присоединенных к заданному XTEN, может составлять 1, или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10 или более, и что XTEN может содержать, например, соответствующее количество остатков цистеина или лизина, к которым могут быть присоединены лекарственные компоненты. Вдобавок, в изобретении предусматривается, что количество нацеленных компонентов, присоединенных к конъюгату, может составлять 1, или 2, или 3 или более, и они будут аналогично соединены с XTEN с N-концевой аминогруппой или соответствующим количеством остатков цистеина или лизина.

Таблица 21: Примеры конъюгатов

Конъюгат	**Название конъюгата***	**XTEN, соединенный с нацеленным компонентом****	**XTEN соединенный с лекарственным компонентом****	**Нацеленный компонент***	**Лекарственный компонент***
1	1xLHRH-XTEN-3xДокс	Seg 174		1xLHRH	3xДоксорубицин
2	1xLHRH-XTEN-9xДокс	Seg 175		1xLHRH	9xДоксорубицин
3	3xLHRH-XTEN-3xДокс	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xДоксорубицин
4	3xLHRH-XTEN-9xДокс	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xДоксорубицин
5	XTEN-3xДокс	Seg 174			3xДоксорубицин
6	XTEN-9xДокс	Seg 175			9xДоксорубицин
7	1xLHRH-XTEN-3xMMAE	Seg 174		1xLHRH	3xMMAE****
8	1xLHRH-XTEN-9xMMAE	Seg 175		1xLHRH	9xMMAE
9	3xLHRH-XTEN-3xMMAE	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xMMAE
10	3xLHRH-XTEN-9xMMAE	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xMMAE
11	XTEN-3xMMAE	Seg 174			3xMMAE
12	XTEN-9xMMAE	Seg 175			9xMMAE
13	1xLHRH-XTEN-3xMMAF	Seg 174		1xLHRH	3xMMAF*****
14	1xLHRH-XTEN-9xMMAF	Seg 175		1xLHRH	9xMMAF
15	3xLHRH-XTEN-3xMMAF	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xMMAF
16	3xLHRH-XTEN-9xMMAF	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xMMAF
17	XTEN-3xMMAF	Seg 174			3xMMAF
18	XTEN-9xMMAF	Seg 175			9xMMAF
19	1xLHRH-XTEN-3xМертанзин	Seg 174		1xLHRH	3xМертанзин

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
20	1xLHRH-XTEN-9xМертанзин	Seg 175		1xLHRH	9xМертанзин
21	3xLHRH-XTEN-3xМертанзин	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xМертанзин
22	3xLHRH-XTEN-9xМертанзин	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xМертанзин
23	XTEN-3xМертанзин	Seg 174			3xМертанзин
24	XTEN-9xМертанзин	Seg 175			9xМертанзин
25	1xLHRH-XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174		1xLHRH	3xМайтанзиноид DM4
26	1xLHRH-XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175		1xLHRH	9xМайтанзиноид DM4
27	3xLHRH-XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xМайтанзиноид DM4
28	3xLHRH-XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xМайтанзиноид DM4
29	XTEN-3xМайтанзиноид DM4	Seg 174			3xМайтанзиноид DM4
30	XTEN-9xМайтанзиноид DM4	Seg 175			9xМайтанзиноид DM4
31	1xLHRH-XTEN-3xПаклитаксел	Seg 174		1xLHRH	3xПаклитаксел
32	1xLHRH-XTEN-9xПаклитаксел	Seg 175		1xLHRH	9xПаклитаксел
33	3xLHRH-XTEN-3xПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xПаклитаксел
34	3xLHRH-XTEN-9xПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xПаклитаксел
35	XTEN-3xПаклитаксел	Seg 174			3xПаклитаксел
36	XTEN-9xПаклитаксел	Seg 175			9xПаклитаксел
37	1xLHRH-XTEN-3xSN-38	Seg 174		1xLHRH	3xSN-38
38	1xLHRH-XTEN-9xSN-38	Seg 175		1xLHRH	9xSN-38
39	3xLHRH-XTEN-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xSN-38
40	3xLHRH-XTEN-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xSN-38
41	XTEN-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
42	XTEN-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
43	1xLHRH-XTEN-3xГемцитабин	Seg 174		1xLHRH	3xГемцитабин

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
44	1xLHRH-XTEN-9xГемцитабин	Seg 175		1xLHRH	9xГемцитабин
45	3xLHRH-XTEN-3xГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xГемцитабин
46	3xLHRH-XTEN-9xГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xГемцитабин
47	XTEN-3xГемцитабин	Seg 174			3xГемцитабин
48	XTEN-9xГемцитабин	Seg 175			9xГемцитабин
49	1xLHRH-XTEN-3xКарбоплатин	Seg 174		1xLHRH	3xКарбоплатин
50	1xLHRH-XTEN-9xКарбоплатин	Seg 175		1xLHRH	9xКарбоплатин
51	3xLHRH-XTEN-3xКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3xLHRH	3xКарбоплатин
52	3xLHRH-XTEN-9xКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3xLHRH	9xКарбоплатин
53	XTEN-3xКарбоплатин	Seg 174			3xКарбоплатин
54	XTEN-9xКарбоплатин	Seg 175			9xКарбоплатин
55	1xLHRH-XTEN-Человеческая РНКаза			1xLHRH	Человеческая РНКаза
56	3xLHRH-XTEN-Человеческая РНКаза			3xLHRH	Человеческая РНКаза
57	1xLHRH-XTEN-Бычья РНКаза			1xLHRH	Бычья РНКаза
58	3xLHRH-XTEN-Бычья РНКаза			3xLHRH	Бычья РНКаза
59	1xLHRH-XTEN-Ранпирназа			1xLHRH	Ранпирназа
60	3xLHRH-XTEN-Ранпирназа			3xLHRH	Ранпирназа
61	1xLHRH-XTEN-Антивирусный белок лаконоса			1xLHRH	Антивирусный белок лаконоса
62	3xLHRH-XTEN-Антивирусный белок лаконоса			3xLHRH	Антивирусный белок лаконоса
63	1xфолат-XTEN-3xДокс	Seg 174		1xфолат	3xДоксорубицин
64	1xфолат-XTEN-9xДокс	Seg 175		1xфолат	9xДоксорубицин
65	3xфолат-XTEN-3xДокс	Seg 176	Seg 176	3xфолат	3xДоксорубицин
66	3xфолат-XTEN-9xДокс	Seg 176	Seg 177	3xфолат	9xДоксору

Конъюгат	**Название конъюгата***	**XTEN, соединенный с нацеленным компонентом****	**XTEN соединенный с лекарственным компонентом****	**Нацеленный компонент***	**Лекарственный компонент***
					бицин
67	XTEN-3хДокс	Seg 174			3хДоксорубицин
68	XTEN-9хДокс	Seg 175			9хДоксорубицин
69	1хфолат-XTEN-3xMMAE	Seg 174		1хфолат	3xMMAE
70	1хфолат-XTEN-9xMMAE	Seg 175		1хфолат	9xMMAE
71	3хфолат-XTEN-3xMMAE	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3xMMAE
72	3хфолат-XTEN-9xMMAE	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9xMMAE
73	XTEN-3xMMAE	Seg 174			3xMMAE
74	XTEN-9xMMAE	Seg 175			9xMMAE
75	1хфолат-XTEN-3xMMAF	Seg 174		1хфолат	3xMMAF
76	1хфолат-XTEN-9xMMAF	Seg 175		1хфолат	9xMMAF
77	3хфолат-XTEN-3xMMAF	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3xMMAF
78	3хфолат-XTEN-9xMMAF	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9xMMAF
79	XTEN-3xMMAF	Seg 174			3xMMAF
80	XTEN-9xMMAF	Seg 175			9xMMAF
81	1хфолат-XTEN-3хМертанзин	Seg 174		1хфолат	3хМертанзин
82	1хфолат-XTEN-9хМертанзин	Seg 175		1хфолат	9хМертанзин
83	3хфолат-XTEN-3хМертанзин	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3хМертанзин
84	3хфолат-XTEN-9хМертанзин	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9хМертанзин
85	XTEN-3хМертанзин	Seg 174			3хМертанзин
86	XTEN-9хМертанзин	Seg 175			9хМертанзин
87	1хфолат-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		1хфолат	3хМайтанзиноид DM4
88	1хфолат-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175		1хфолат	9хМайтанзиноид DM4
89	3хфолат-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3хМайтанзиноид DM4
90	3хфолат-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9хМайтанзиноид DM4
91	XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174			3хМайтанзиноид DM4
92	XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175			9хМайтанзиноид DM4

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
93	1хфолат-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174		1хфолат	3хПаклитаксел
94	1хфолат-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175		1хфолат	9хПаклитаксел
95	3хфолат-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3хПаклитаксел
96	3хфолат-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9хПаклитаксел
97	XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174			3хПаклитаксел
98	XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175			9хПаклитаксел
99	1хфолат-XTEN-3xSN-38	Seg 174		1хфолат	3xSN-38
100	1хфолат-XTEN-9xSN-38	Seg 175		1хфолат	9xSN-38
101	3хфолат-XTEN-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3xSN-38
102	3хфолат-XTEN-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9xSN-38
103	XTEN-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
104	XTEN-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
105	1хфолат-XTEN-3хГемцитабин	Seg 174		1хфолат	3хГемцитабин
106	1хфолат-XTEN-9хГемцитабин	Seg 175		1хфолат	9хГемцитабин
107	3хфолат-XTEN-3хГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3хГемцитабин
108	3хфолат-XTEN-9хГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9хГемцитабин
109	XTEN-3хГемцитабин	Seg 174			3хГемцитабин
110	XTEN-9хГемцитабин	Seg 175			9хГемцитабин
111	1хфолат-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174		1хфолат	3хКарбоплатин
112	1хфолат-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175		1хфолат	9хКарбоплатин
113	3хфолат-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3хфолат	3хКарбоплатин
114	3хфолат-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3хфолат	9хКарбоплатин
115	XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174			3хКарбоплатин
116	XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175			9хКарбоплатин
117	1хокреотид-XTEN-3хДокс	Seg 174		1хокреотид	3хДоксорубицин
118	1хокреотид-XTEN-9хДокс	Seg 175		1хокреотид	9хДоксорубицин
119	3хокреотид-XTEN-3хДокс	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хДоксорубицин

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
120	3хокреотид-XTEN-9хДокс	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хДоксорубицин
121	XTEN-3хДокс	Seg 174			3хДоксорубицин
122	XTEN-9хДокс	Seg 175			9хДоксорубицин
123	1хокреотид-XTEN-3хMMAE	Seg 174		1хокреотид	3хMMAE
124	1хокреотид-XTEN-9хMMAE	Seg 175		1хокреотид	9хMMAE
125	3хокреотид-XTEN-3хMMAE	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хMMAE
126	3хокреотид-XTEN-9хMMAE	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хMMAE
127	XTEN-3хMMAE	Seg 174			3хMMAE
128	XTEN-9хMMAE	Seg 175			9хMMAE
129	1хокреотид-XTEN-3хMMAF	Seg 174		1хокреотид	3хMMAF
130	1хокреотид-XTEN-9хMMAF	Seg 175		1хокреотид	9хMMAF
131	3хокреотид-XTEN-3хMMAF	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хMMAF
132	3хокреотид-XTEN-9хMMAF	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хMMAF
133	XTEN-3хMMAF	Seg 174			3хMMAF
134	XTEN-9хMMAF	Seg 175			9хMMAF
135	1хокреотид-XTEN-3хМертанзин	Seg 174		1хокреотид	3хМертанзин
136	1хокреотид-XTEN-9хМертанзин	Seg 175		1хокреотид	9хМертанзин
137	3хокреотид-XTEN-3хМертанзин	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хМертанзин
138	3хокреотид-XTEN-9хМертанзин	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хМертанзин
139	XTEN-3хМертанзин	Seg 174			3хМертанзин
140	XTEN-9хМертанзин	Seg 175			9хМертанзин
141	1хокреотид-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		1хокреотид	3хМайтанзиноид DM4
142	1хокреотид-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175		1хокреотид	9хМайтанзиноид DM4
143	3хокреотид-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хМайтанзиноид DM4
144	3хокреотид-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хМайтанзиноид DM4
145	XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174			3хМайтанзиноид DM4
146	XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175			9хМайтанзиноид

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
					DM4
147	1хокреотид-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174		1хокреотид	3хПаклитаксел
148	1хокреотид-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175		1хокреотид	9хПаклитаксел
149	3хокреотид-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хПаклитаксел
150	3хокреотид-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хПаклитаксел
151	XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174			3хПаклитаксел
152	XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175			9хПаклитаксел
153	1хокреотид-XTEN-3xSN-38	Seg 174		1хокреотид	3xSN-38
154	1хокреотид-XTEN-9xSN-38	Seg 175		1хокреотид	9xSN-38
155	3хокреотид-XTEN-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3xSN-38
156	3хокреотид-XTEN-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9xSN-38
157	XTEN-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
158	XTEN-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
159	1хокреотид-XTEN-3хГемцитабин	Seg 174		1хокреотид	3хГемцитабин
160	1хокреотид-XTEN-9хГемцитабин	Seg 175		1хокреотид	9хГемцитабин
161	3хокреотид-XTEN-3хГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хГемцитабин
162	3хокреотид-XTEN-9хГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хГемцитабин
163	XTEN-3хГемцитабин	Seg 174			3хГемцитабин
164	XTEN-9хГемцитабин	Seg 175			9хГемцитабин
165	1хокреотид-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174		1хокреотид	3хКарбоплатин
166	1хокреотид-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175		1хокреотид	9хКарбоплатин
167	3хокреотид-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хКарбоплатин
168	3хокреотид-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хКарбоплатин
169	XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174			3хКарбоплатин
170	XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175			9хКарбоплатин
171	1хокреотид-XTEN-3хЭверолимус	Seg 174		1хокреотид	3хЭверолимус
172	1хокреотид-XTEN-9хЭверолимус	Seg 175		1хокреотид	9хЭверолимус
173	3хокреотид-XTEN-	Seg 176	Seg 176	3хокреотид	3хЭвероли

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
	3хЭверолимус				мус
174	3хокреотид-XTEN-9хЭверолимус	Seg 176	Seg 177	3хокреотид	9хЭвероли мус
175	XTEN-3хЭверолимус	Seg 174			3хЭвероли мус
176	XTEN-9хЭверолимус	Seg 175			9хЭвероли мус
177	1хпасиреотид-XTEN-3хДокс	Seg 174		1хпасиреотид	3хДоксору бицин
178	1хпасиреотид-XTEN-9хДокс	Seg 175		1хпасиреотид	9хДоксору бицин
179	3хпасиреотид-XTEN-3хДокс	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хДоксору бицин
180	3хпасиреотид-XTEN-9хДокс	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хДоксору бицин
181	XTEN-3хДокс	Seg 174			3хДоксору бицин
182	XTEN-9хДокс	Seg 175			9хДоксору бицин
183	1хпасиреотид-XTEN-3хMMAE	Seg 174		1хпасиреотид	3хMMAE
184	1хпасиреотид-XTEN-9хMMAE	Seg 175		1хпасиреотид	9хMMAE
185	3хпасиреотид-XTEN-3хMMAE	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хMMAE
186	3хпасиреотид-XTEN-9хMMAE	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хMMAE
187	XTEN-3хMMAE	Seg 174			3хMMAE
188	XTEN-9хMMAE	Seg 175			9хMMAE
189	1хпасиреотид-XTEN-3хMMAF	Seg 174		1хпасиреотид	3хMMAF
190	1хпасиреотид-XTEN-9хMMAF	Seg 175		1хпасиреотид	9хMMAF
191	3хпасиреотид-XTEN-3хMMAF	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хMMAF
192	3хпасиреотид-XTEN-9хMMAF	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хMMAF
193	XTEN-3хMMAF	Seg 174			3хMMAF
194	XTEN-9хMMAF	Seg 175			9хMMAF
195	1хпасиреотид-XTEN-3хМертанзин	Seg 174		1хпасиреотид	3хМертанзин
196	1хпасиреотид-XTEN-9хМертанзин	Seg 175		1хпасиреотид	9хМертанзин
197	3хпасиреотид-XTEN-3хМертанзин	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хМертанзин
198	3хпасиреотид-XTEN-9хМертанзин	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хМертанзин
199	XTEN-3хМертанзин	Seg 174			3хМертанзин
200	XTEN-9хМертанзин	Seg 175			9хМертанзин
201	1хпасиреотид-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		1хпасиреотид	3хМайтанзиноид DM4
202	1хпасиреотид-XTEN-	Seg 175		1хпасиреотид	9хМайтанз

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
	9хМайтанзиноид DM4				иноид DM4
203	3хпасиреотид-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хМайтанзиноид DM4
204	3хпасиреотид-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хМайтанзиноид DM4
205	-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174			3хМайтанзиноид DM4
206	-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175			9хМайтанзиноид DM4
207	1хпасиреотид-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174		1хпасиреотид	3хПаклитаксел
208	1хпасиреотид-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175		1хпасиреотид	9хПаклитаксел
209	3хпасиреотид-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хПаклитаксел
210	3хпасиреотид-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хПаклитаксел
211	XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174			3хПаклитаксел
212	XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175			9хПаклитаксел
213	1хпасиреотид-XTEN-3xSN-38	Seg 174		1хпасиреотид	3xSN-38
214	1хпасиреотид-XTEN-9xSN-38	Seg 175		1хпасиреотид	9xSN-38
215	3хпасиреотид-XTEN-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3xSN-38
216	3хпасиреотид-XTEN-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9xSN-38
217	XTEN-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
218	XTEN-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
219	1хпасиреотид-XTEN-3хГемцитабин	Seg 174		1хпасиреотид	3хГемцитабин
220	1хпасиреотид-XTEN-9хГемцитабин	Seg 175		1хпасиреотид	9хГемцитабин
221	3хпасиреотид-XTEN-3хГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хГемцитабин
222	3хпасиреотид-XTEN-9хГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хГемцитабин
223	-XTEN-3хГемцитабин	Seg 174			3хГемцитабин
224	-XTEN-9хГемцитабин	Seg 175			9хГемцитабин
225	1хпасиреотид-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174		1хпасиреотид	3хКарбоплатин
226	1хпасиреотид-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175		1хпасиреотид	9хКарбоплатин

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
227	3хпасиреотид-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хКарбоплатин
228	3хпасиреотид-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хКарбоплатин
229	-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174			3хКарбоплатин
230	-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175			9хКарбоплатин
231	1хпасиреотид-XTEN-3хЭверолимус	Seg 174		1хпасиреотид	3хЭверолимус
232	1хпасиреотид-XTEN-9хЭверолимус	Seg 175		1хпасиреотид	9хЭверолимус
233	3хпасиреотид-XTEN-3хЭверолимус	Seg 176	Seg 176	3хпасиреотид	3хЭверолимус
234	3хпасиреотид-XTEN-9хЭверолимус	Seg 176	Seg 177	3хпасиреотид	9хЭверолимус
235	XTEN-3хЭверолимус	Seg 174			3хЭверолимус
236	XTEN-9хЭверолимус	Seg 175			9хЭверолимус
237	1хбомбезин-XTEN-3хДокс	Seg 174		1хбомбезин	3хДоксорубицин
238	1хбомбезин-XTEN-9хДокс	Seg 175		1хбомбезин	9хДоксорубицин
239	3хбомбезин-XTEN-3хДокс	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хДоксорубицин
240	3хбомбезин-XTEN-9хДокс	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хДоксорубицин
241	XTEN-3хДокс	Seg 174			3хДоксорубицин
242	XTEN-9хДокс	Seg 175			9хДоксорубицин
243	1хбомбезин-XTEN-3хMMAE	Seg 174		1хбомбезин	3хMMAE
244	1хбомбезин-XTEN-9хMMAE	Seg 175		1хбомбезин	9хMMAE
245	3хбомбезин-XTEN-3хMMAE	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хMMAE
246	3хбомбезин-XTEN-9хMMAE	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хMMAE
247	XTEN-3хMMAE	Seg 174			3хMMAE
248	XTEN-9хMMAE	Seg 175			9хMMAE
249	1хбомбезин-XTEN-3хMMAF	Seg 174		1хбомбезин	3хMMAF
250	1хбомбезин-XTEN-9хMMAF	Seg 175		1хбомбезин	9хMMAF
251	3хбомбезин-XTEN-3хMMAF	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хMMAF
252	3хбомбезин-XTEN-9хMMAF	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хMMAF
253	XTEN-3хMMAF	Seg 174			3хMMAF
254	XTEN-9хMMAF	Seg 175			9хMMAF
255	1хбомбезин-XTEN-3хМертанзин	Seg 174		1хбомбезин	3хМертанзин
256	1хбомбезин-XTEN-	Seg 175		1хбомбезин	9хМертанз

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
	9хМертанзин				ин
257	3хбомбезин-XTEN-3хМертанзин	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хМертанзин
258	3хбомбезин-XTEN-9хМертанзин	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хМертанзин
259	XTEN-3хМертанзин	Seg 174			3хМертанзин
260	XTEN-9хМертанзин	Seg 175			9хМертанзин
261	1хбомбезин-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174		1хбомбезин	3хМайтанзиноид DM4
262	1хбомбезин-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175		1хбомбезин	9хМайтанзиноид DM4
263	3хбомбезин-XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хМайтанзиноид DM4
264	3хбомбезин-XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хМайтанзиноид DM4
265	XTEN-3хМайтанзиноид DM4	Seg 174			3хМайтанзиноид DM4
266	XTEN-9хМайтанзиноид DM4	Seg 175			9хМайтанзиноид DM4
267	1хбомбезин-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174		1хбомбезин	3хПаклитаксел
268	1хбомбезин-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175		1хбомбезин	9хПаклитаксел
269	3хбомбезин-XTEN-3хПаклитаксел	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хПаклитаксел
270	3хбомбезин-XTEN-9хПаклитаксел	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хПаклитаксел
271	XTEN-3хПаклитаксел	Seg 174			3хПаклитаксел
272	XTEN-9хПаклитаксел	Seg 175			9хПаклитаксел
273	1хбомбезин-XTEN-3xSN-38	Seg 174		1хбомбезин	3xSN-38
274	1хбомбезин-XTEN-9xSN-38	Seg 175		1хбомбезин	9xSN-38
275	3хбомбезин-XTEN-3xSN-38	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3xSN-38
276	3хбомбезин-XTEN-9xSN-38	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9xSN-38
277	XTEN-3xSN-38	Seg 174			3xSN-38
278	XTEN-9xSN-38	Seg 175			9xSN-38
279	1хбомбезин-XTEN-3хГемцитабин	Seg 174		1хбомбезин	3хГемцитабин
280	1хбомбезин-XTEN-	Seg 175		1хбомбезин	9хГемцита

Конъюгат	Название конъюгата*	XTEN, соединенный с нацеленным компонентом**	XTEN соединенный с лекарственным компонентом**	Нацеленный компонент*	Лекарственный компонент*
	9хГемцитабин				бин
281	3хбомбезин-XTEN-3хГемцитабин	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хГемцитабин
282	3хбомбезин-XTEN-9хГемцитабин	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хГемцитабин
283	XTEN-3хГемцитабин	Seg 174			3хГемцитабин
284	XTEN-9хГемцитабин	Seg 175			9хГемцитабин
285	1хбомбезин-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174		1хбомбезин	3хКарбоплатин
286	1хбомбезин-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175		1хбомбезин	9хКарбоплатин
287	3хбомбезин-XTEN-3хКарбоплатин	Seg 176	Seg 176	3хбомбезин	3хКарбоплатин
288	3хбомбезин-XTEN-9хКарбоплатин	Seg 176	Seg 177	3хбомбезин	9хКарбоплатин
289	XTEN-3хКарбоплатин	Seg 174			3хКарбоплатин
290	XTEN-9хКарбоплатин	Seg 175			9хКарбоплатин

* 1х, 3х, 9х обозначает количество указанных компонентов, соединенных с XTEN
** обозначает последовательность XTEN из Таблицы 3; например, Seg 174
Монометил ауристатин E * Монометил ауристатин F

V). ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[00406] В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, являющиеся предметом изобретения. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит конъюгат, выбранный из группы, состоящей из конъюгатов, приведенных в Таблице 21, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит конъюгат, содержащий по меньшей мере первую последовательность XTEN, имеющую по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, или имеющую 100% идентичности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в Таблице 2 и Таблице 3, при этом последовательности XTEN данной композиции являются в основном гомогенными по длине, XTEN соединен с по меньшей мере первым нагрузочным веществом, выбранным из группы

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

[00407] В изобретении предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий этап соединения конъюгационной композиции, соответствующей вариантам реализации изобретения, с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем в фармацевтически приемлемый состав. Конъюгаты XTEN-нагрузочное вещество, являющиеся объектами настоящего изобретения, можно получить согласно известным способам получения фармацевтически используемых композиций, при этом конъюгат XTEN-нагрузочное вещество смешан с фармацевтически приемлемым носителем, таким как водные растворы или буферы, фармацевтически приемлемые суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей включают пропилэтиленгликоль, полиэтиленгликоль и растительные масла. Фармацевтические составы готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего необходимую степень очистки, с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами и стабилизаторами, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтические композиции можно вводить любыми подходящими средствами или способами, в том числе подкожно, подкожно при помощи инфузионного насоса, внутримышечно и внутривенно. Очевидно, что предпочтительный способ будет зависеть от заболевания и возраста пациента, а также от сложности состояния, лечение которого проводится. Осмотические насосы можно использовать в качестве средств медленного высвобождения в форме таблеток, пилюль, капсул или имплантируемых устройств. Также в качестве средств медленного высвобождения можно использовать шприцевые насосы. Подобные устройства описаны в патентах США № 4,976,696; 4,933,185; 5,017,378; 6,309,370; 6,254,573; 4,435,173; 4,398,908; 6,572,585; 5,298,022; 5,176,502; 5,492,534; 5,318,540; и 4,988,337, содержание которых включено в данный текст посредством ссылки. Специалист в данной области, приняв во внимание содержание данного изобретения и содержание указанных патентов, может изготовить шприцевой насос для пролонгированного высвобождения композиций, являющихся объектами настоящего изобретения.

[00408] В другом варианте реализации в изобретении предложен конъюгат XTEN-нагрузочное вещество из любого описанного в данном тексте варианта реализации для применения в получении медикаментов, пригодных для лечения болезненных состояний, включая, но не ограничиваясь этим, заболевания, приведенные в Таблице 16.

VI). СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[00409] В изобретении предложен способ лечения заболевания у пациента, включающий введение эффективного количества конъюгата XTEN-нагрузочное вещество из любого из вышеприведенных вариантов реализации нуждающемуся в этом пациенту. В одном варианте реализации изобретения XTEN-нагрузочное вещество содержит один тип нагрузочного вещества, выбранного из Таблиц 11, 12, 18, 19 и 21. В другом варианте реализации изобретения XTEN-нагрузочное вещество содержит два типа нагрузочных веществ, выбранных из Таблиц 11, 12, 18, 19 и 21. В другом варианте реализации изобретения XTEN-нагрузочное вещество содержит два типа нагрузочных веществ, при этом одно нагрузочное вещество выбрано из Таблиц 11, 12 и 18, а второе нагрузочное вещество является нацеленным компонентом с аффинностью связывания к мишени из Таблицы 20 или является нацеленным компонентом из любой из Таблиц 18, 19 или 21. В другом варианте реализации изобретения XTEN-нагрузочное вещество содержит более чем три типа нагрузочных веществ, выбранных из Таблиц 11, 12, 18, 19 и 21. В данном способе для нагрузочного вещества конъюгата известно, что оно оказывает положительный эффект или обладает аффинностью к мишени, связанной с заболеванием, при введении пациенту с определенным заболеванием или болезненным состоянием. В одном варианте реализации изобретения нагрузочное вещество(а) композиции опосредует ее терапевтический эффект через общие биологические реакции. В вышеприведенных вариантах реализации, которые описаны в этом параграфе, данный способ применим для облегчения или предотвращения заболевания, выбранного из рака, заместительной терапии рака, кардиоваскулярных заболеваний, заболеваний центральной нервной системы, эндокринных заболеваний, заболеваний желудочно-кишечного тракта, урогенитальных заболеваний, гематологических заболеваний, ВИЧ-инфекции, заболеваний гормональной системы, воспалений, аутоиммунных заболеваний, инфекционных заболеваний, нарушений обмена веществ, скелетно-мышечных нарушений, нефрологических нарушений, офтальмологических заболеваний, боли и респираторных заболеваний. С большей долей определенности, заболевание выбрано из Таблицы 16.

[00410] В некоторых вариантах реализации способа лечения конъюгационную композицию можно вводить подкожно, внутримышечно или внутривенно. В одном варианте реализации изобретения композицию вводят в терапевтически эффективном количестве. В одном варианте реализации изобретения введение двух или более последовательных доз терапевтически эффективного количества препарата приводит к выигрышу во времени, проведенном в пределах терапевтического окна для данной композиции, по сравнению с нагрузочным веществом, не соединенным с XTEN и вводимым пациенту в сравнимых дозах. Выигрыш во времени, проведенном в пределах терапевтического окна, может по меньшей мере трехкратно

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

[00411] В одном варианте реализации способа лечения нуждающемуся в этом пациенту вводят меньшее количество (в моль/кг) конъюгата или фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, которое является приблизительно в два раза меньшим, или в три раза меньшим, или приблизительно в четыре раза меньшим, или приблизительно в пять раз меньшим, или приблизительно в шесть раз меньшим, или приблизительно в восемь раз меньшим, или приблизительно в 10 раз меньшим или еще более меньшим по сравнению с соответствующим нагрузочным веществом(ами), не соединенным с XTEN, в режиме дозирования, необходимом для поддержания терапевтического эффекта, и конъюгат при этом характеризуется площадью под кривой, сравнимой с соответствующим количеством (в моль/кг) нагрузочного вещества(в), не соединенного с XTEN, необходимого для поддержания терапевтического эффекта. В другом варианте реализации изобретения для конъюгата или фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, требуется менее частое введение в ходе стандартного лечения пациента, при этом дозу конъюгата или фармацевтической композиции вводят пациенту приблизительно каждые четыре дня, приблизительно каждые семь дней, приблизительно каждые 10 дней, приблизительно каждые 14 дней, приблизительно каждые 21 день или приблизительно раз в месяц, а конъюгат при этом характеризуется площадью под кривой, сравнимой с соответствующим нагрузочным веществом(ами), не соединенным с XTEN и вводимым пациенту. В других вариантах реализации изобретения пациенту вводят количество конъюгата, в совокупности составляющее приблизительно на 5%, или приблизительно на 10%, или приблизительно на 20%, или приблизительно на 40%, или приблизительно на 50%, или приблизительно на 60%, или приблизительно на 70%, или приблизительно на 80%, или приблизительно на 90% меньше (в моль/кг) по сравнению с соответствующим количеством нагрузочного вещества(в), не соединенного с XTEN, в режиме дозирования, необходимом для поддержания эффективной концентрации в крови, при этом конъюгат характеризуется площадью под кривой, по меньшей мере сравнимой с соответствующим нагрузочным веществом(ами), не соединенным с XTEN. В совокупности меньшее количество является мерой, приходящейся на период, составляющий по меньшей мере около одной недели, или около 14 дней, или около 21 дня, или около месяца. В некоторых вариантах реализации способа терапевтический эффект является определяемым параметром, клиническим симптомом или конечным результатом, который, как известно в данной области,

связан с первопричиной заболевания пациента, которому следует провести лечение или профилактику.

[00412] В одном варианте реализации в изобретении предложен способ лечения раковой клетки in vitro, включающий введение в культуру раковых клеток композиции, содержащей эффективное количество композиции XTEN-нагрузочное вещество, в которой первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, а второе нагрузочное вещество является токсином из Таблицы 21. В другом варианте реализации в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество композиции XTEN-нагрузочное вещество, в которой первое нагрузочное вещество является нацеленным компонентом, а второе нагрузочное вещество является токсином из Таблицы 21. В одном варианте реализации данного способа фармацевтическая композиция содержит композицию, имеющую структуру, приведенную на ФИГ. 117. В другом варианте реализации данного способа рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких или мезотелиомы, рака яичников, устойчивого к лечению препаратами платины, рака эндометрия, аденокарциномы легких и трудно поддающихся лечению опухолей на поздних стадиях. В другом варианте реализации данного способа введение препарата приводит к по меньшей мере 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 90% улучшению по меньшей мере одного, двух или трех параметров, связанных с раком, по сравнению с пациентом, для которого не проводили лечение, при этом параметры выбраны из группы, состоящей из уровня ответа, определяемого по критериям оценки ответа при солидных опухолях (RECIST), времени до прогрессирования рака (рецидива), обнаружения местного рецидива, обнаружения регионарного метастаза, обнаружения отдаленного метастаза, появления симптомов, госпитализации, увеличения необходимости в обезболивающих средствах, необходимости в резервной химиотерапии, необходимости в хирургическом вмешательстве по жизненным показаниям, необходимости в резервной радиотерапии, времени до констатации отсутствия эффекта терапии и увеличения времени жизни.

[00413] В другом аспекте реализации в изобретении предложена схема лечения пациента с заболеванием, при этом указанная схема включает применение композиции, содержащей конъюгат из любого из описанных в данном тексте вариантов реализации. В одном варианте реализации данная схема дополнительно включает этап определения количества фармацевтической композиции, содержащей CFXTEN, которое необходимо для достижения терапевтического эффекта у пациента.

[00414] В изобретении предложены конъюгаты, включенные в схему лечения пациентов с заболеванием, включающую введение фармацевтической композиции, содержащей конъюгат

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

VII). НАБОРЫ ДЛЯ КОНЪЮГАЦИИ

[00415] В другом аспекте реализации в изобретении предложен набор, который облегчает применение конъюгационных композиций XTEN-кросс-линкер. В одном варианте реализации изобретения данный набор содержит XTEN-кросс-линкер в составе препарата, контейнер и этикетку на контейнере или имеющую отношение к контейнеру. В вышеприведенном варианте реализации XTEN-кросс-линкер может принадлежать любому из описанных в данном тексте вариантов реализации. XTEN-кросс-линкер находится в контейнере в определенной концентрации в буфере, подходящем для применения в реакции конъюгации для соединения с нагрузочным веществом.

VIII). ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАБОРЫ

[00416] В другом аспекте реализации в изобретении предложен набор, который облегчает применение конъюгационных композиций. Данный набор содержит предлагаемую в данном изобретении фармацевтическую композицию, контейнер и этикетку или вкладыш на контейнере или имеющие отношение к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д., изготовленные из разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит фармацевтическую композицию в виде препарата, который является эффективным для лечения пациента, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет или флакон для внутривенного раствора, содержащий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). На вкладыше могут быть перечислены утвержденные показания для лекарственного вещества, инструкции по растворению и/или введению лекарственного вещества для применения в рамках утвержденных показаний, соответствующие дозировки и информация по безопасности, а также информация, указывающая номер партии и срок годности лекарственного вещества. В другом варианте реализации вышесказанного набор может содержать второй контейнер, в котором находится подходящий растворитель для фармацевтической композиции, применение которого обеспечит соответствующую концентрацию препарата для введения пациенту. В другом варианте реализации набор содержит по меньшей мере в первом контейнере: лекарственное вещество конъюгационной композиции в количестве, достаточном для введения при лечении пациента с заболеванием; некоторое количество фармацевтически приемлемого носителя; второй контейнер, в котором может находиться подходящий растворитель для указанной композиции, который обеспечит соответствующую концентрацию фармацевтической композиции для введения пациенту;

вместе с этикеткой, на которой указаны название лекарственного вещества, а также условия хранения и обращения с ним, и/или листок с утвержденными показаниями для лекарственного вещества и инструкциями по растворению и/или введению лекарственного вещества для применения в рамках утвержденных показаний, соответствующими дозировками и информацией по безопасности, а также информацией, указывающей номер партии и срок годности лекарственного вещества.

IX). НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ЯВЛЯЮЩИЕСЯ ОБЪЕКТАМИ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00417] В настоящем изобретении предложены выделенные полинуклеиновые кислоты, кодирующие полипептидные компоненты конъюгатов, и последовательности, комплементарные к молекулам полинуклеиновых кислот, кодирующие полипептидные компоненты конъюгатов. В некоторых вариантах реализации в изобретении предложены полинуклеиновые кислоты, кодирующие XTEN из любого описанного в данном тексте варианта реализации конъюгатов, либо комплементы полинуклеиновых кислот. В одном варианте реализации изобретения полинуклеиновые кислоты кодируют XTEN, выбранный из группы, состоящей их XTEN, приведенных в Таблицах 2 и 3, либо комплементы полинуклеиновых кислот.

[00418] В других вариантах реализации в изобретении предложены полинуклеиновые кислоты, кодирующие XTEN, соединенные с последовательностями расщепления, аффинными маркерами и белками вспомогательных последовательностей из любых описанных в данном тексте вариантов реализации, либо комплементы полинуклеиновых кислот. В одном варианте реализации изобретения полинуклеиновые кислоты кодируют нагрузочный белок, выбранный из группы, состоящей из нагрузочных белков, приведенных в Таблицах 7, 18, 19 и 21, либо комплементы полинуклеиновых кислот.

[00419] В одном варианте реализации изобретение включает в себя способы получения полинуклеиновых кислот, кодирующих XTEN и XTEN, соединенные с расщепляемыми последовательностями, аффинными маркерами и белками вспомогательных последовательностей, или последовательности, комплементарные полинуклеиновым кислотам, включая их гомологичные варианты. В общем случае и как проиллюстрировано на ФИГ. 38 и 39, способы получения полинуклеиновых кислот, кодирующих XTEN и экспрессирующих конечный генный продукт, включают сборку нуклеотидов, кодирующих XTEN, лигирование компонентов в рамку, инкорпорацию кодирующего гена в экспрессионный вектор, подходящий для клетки-хозяина, трансформацию клетки-хозяина при помощи экспрессионного вектора и культивирование клетки-хозяина в условиях, которые стимулируют или способствуют экспрессии XTEN в трансформированной клетке-хозяине, что дает возможность получить

полипептид XTEN, который выделяют описанными в данном тексте методами или стандартными методами очистки белка, известными в данной области. Для получения полинуклеотидов и экспрессионных векторов, являющихся объектами настоящего изобретения, применяют стандартные рекомбинантные технологии молекулярной биологии.

[00420] В соответствии с изобретением, нуклеотидные последовательности, которые кодируют XTEN и XTEN, соединенные с последовательностями расщепления, аффинными маркерами и белками вспомогательных последовательностей (либо их комплементы), применяют для создания рекомбинантных молекул ДНК, которые управляют экспрессией в подходящих клетках-хозяевах. Для осуществления настоящего изобретения подходят несколько технологий клонирования, многие из которых применяются для создания конструкции, которая содержит ген, кодирующий композицию XTEN или нагрузочных веществ, являющихся объектами настоящего изобретения, либо их комплемент. В одном варианте реализации такая технология клонирования используется для того, чтобы создать ген, который кодирует XTEN, который содержит нуклеотиды, кодирующие XTEN, который используется для трансформации клетки-хозяина для экспрессии композиции XTEN. В приведенных выше в данном параграфе вариантах реализации, указанные гены могут дополнительно содержать нуклеотиды, кодирующие расщепляемые последовательности, аффинные маркеры и вспомогательные последовательности. В другом варианте реализации такая технология клонирования используется для того, чтобы создать ген, который кодирует нагрузочный белок, который содержит нуклеотиды, кодирующие нагрузочное вещество, которое используется для трансформации клетки-хозяина для экспрессии композиции нагрузочного вещества.

[00421] При конструировании необходимых последовательностей XTEN было обнаружено, что, несмотря на использование подхода молекулярного конструирования “блочного типа” в создании кодирующих XTEN последовательностей, можно получить неповторяющиеся структуры композиций XTEN, являющихся объектами данного изобретения. Это было достигнуто при помощи библиотеки полинуклеотидов, кодирующих мотивы из пептидных последовательностей, которые описаны выше и которые затем лигируются и/или мультимеризуются для создания генов, кодирующих последовательности XTEN (смотрите ФИГ. 38 и 39 и Примеры). Таким образом, из-за того, что XTEN экспрессируемого полипептида может содержать множественные единицы только четырех различных мотивов последовательности, так как мотивы сами по себе состоят из неповторяющихся аминокислотных последовательностей, полная последовательность XTEN получается неповторяющейся. Соответственно, в одном варианте реализации изобретения, полинуклеотиды, кодирующие XTEN, содержат множественные полинуклеотиды, которые

кодируют неповторяющиеся последовательности, или мотивы, функционально связанные в рамке, и для которых результирующие экспрессируемые аминокислотные последовательности XTEN являются неповторяющимися.

[00422] В одном из подходов сначала готовят конструкцию, содержащую последовательность ДНК, соответствующую XTEN. Примеры способов получения таких конструкций описаны в Примерах. Затем конструкцию используют для создания экспрессионного вектора, подходящего для трансформации клетки-хозяина, такой как прокариотическая клетка-хозяин (например, E. coli), для экспрессии и выделения XTEN. Примеры способов создания экспрессионных векторов, трансформации клеток-хозяев и экспрессии и выделения XTEN описаны в Примерах.

[00423] Ген, кодирующий XTEN, можно получить в один или несколько этапов, как полностью искусственно, так и при помощи синтеза в комбинации с ферментативными процессами, например, клонирования, опосредованного рестрикционными ферментами и ПЦР с перекрывающимися праймерами, включая способы, более полно описанные в Примерах. Способы, раскрытые в данном тексте, можно применять, например, для того, чтобы лигировать короткие последовательности полинуклеотидов, кодирующих XTEN, в более длинные гены XTEN, обладающие необходимой длиной и последовательностью. В одном варианте реализации изобретения данным способом лигируют две, три, четыре или более кодон-оптимизированных олигонуклеотидов, кодирующих мотив XTEN или сегмент последовательности длиной от около 9 до 14 аминокислот, или от около 12 до 20 аминокислот, или от около 18 до 36 аминокислот, или от около 48 до около 144 аминокислот, или от около 144 до около 288 или более аминокислот, либо любые комбинации вышеприведенных диапазонов длин мотивов или сегментов. В альтернативном варианте раскрываемый способ применяют для мультимеризации последовательностей, кодирующих XTEN, в более длинные последовательности необходимой длины; например, ген, кодирующий 36 аминокислот XTEN, можно димеризировать в ген, кодирующий 72 аминокислоты, затем 144, затем 288 и т.д. Даже в случае мультимеризации полипептиды XTEN можно сконструировать так, чтобы кодирующий XTEN ген обладал низкой или фактически отсутствующей повторяемостью в конструкции кодонов, выбранных в качестве мотивов для наиболее коротких используемых единиц, что может снизить рекомбинацию и повысить стабильность кодирующего гена в трансформированном хозяйском организме. Гены, кодирующие XTEN с неповторяющимися последовательностями, собирают из олигонуклеотидов при помощи стандартных технологий или генного синтеза. Конструкцию гена можно подобрать при помощи алгоритмов, которые оптимизируют использование кодонов и аминокислотный состав. В одном из способов данного изобретения создают, а затем собирают библиотеку относительно коротких кодирующих XTEN

полинуклеотидных конструкций, как описано выше. Полученные в результате гены затем совмещают с генами, кодирующими нагрузочный пептид или полипептид, а результирующие гены применяют для трансформации клетки-хозяина и получения и выделения конъюгата XTEN-нагрузочное вещество для того, чтобы оценить его свойства, как описано в данном тексте.

[00424] Полученные в результате полинуклеотиды, кодирующие XTEN и пептидные последовательности, к которым он присоединен, затем могут быть отдельно клонированы в экспрессионные векторы. Нуклеотидную последовательность можно вносить в вектор при помощи большого количества разных способов. В общем случае ДНК вносят в подходящий участок(ки) расщепления рестрикционными эндонуклеазами при помощи известных в данной области методов. Векторные компоненты в общем случае включают, но не ограничиваются этим, одну или более сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. В конструировании подходящих векторов, содержащих один или более из этих компонентов, используются стандартные методы лигирования, которые известны специалисту в данной области. Такие методы хорошо известны в данной области и детально описаны в научной литературе и патентах. Большое количество векторов являются общедоступными. Векторы могут, например, быть в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага, которые удобно подвергать процедурам рекомбинантных ДНК-технологий, а выбор вектора часто зависит от клетки-хозяина, в которую его необходимо внести. Таким образом, вектор может являться автономно реплицирующимся вектором, т.е., вектором, который существует в виде экстрахромосомного компонента, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например, плазмидой. В альтернативном варианте вектор может являться таким, который при внесении в клетку-хозяина интегрируется в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он интегрировался. Типичные плазмиды проиллюстрированы на ФИГ. 17 вместе с изображениями кодирующих областей для разных конфигураций компонентов ФVIII и XTEN.

[00425] В изобретении предложено применение плазмидных экспрессионных векторов, содержащих репликационные и контрольные последовательности, которые совместимы и распознаются клеткой-хозяином, и являются функционально связанными с геном, кодирующим полипептид для контролируемой экспрессии полипептида. Как правило, вектор содержит участок репликации, а также последовательности, которые кодируют белки, способные обеспечить фенотипическую селекцию в трансформированной клетке. Существование таких векторных последовательностей хорошо известно для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Подходящие для применения экспрессионные векторы включают, например, сегменты

хромосомных, внехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Термин “экспрессионный вектор” относится к конструкции ДНК, содержащей последовательность ДНК, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию ДНК, кодирующей полипептид, в подходящей клетке-хозяине. Требования к векторам заключаются в их способности реплицироваться и жизнеспособности в выбранной клетке-хозяине. При необходимости можно использовать небольшое либо большое число векторных копий.

[00426] Подходящие векторы включают, но не ограничиваются этим, производные SV40 и пкДНК и известные бактериальные плазмиды, такие как col EI, pCRl, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, как описано у Smith, et al., Gene 57:31-40 (1988), pMB9 и его производные, плазмиды, такие как RP4, фаговые ДНК, такие как многочисленные производные фага I, такие как NM98 9, а также другие фаговые ДНК, такие как M13 и филаментные одноцепочечные фаговые ДНК; дрожжевые плазмиды, такие как 2-микронные плазмиды или производные 2-мкм плазмид, а также центромерные и интегративные дрожжевые шаттл-векторы; векторы, подходящие для эукариотических клеток, такие как векторы, применяемые в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, такие как плазмиды, которые были модифицированы так, чтобы содержать фаговую ДНК или экспрессионные контрольные последовательности; и тому подобное. Дрожжевые экспрессионные системы, которые также можно применять в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, негибридный вектор pYES2 (Invitrogen), гибридные pYESHisA, B, C (Invitrogen), векторы pRS и тому подобные. Контрольные последовательности вектора содержат промотор для инициации транскрипции, произвольную операторную последовательность для управления такой транскрипцией, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосомы мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Промотор может представлять собой любую последовательность ДНК, которая проявляет транскрипционную активность в клетке-хозяине, и может быть получена из генов, кодирующих белки, гомологичные или гетерологичные клетке-хозяину. Промоторы, подходящие для применения в экспрессионных векторах для прокариотических клеток, включают промоторные системы β-лактамазы и лактозы [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], щелочную фосфатазу, промоторную систему триптофана (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776] гибридные промоторы, такие как промотор tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)], все функционально связанные с ДНК, кодирующей полипептилы CFXTEN. Промоторы для применения в бактериальных системах могут также содержать

последовательность Шайна-Дальгарно (Ш.Д.), функционально связанную с ДНК, кодирующей полипептилы CFXTEN.

ПРИМЕРЫ

[00427] Пример 1: Конструирование сегментов мотива XTEN_AD36

[00428] Следующий пример описывает конструирование набора кодон-оптимизированных генов, кодирующих последовательности мотива из 36 аминокислот. На первом этапе на основе вектора pET конструировали спейсерный вектор pCW0359, который содержит промотор T7. pCW0359 кодирует целлюлозосвязывающий домен (CBD – от англ. “cellulose binding domain”) и сайт распознавания TEV-протеазы, за которым располагается спейсерная последовательность, фланкируемая сайтами BsaI, BbsI и KpnI. Сайты BsaI и BbsI вставляли таким образом, чтобы после расщепления они могли образовывать совместимые “липкие” концы. За спейсерной последовательностью следует процессированная версия гена GFP и His-маркер. Спейсерная последовательность содержит стоп-кодоны и, таким образом, клетки E. Coli, несущие спейсерную плазмиду pCW0359, образуют нефлуоресцентные колонии. Спейсерный вектор pCW0359 расщепляли при помощи BsaI и KpnI для того, чтобы удалить спейсерный сегмент, а полученный в результате векторный фрагмент выделяли при помощи очистки в арагозном геле. Последовательности обозначали как XTEN_AD36, что отражает их принадлежность к семейству мотивов AD. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GESPGGSSGSES, GSEGSSGPGESS, GSSESGSSEGGP или GSGGEPSESGSS. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AD1for: AGGTGAATCTCCDGGTGGYTCYAGCGGTTCYGARTC
AD1rev: ACCTGAYTCRGAACCGCTRGARCCACCHGGAGATTC
AD2for: AGGTAGCGAAGGTTCTTCYGGTCCDGGYGARTCYTC
AD2rev: ACCTGARGAYTCRCCHGGACCRGAAGAACCTTCGCT
AD3for: AGGTTCYTCYGAAAGCGGTTCTTCYGARGGYGGTCC
AD3rev: ACCTGGACCRCCYTCRGAAGAACCGCTTTCRGARGA
AD4for: AGGTTCYGGTGGYGAACCDTCYGARTCTGGTAGCTC

[00429] Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при

помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0401, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN_AD36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN_AD36 имеют хорошие уровни экспрессии.

[00430] Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0401 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 39 клонов, которые содержали надлежащие сегменты XTEN_AD36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в Таблице 22.

Таблица 22: ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0401_001_GFP-N_A01.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_002_GFP-N_B01.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGP	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_003_GFP-N_C01.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCAGGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCAGGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_004_GFP-N_D01.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCTGAATCTGGTAGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_007_GFP-N_F01.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_008_GFP-N_G01.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTGAATCTCCAGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGTGAATCCTCA
LCW0401_012_GFP-N_H01.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCA
LCW0401_015_GFP-N_A02.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0401_016_ GFP-N_B02.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGT CCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGC GGTCCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAG GGCGGTCCA
LCW0401_020_ GFP-N_E02.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSSESGSSEGGP	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAA TCTTCAGGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAG GGCGGTCCA
LCW0401_022_ GFP-N_F02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGT GGTCCAGGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_024_ GFP-N_G02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGT GGTCCAGGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGT TCTGAATCA
LCW0401_026_ GFP-N_H02.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCT GAATCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGT GAATCTTCA
LCW0401_027_ GFP-N_A03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCT GAGTCAGGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_028_ GFP-N_B03.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGT CCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGC GGTCCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAA GGCGGTCCA
LCW0401_030_ GFP-N_C03.ab1	GESPGGSSGSESGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAG TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGTGAG TCCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGT GAGTCTTCA
LCW0401_031_ GFP-N_D03.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGP	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGT AGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAG GGCGGTCCA
LCW0401_033_ GFP-N_E03.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGT AGCTCAGGTTCCGGTGGTGAACCATCCGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_037_ GFP-N_F03.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSEGSSGPGESS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGC GGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGC GAGTCTTCA
LCW0401_038_ GFP-N_G03.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGTGAG TCTTCAGGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_039_ GFP-N_H03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCC GAGTCAGGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_040_ GFP-N_A04.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGP	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGT CCAGGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAATCTGGT AGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAA

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		GGTGGTCCA
LCW0401_042_ GFP-N_C04.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAGTCT TCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCC GAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGC GAGTCCTCA
LCW0401_046_ GFP-N_D04.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGT CCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGC GGTCCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAG GGTGGTCCA
LCW0401_047_ GFP-N_E04.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCC GAGTCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCCAGCGGT TCTGAGTCA
LCW0401_051_ GFP-N_F04.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGCGAG TCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGT TCTGAGTCA
LCW0401_053_ GFP-N_H04.ab1	GESPGGSSGSESGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAG TCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCC GAGTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCTAGCGGT TCTGAATCA
LCW0401_054_ GFP-N_A05.ab1	GSEGSSGPGESSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAATCT TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAA TCCTCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCTGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_059_ GFP-N_D05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAA TCTTCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGT TCCGAATCA
LCW0401_060_ GFP-N_E05.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGT GGTCCAGGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAGTCT GGTAGCTCA
LCW0401_061_ GFP-N_F05.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGT CCAGGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGT AGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGT GAATCTTCA
LCW0401_063_ GFP-N_H05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAG TCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGT GAATCTTCA
LCW0401_066_ GFP-N_B06.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGTAGC TCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGC GGTCCAGGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCT GGTAGCTCA
LCW0401_067_ GFP-N_C06.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGC TCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCC GAATCAGGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGT TCCGAATCA
LCW0401_069_ GFP-N_D06.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGESPGGSSGSES	GGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAGTCTGGTAGC TCAGGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGT AGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCCAGCGGT TCCGAATCA
LCW0401_070_	GSEGSSGPGESSGSSESG	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGCGAATCC

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
GFP-N_E06.ab1	SSEGGPGSEGSSGPGESS	TCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGT GGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGT GAATCTTCA
LCW0401_078_ GFP-N_F06.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGT CCAGGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCT GAATCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGT TCCGAGTCA
LCW0401_079_ GFP-N_G06.ab1	GSEGSSGPGESSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAGTCT TCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGCGAG TCTTCAGGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCT GGTAGCTCA

[00431] Пример 2: Конструирование сегментов XTEN_AE36

[00432] Конструировали библиотеку кодонов, кодирующих последовательности XTEN длиной в 36 аминокислот. Последовательность XTEN обозначали как XTEN_AE36. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GSPAGSPTSTEE, GSEPATSGSE TP, GTSESA TPESGP или GTSTEPSEGSAP. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AE1for: AGGTAGCCCDGCWGGYTCTCCDACYTCYACYGARGA
AE1rev: ACCTTCYTCRGTRGARGTHGGAGARCCWGCHGGGCT
AE2for: AGGTAGCGAACCKGCWACYTCYGGYTCTGARACYCC
AE2rev: ACCTGGRGTYTCAGARCCRGARGTWGCMGGTTCGCT
AE3for: AGGTACYTCTGAAAGCGCWACYCCKGARTCYGGYCC
AE3rev: ACCTGGRCCRGAYTCMGGRGTWGCGCTTTCAGARGT
AE4for: AGGTACYTCTACYGAACCKTCYGARGGYAGCGCWCC
AE4rev: ACCTGGWGCGCTRCCYTCRGAMGGTTCRGTAGARGT

[00433] Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0402, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN_AE36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN_AE36 демонстрируют хорошую экспрессию.

[00434] Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0402 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 37 клонов, которые содержали надлежащие сегменты XTEN_AE36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в Таблице 23.

Таблица 23: ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0402_002_GFP-N_A07.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_003_GFP-N_B07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_004_GFP-N_C07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCTGGCCCA
LCW0402_005_GFP-N_D07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA
LCW0402_006_GFP-N_E07.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAA
LCW0402_008_GFP-N_F07.ab1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_009_GFP-N_G07.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCA
LCW0402_011_GFP-N_A08.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_012_GFP-N_B08.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_013_GFP-N_C08.ab1	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA
LCW0402_014_GFP-N_D08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGA

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		GGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGC GCACCA
LCW0402_015_ GFP-N_E08.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTC CAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGA AGAAGGTACCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCT GGCCCA
LCW0402_016_ GFP-N_F08.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGG CCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCC GGTCCA
LCW0402_020_ GFP-N_G08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCAC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAAC CCCAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCCAACTTCTACTG AAGAA
LCW0402_023_ GFP-N_A09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAG AAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG CCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAA ACCCCA
LCW0402_024_ GFP-N_B09.ab1	GTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCC CAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGA GGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCTACT GAAGAA
LCW0402_025_ GFP-N_C09.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGG TCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_026_ GFP-N_D09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACCGAGG AAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGC TCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAA ACCCCA
LCW0402_027_ GFP-N_E09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGG AAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC ACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGC GCTCCA
LCW0402_032_ GFP-N_H09.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCGGAGTCTGG TCCAGGTAGCCCTGCAGGTTCTCCTACCTCCACTG AGGAA
LCW0402_034_ GFP-N_A10.ab1	GTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCC CAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGC TCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_036_ GFP-N_C10.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGG AAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGC TCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCTCCA
LCW0402_039_ GFP-N_E10.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTC CAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGC TCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGC GCACCA
LCW0402_040_ GFP-N_F10.ab1	GSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCC CAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGG CCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0402_041_GFP-N_G10.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_050_GFP-N_A11.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_051_GFP-N_B11.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACTTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_059_GFP-N_E11.ab1	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_060_GFP-N_F11.ab1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_061_GFP-N_G11.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCA
LCW0402_065_GFP-N_A12.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCA
LCW0402_066_GFP-N_B12.ab1	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA
LCW0402_067_GFP-N_C12.ab1	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_069_GFP-N_D12.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_073_GFP-N_F12.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCGAGGAA
LCW0402_074_GFP-N_G12.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTAGCCCAGCTGGTTCTCCAACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAATCTGGTCCA
LCW0402_075_GFP-N_H12.ab1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP	GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCA

[00435] Пример 3: Конструирование сегментов XTEN_AF36

[00436] Конструировали библиотеку кодонов, кодирующих последовательности длиной в 36 аминокислот. Последовательности обозначали как XTEN_AF36. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GSTSESPSGTAP, GTSTPESGSASP, GTSPSGESSTAP или GSTSSTAESPGP. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AF1for: AGGTTCTACYAGCGAATCYCCKTCTGGYACYGCWCC
AF1rev: ACCTGGWGCRGTRCCAGAMGGRGATTCGCTRGTAGA
AF2for: AGGTACYTCTACYCCKGAAAGCGGYTCYGCWTCTCC
AF2rev: ACCTGGAGAWGCRGARCCGCTTTCMGGRGTAGARGT
AF3for: AGGTACYTCYCCKAGCGGYGAATCTTCTACYGCWCC
AF3rev: ACCTGGWGCRGTAGAAGATTCRCCGCTMGGRGARGT
AF4for: AGGTTCYACYAGCTCTACYGCWGAATCTCCKGGYCC
AF4rev: ACCTGGRCCMGGAGATTCWGCRGTAGAGCTRGTRGA

[00437] Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0403, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN_AF36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN_AF36 демонстрируют хорошую экспрессию.

[00438] Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0403 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 44 клона, которые содержали надлежащие сегменты XTEN_AF36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в Таблице 24.

Таблица 24: ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0403_004_ GFP-N_A01.ab1	GTSTPESGSASPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		CAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCT CCA
LCW0403_005_ GFP-N_B01.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAP	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACC AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCC CAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCT CCA
LCW0403_006_ GFP-N_C01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCC AGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC CAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGCTTCT CCA
LCW0403_007_ GFP-N_D01.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGT CCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGC ACCA
LCW0403_008_ GFP-N_E01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTC CAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCT CCA
LCW0403_010_ GFP-N_F01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCC AGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCT CCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGC ACCA
LCW0403_011_ GFP-N_G01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCT CCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATC TCCA
LCW0403_012_ GFP-N_H01.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCC AGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCA CCA
LCW0403_013_ GFP-N_A02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCC CAGGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGT CCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC TCCA
LCW0403_014_ GFP-N_B02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGCTCTGCATCTC CAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGC ACCA
LCW0403_015_ GFP-N_C02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCC AGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTC CAGGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGC ACCA
LCW0403_017_ GFP-N_D02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCA CCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGG TCCA
LCW0403_018_ GFP-N_E02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTC CAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGT CCA
LCW0403_019_ GFP-N_F02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSST AESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCC CAGGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGT CCA

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0403_023_GFP-N_H02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGTACTGCACCA
LCW0403_024_GFP-N_A03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_025_GFP-N_B03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_028_GFP-N_D03.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA
LCW0403_029_GFP-N_E03.ab1	GTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGP	GGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_030_GFP-N_F03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_031_GFP-N_G03.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP	GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_033_GFP-N_H03.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCACCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_035_GFP-N_A04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCA
LCW0403_036_GFP-N_B04.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_039_GFP-N_C04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_041_GFP-N_D04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_044_GFP-N_E04.ab1	GTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCA
LCW0403_046_GFP-N_F04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCGAGCGGCGAATCTTCTACTGCT

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		CCA
LCW0403_047_ GFP-N_G04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGC CCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGC TCCA
LCW0403_049_ GFP-N_H04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTC CAGGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCATCT CCA
LCW0403_051_ GFP-N_A05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCC AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCT CCA
LCW0403_053_ GFP-N_B05.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACC AGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTC CAGGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGG TCCA
LCW0403_054_ GFP-N_C05.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCC AGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC CAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGG TCCA
LCW0403_057_ GFP-N_D05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCA CCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGC ACCA
LCW0403_058_ GFP-N_E05.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACC AGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCA CCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTC TCCA
LCW0403_060_ GFP-N_F05.ab1	GTSTPESGSASPGSTSESP SGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCC AGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCA CCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGG CCCA
LCW0403_063_ GFP-N_G05.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCC AGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTC CAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCT CCA
LCW0403_064_ GFP-N_H05.ab1	GTSPSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCC AGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTC CAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCA CCA
LCW0403_065_ GFP-N_A06.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPE SGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC AGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTC CAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGC ACCA
LCW0403_066_ GFP-N_B06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCTCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTC CAGGTACTTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCT CCA
LCW0403_067_ GFP-N_C06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCC AGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTC CAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGT CCA
LCW0403_068_	GSTSSTAESPGPGSTSST	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
GFP-N_D06.ab1	AESPGPGSTSESPSGTAP	AGGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCC CAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGC ACCA
LCW0403_069_ GFP-N_E06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACC AGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCTGCTTCTC CAGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCATC TCCA
LCW0403_070_ GFP-N_F06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCC AGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTC CAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCT CCA

[00439] Пример 4: Конструирование сегментов XTEN_AG36

[00440] Конструировали библиотеку кодонов, кодирующих последовательности длиной в 36 аминокислот. Последовательности обозначали как XTEN_AG36. Ее сегменты содержат аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой 12-мерный пептид с последовательностями: GTPGSGTASSSP, GSSTPSGATGSP, GSSPSASTGTGP или GASPGTSSTGSP. Вставку проводили путем отжига следующих пар фосфорилированных синтетических пар олигонуклеотидов:

AG1for: AGGTACYCCKGGYAGCGGTACYGCWTCTTCYTCTCC
AG1rev: ACCTGGAGARGAAGAWGCRGTACCGCTRCCMGGRGT
AG2for: AGGTAGCTCTACYCCKTCTGGTGCWACYGGYTCYCC
AG2rev: ACCTGGRGARCCRGTWGCACCAGAMGGRGTAGAGCT
AG3for: AGGTTCTAGCCCKTCTGCWTCYACYGGTACYGGYCC
AG3rev: ACCTGGRCCRGTACCRGTRGAWGCAGAMGGGCTAGA
AG4for: AGGTGCWTCYCCKGGYACYAGCTCTACYGGTTCTCC
AG4rev: ACCTGGAGAACCRGTAGAGCTRGTRCCMGGRGAWGC

[00441] Также проводили отжиг фосфорилированного олигонуклеотида 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC и нефосфорилированного олигонуклеотида pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA. Отожженные пары олигонуклеотидов лигировали, что приводило к образованию смеси из продуктов разной длины, которые представляют разное количество 12-мерных повторов, лигированных к одному сегменту BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, выделяли из смеси при помощи препаративного электрофореза в агарозном геле и лигировали в расщепленный BsaI/KpnI спейсерный вектор pCW0359. Большинство клонов полученной в результате библиотеки, обозначенных как LCW0404, после индукции демонстрировали зеленую флуоресценцию, что указывает на то, что последовательность XTEN_AG36 была лигирована в рамке вместе с геном GFP и что большинство последовательностей XTEN_AG36 демонстрируют хорошую экспрессию.

[00442] Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0404 на предмет высокого уровня флуоресценции путем отпечатывания их на агарном планшете, содержащем ИПТГ. Те же самые изоляты оценивали при помощи ПЦР и определяли 48 изолятов, которые содержали сегменты из 36 аминокислот и демонстрировали высокую флуоресценцию. Эти изоляты секвенировали и определяли 44 клона, которые содержали надлежащие сегменты XTEN_AG36. Названия файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций для этих сегментов приведены в Таблице 25.

Таблица 25: ДНК- и аминокислотные последовательности для 36-мерных мотивов

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0404_001_GFP-N_A07.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_003_GFP-N_B07.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_006_GFP-N_C07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_007_GFP-N_D07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTGCATCCCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_009_GFP-N_E07.ab1	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSRPSASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCCCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGACCTTCTGCATCCACCGGTACTGGTCCA
LCW0404_011_GFP-N_F07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_012_GFP-N_G07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA
LCW0404_014_GFP-N_H07.ab1	GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_015_GFP-N_A08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_016_GFP-N_B08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_017_GFP-N_C08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCC

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		CAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_018_ GFP-N_D08.ab1	GTPGSGTASSSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACCGGTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_023_ GFP-N_F08.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCC CAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCT CCA
LCW0404_025_ GFP-N_G08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCC CAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_029_ GFP-N_A09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTC CAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCTACCGGTACCGGC CCA
LCW0404_030_ GFP-N_B09.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCC AGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCT CCAGGTACTCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTC TCCA
LCW0404_031_ GFP-N_C09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACCCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_034_ GFP-N_D09.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCC CCAGGTGCATCCCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTC TCCA
LCW0404_035_ GFP-N_E09.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTTCTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCT CCA
LCW0404_036_ GFP-N_F09.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSP	GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCC CAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCT CCA
LCW0404_037_ GFP-N_G09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTC CAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCT CCA
LCW0404_040_ GFP-N_H09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_041_ GFP-N_A10.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSP	GGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGTTCTC CAGGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCATCTTCTTCT CCA
LCW0404_043_ GFP-N_C10.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCC AGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCT CCA

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0404_045_ GFP-N_D10.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGP	GGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACTGGTC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGTACTGGT CCA
LCW0404_047_ GFP-N_F10.ab1	GTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCC AGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_048_ GFP-N_G10.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCC AGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_049_ GFP-N_H10.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCC AGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTC CAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCT CCA
LCW0404_050_ GFP-N_A11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTC CAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_051_ GFP-N_B11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCC CAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGCTCT CCA
LCW0404_052_ GFP-N_C11.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTACTCCTGGCAGCGGTACTGCATCTTCCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_053_ GFP-N_D11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCC AGGTTCTAGCCCGTCTGCATCCACTGGTACCGGTC CAGGTGCTTCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_057_ GFP-N_E11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGP	GGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTC CAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACTGGT CCA
LCW0404_060_ GFP-N_F11.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCC CAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCT CCA
LCW0404_062_ GFP-N_G11.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCC AGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTC CAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCC CCA
LCW0404_066_ GFP-N_H11.ab1	GSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCC AGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTC CAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACTGGTTCT CCA
LCW0404_067_ GFP-N_A12.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSNPSASTGTGP	GGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCC AGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTTCTAACCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGC CCA
LCW0404_068_ GFP-N_B12.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCC AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTC CAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCT

Название файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
		CCA
LCW0404_069_GFP-N_C12.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCATCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_070_GFP-N_D12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_073_GFP-N_E12.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCTGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_075_GFP-N_F12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCTACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_080_GFP-N_G12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACTGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_081_GFP-N_H12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCA

[00443] **Пример 5: Конструирование XTEN_AE864**

[00444] XTEN_AE864 конструировали путем последовательной димеризации XTEN_AE36 в AE72, 144, 288, 576 и 864. Набор сегментов XTEN_AE72 конструировали из 37 разных сегментов XTEN_AE36. Культуры E. Coli, содержащие все 37 разных 36-аминокислотных сегментов, смешивали и выделяли плазмиду. Пул плазмид расщепляли при помощи BsaI/NcoI для образования небольшого фрагмента для вставки. Тот же самый пул плазмид расщепляли при помощи BbsI/NcoI для получения крупного фрагмента для вектора. Вставочный и векторный фрагменты лигировали, что приводило к удвоению длины, а лигационную смесь трансформировали в клетки BL21Gold(DE3) для того, чтобы получить колонии XTEN_AE72.

[00445] Данную библиотеку сегментов XTEN_AE72 обозначали как LCW0406. Все клоны из LCW0406 снова комбинировали и димеризовали при помощи того же процесса, который описан выше, чтобы получить библиотеку LCW0410 из XTEN_AE144. Все клоны из LCW0410 снова комбинировали и димеризовали при помощи того же процесса, который описан выше, чтобы получить библиотеку LCW0414 из XTEN_AE288. Из библиотеки случайным способом выбирали два изолята LCW0414.001 и LCW0414.002 и секвенировали их, чтобы подтвердить их идентичность. Все клоны из LCW0414 снова комбинировали и димеризовали при помощи того же процесса, который описан выше, чтобы получить библиотеку LCW0418 из XTEN_AE576. Проводили скрининг 96 изолятов из библиотеки LCW0418 на предмет высокого уровня

флуоресценции GFP. Секвенировали 8 изолятов со вставками надлежащих размеров согласно данным ПЦР и высокой флуоресценцией и отбирали на будущее 2 изолята (LCW0418.018 и LCW0418.052) на основе данных секвенирования и экспрессии.

[00446] Конструировали отдельный клон pCW0432 XTEN_AE864 путем комбинирования LCW0418.018 XTEN_AE576 и LCW0414.002 XTEN_AE288 при помощи того же димеризационного процесса, который описан выше.

[00447] Пример 6: Конструирование XTEN_AG864

[00448] Используя несколько последовательных этапов димеризации создавали набор последовательностей XTEN_AG864, начиная с сегментов XTEN_AD36, приведенных в Примере 1. Эти последовательности создавали так, как описано в Примере 3. Проводили оценку нескольких изолятов XTEN_AG864 для которых было обнаружено, что они характеризуются хорошей экспрессией и превосходной растворимостью в физиологических условиях. Полноразмерный клон XTEN_AG864 обладает превосходной растворимостью и демонстрирует период полувыведения, превышающий 60 ч для яванских макак.

[00449] Пример 7: Конструирование CBD-XTEN-Cys, цистеин-сконструированного XTEN

[00450] Участок цистеина (CysIsland), кодирующий аминокислотную последовательность GGSPAGSCTSP, содержащую один цистеин, посредством отжига олиго вносили в вектор CBD-спейсер-GFP для получения CBD-CysIsland-GFP, где CysIsland фланкируется рестрикционными сайтами BsaI и BbsI. Вектор CBD-спейсер-GFP представляет собой производное pET30 от Novagen с сайтом узнавания TEV-протеазы между CBD и спейсером. Конструкции предварительно создавали путем замещения спейсера в векторе CBD-спейсер-GFP генами, кодирующими XTEN_AE288 и XTEN_AE576. Плазмиду CBD-XTEN_AE288-GFP расщепляли при помощи BsaI/NcoI для образования небольшого фрагмента для вставки. Плазмиду CBD-CysIsland-GFP расщепляли при помощи BbsI/NcoI для получения крупного фрагмента для вектора. Вставочный и векторный фрагменты лигировали, а лигационную смесь электропорировали в клетки BL21-Gold (DE3) для того, чтобы получить трансформанты CBD-CysIsland-XTEN_AE288-GFP. Аналогично, плазмиду CBD-CysIsland-XTEN_AE288-GFP расщепляли при помощи BsaI/NcoI для образования небольшого фрагмента для вставки. Плазмиду CBD-XTEN_AE576-GFP расщепляли при помощи BbsI/NcoI для получения крупного фрагмента для вектора. Вставочный и векторный фрагменты лигировали, а лигационную смесь электропорировали в клетки BL21-Gold (DE3) для того, чтобы получить трансформанты CBD-XTEN_AE576-CysIsland-XTEN_AE288-GFP. Наконец, плазмиду CBD-XTEN_AE576-CysIsland-XTEN_AE288-GFP расщепляли при помощи BbsI/HindIII для того, чтобы удалить GFP, и лигировали с отожженными олиго для стоп-кодона, а лигационную смесь электропорировали в

клетки BL21-Gold (DE3) для того, чтобы получить трансформанты CBD-XTEN_AE576-CysIsland-XTEN_AE288, которые содержат ДНК и кодируемые аминокислотные последовательности, которые приведены в Таблице 26. Можно создавать дополнительные конструкции с цистеинами, вставленными в различные участки последовательности XTEN, при помощи выбора подходящих для данных участков рестрикционных сайтов, включая множественные вставки. Данный способ также можно использовать для создания лизин-сконструированного XTEN при помощи замещения в олигонуклеотидах кодонов, которые кодируют цистеин, кодонами, кодирующими лизин.

Таблица 26: ДНК- и аминокислотные последовательности для Cys-сконструированного XTEN

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
CBD-TEV-AE576-CysIsland-AE288	ATGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGA	MANTPVSGNLKVEFY
	ATTCTACAACAGCAATCCTTCAGATACTACTAACTCAAT	NSNPSDTTNSINPQFK
	CAATCCTCAGTTCAAGGTTACTAATACCGGAAGCAGTG	VTNTGSSAIDLSKLTL
	CAATTGATTTGTCCAAACTCACATTGAGATATTATTATA	RYYYTVDGQKDQTF
	CAGTAGACGGACAGAAAGATCAGACCTTCTGGGCTGAC	WADHAAIIGSNGSYN
	CATGCTGCAATAATCGGCAGTAACGGCAGCTACAACGG	GITSNVKGTFVKMSS
	AATTACTTCAAATGTAAAAGGAACATTTGTAAAAATGA	STNNADTYLEISFTGG
	GTTCCTCAACAAATAACGCAGACACCTACCTTGAAATC	TLEPGAHVQIQGRFA
	AGCTTTACAGGCGGAACTCTTGAACCGGGTGCACATGT	KNDWSNYTQSNDYS
	TCAGATACAAGGTAGATTTGCAAAGAATGACTGGAGTA	FKSASQFVEWDQVTA
	ACTATACACAGTCAAATGACTACTCATTCAAGTCTGCTT	YLNGVLVWGKEPGG
	CACAGTTTGTTGAATGGGATCAGGTAACAGCATACTTG	SVVGSGSGSENLYFQ
	AACGGTGTTCTTGTATGGGGTAAAGAACCCGGTGGCAG	GGSPGSPAGSPTSTEE
	TGTAGTAGGTTCAGGTTCAGGATCCGAAAATCTGTATTT	GTSESATPESGPGTST
	TCAGGGTGGGTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTA	EPSEGSAPGSPAGSPT
	CCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCT	STEEGTSTEPSEGSAP
	GAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGG	GTSTEPSEGSAPGTSE
	TAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCA	SATPESGPGSEPATSG
	CTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGC	SETPGSEPATSGSETP
	GCACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC	GSPAGSPTSTEEGTSE
	TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCC	SATPESGPGTSTEPSE
	CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA	GSAPGTSTEPSEGSAP
	GGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGG	GSPAGSPTSTEEGTST
	TAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTA	EPSEGSAPGTSTEPSE
	CTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTACC	GSAPGTSESATPESGP
	TCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTC	GTSTEPSEGSAPGTSE
	TACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCCAG	SATPESGPGSEPATSG
	CAGGTTCTCCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACC	SETPGTSTEPSEGSAP
	GAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGA	GTSTEPSEGSAPGTSE
	ACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCG	SATPESGPGTSESATP
	CTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCG	ESGPGSPAGSPTSTEE
	TCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAAC	GTSESATPESGPGSEP
	CCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTG	ATSGSETPGTSESATP
	GCTCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAA	ESGPGTSTEPSEGSAP
	GGTAGCGCACCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGG	GTSTEPSEGSAPGTST
	TAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAAT	EPSEGSAPGTSTEPSE
	CCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC	GSAPGTSTEPSEGSAP
	GGCCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGA	GTSTEPSEGSAPGSPA
	AGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCC	GSPTSTEEGTSTEPSE
	CAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA	GSAPGTSESATPESGP

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGG TACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTA CTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACT TCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTC TACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTA CCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACC GAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCCCAGCAG GTTCTCCTACCTCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAA CCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGC AACTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCT CCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCTGGTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGG CTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTG AATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC CGGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCG AGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCTACTGAA GAAGGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGA AGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAG GTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGT GGTAGCCCGGCTGGCTCTTGTACCTCTCCAGGTACCTCT GAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACC TGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAA GCGCAACCCCGGAATCTGGTCCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGC TACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTC CGAGGGCAGCGCACCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAA CCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCT GAATCCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTC TGAAACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGT CCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACC GAGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCTACTGA AGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCAC CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCAGGTA GCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGC GAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTAGCCC AGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTA CTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCAGGTACCTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC AACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCG CTACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGT CCGAGGGCAGCGCACCAGGTTAA	GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSE GSAPGGSPAGSCTSP GTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAP G

[00451] Пример 8: Конструирование Cys3-XTEN

[00452] Конструировали пару праймеров для внесения рестрикционного сайта BamHI и участка цистеина 1 из последовательности GRATAEAAGCGTAEAA в N-конец XTEN_AE432-1 и части участка цистеина 2 из последовательности TAEAAG и рестрикционного сайта BbsI в C-конец XTEN_AE432-1. Вторую пару праймеров конструировали для внесения рестрикционного сайта BsaI и части участка цистеина 2 из последовательности GCGTAEAA в N-конец

XTEN_AE432-2 и участка цистеина 4 из последовательности TAEAAGCGTAEAAR с 8xHis-маркером(H8) и рестрикционного сайта HindIII в С-конец XTEN_AE432-2. XTEN_AE432-1 содержит 1-432 аминокислотную последовательность, а XTEN_AE432-2 содержит 433-864 аминокислотную последовательность, кодируемую геном XTEN_AE864. Эти две пары праймеров применяли для амплификации, соответственно, генов XTEN_AE432-1 и XTEN_AE432-2 при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты ПЦР необходимых размеров очищали в геле и расщепляли рестрикционными ферментами BamHI/BbsI и BsaI/HindIII, соответственно, как вставки для лигирования. Целевой вектор – производное от pET30 (Novagen) – содержит CBD (целлюлозосвязывающий домен)-спейсер с фланкирующими рестрикционными сайтами BamHI и HindIII. Целевой вектор расщепляли рестрикционными ферментами BamHI/HindIII для того, чтобы удалить спейсер, и получали в виде вектора. Вектор лигировали с вышеупомянутыми расщепленным BamHI/BbsI продуктом ПЦР XTEN_AE432-1 и расщепленным BsaI/HindIII продуктом ПЦР XTEN_AE432-2. Лигационную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. Coli* штамма TOP10. Проводили скрининг трансформантов, выделяя ДНК, а нужные конструкции подтверждали путем секвенирования ДНК. Таким образом, конечная плазмида дает ген CBD-участок цистеина 1-XTEN_AE432-участок цистеина 2-XTEN_AE432-участок цистеина 3-H8, регулируемый промотором T7. Последовательности ДНК и белковые последовательности приведены в Таблице 27.

Таблица 27: ДНК- и аминокислотные последовательности Cys3-XTEN

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
CBD-Cys1-AE432-Cys2-AE432-Cys3-H8 (AC673)	ATGGCTAATACCCCAGTGAGCGGCAACCTGAAAGTG	MANTPVSGNLKVEFY
	GAATTCTACAATAGCAACCCGAGCGACACCACCAAC	NSNPSDTTNSINPQF
	AGCATTAATCCGCAGTTCAAAGTGACCAACACGGGT	KVTNTGSSAIDLSKL
	AGCTCCGCGATCGATCTGTCGAAGCTGACGCTGCGT	TLRYYYTVDGQKDQT
	TACTATTACACGGTTGACGGTCAGAAAGATCAGACG	FWADHAAIIGSNGSY
	TTCTGGGCTGACCATGCGGCCATTATTGGCAGCAAC	NGITSNVKGTFVKMS
	GGTTCCTACAACGGTATCACGAGCAATGTCAAAGGC	SSTNNADTYLEISFT
	ACTTTTGTTAAGATGAGCTCTTCGACCAACAATGCCG	GGTLEPGAHVQIQGR
	ATACCTATCTGGAGATTAGCTTCACCGGTGGTACTCT	FAKNDWSNYTQSNDY
	GGAGCCGGGTGCACACGTTCAAATCCAAGGTCGCTT	SFKSASQFVEWDQVT
	CGCAAAGAATGACTGGAGCAACTATACCCAGTCCAA	AYLNGVLVWGKEPGG
	TGACTACAGCTTCAAAAGCGCTAGCCAATTTGTTGA	SVVGSGSGSGRATAE
	ATGGGATCAGGTCACCGCATACCTGAACGGCGTGCT	AAGCGTAEAAGSPAG
	GGTCTGGGGCAAGGAACCGGGTGGTAGCGTTGTCGG	SPTSTEEGTSESATP
	TTCTGGCAGCGGATCCggtcgtGCGACGGCAGAAGCCG	ESGPGTSTEPSEGSA
	CTGGCtgcGGTACTGCTGAAGCGGCAGGTAGCCCAGC	PGSPAGSPTSTEEGT
	TGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGA	STEPSEGSAPGTSTE
	ATCCGCTACTCCAGAATCCGGTCCTGGTACTAGCACT	PSEGSAPGTSESATP
	GAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCA	ESGPGSEPATSGSET
	GGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCACC	PGSEPATSGSETPGS
	GAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACT	PAGSPTSTEEGTSES
	GAACCGTCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAA	ATPESGPGTSTEPSE
	AGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCT	GSAPGTSTEPSEGSA

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
	GCTACTTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCA	PGSPAGSPTSTEEGT
	GCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTCACCGGCG	STEPSEGSAPGTSTE
	GGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGA	PSEGSAPGTSESATP
	GTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCAC	ESGPGTSTEPSEGSA
	CGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGGTACCAGCAC	PGTSESATPESGPGS
	GGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCCGGC	EPATSGSETPGTSTE
	GGGCTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGTCCAC	PSEGSAPGTSTEPSE
	TGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCAGCA	GSAPGTSESATPESG
	CTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCG	PGTSESATPESGPGS
	AGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCA	PAGSPTSTEEGTSES
	CGGAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTG	ATPESGPGSEPATSG
	AATCTGCTACCCCAGAATCTGGCCCGGGTTCCGAGC	SETPGTSESATPESG
	CAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTACTTCCAC	PGTSTEPSEGSAPGT
	TGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTAC	STEPSEGSAPGTSTE
	TGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGA	PSEGSAPGTSTEPSE
	AAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCCAGGCACCTCTGA	GSAPGTSTEPSEGSA
	AAGCGCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGC	PGTSTEPSEGSAPGS
	AGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGA	PAGSPTSTEEGTSTE
	GTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCCTGGCTCCGAACCT	PSEGSAPTAEAAGCG
	GCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAA	TAEAAGTSESATPES
	TCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCACG	GPGSEPATSGSETPG
	GAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACT	TSESATPESGPGSEP
	GAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACG	ATSGSETPGTSESAT
	GAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCTCCACT	PESGPGTSTEPSEGS
	GAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCACG	APGTSESATPESGPG
	GAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACC	SPAGSPTSTEEGSPA
	GAACCGTCGGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCG	GSPTSTEEGSPAGSP
	GGCTCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAGCACC	TSTEEGTSESATPES
	GAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAACCGCTGAAGCC	GPGTSTEPSEGSAPG
	GCAGGTtgtGGCACTGCGGAAGCTGCAGGTACAAGCG	TSESATPESGPGSEP
	AGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGC	ATSGSETPGTSESAT
	CTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCG	PESGPGSEPATSGSE
	AATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCAGAGC	TPGTSESATPESGPG
	CGGCGACGAGCGGTTCGGAAACGCCGGGTACGTCTG	TSTEPSEGSAPGSPA
	AATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGA	GSPTSTEEGTSESAT
	CCGAACCAAGCGAAGGTTCGGCACCGGGTACTAGCG	PESGPGSEPATSGSE
	AGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCG	TPGTSESATPESGPG
	GCAGGTTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCCCT	SPAGSPTSTEEGSPA
	GCTGGTAGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCT	GSPTSTEEGTSTEPS
	GCAGGTTCCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCT	EGSAPGTSESATPES
	GAGTCCGCTACCCCAGAAAGCGGTCCTGGTACCTCC	GPGTSESATPESGPG
	ACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCT	TSESATPESGPGSEP
	GAGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCCAGGTTCTGAA	ATSGSETPGSEPATS
	CCAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTG	GSETPGSPAGSPTST
	AGTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCCTGGTTCTGAAC	EEGTSTEPSEGSAPG
	CAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCCCAGGTACCTCTG	TSTEPSEGSAPGSEP
	AGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCCTGGTACTTCCAC	ATSGSETPGTSESAT
	TGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGC	PESGPGTSTEPSEGS
	TGGTAGCCCGACCAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGA	APTAEAAGCGTAEAA
	ATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCCAGGTTCGGAGCC	RHHHHHHHH
	TGCAACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGA	
	ATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCCTGGCAGCCCTGC	
	TGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTCACCGGC	
	AGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCAC	
	GGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCG	

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
	AGAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAGC GAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCCAGGTACTTCT GAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAG CCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAA CCAGCGACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCG GCAGGCAGCCCAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAG CACGGAACCGAGCGAGGGTTCTGCCCCGGGTACTTC CACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGTAGCGA ACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAG CGAAAGCGCTACCCCAGAATCCGGTCCGGGCACTAG CACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGCACCAACTGCAGA AGCGGCTGGTtgtGGCACCGCCGAAGCAGCTcgtCATC ACCATCACCACCATCATCACTAA	

[00453] Пример 9: Конструирование Lys2-XTEN

[00454] Конструировали пару праймеров для внесения рестрикционного сайта BamHI и аминокислотной последовательности GRGSP в N-конец XTEN_AE432-1 и аминокислотной последовательности TAEAAG и рестрикционного сайта BbsI в C-конец XTEN_AE432-1. Вторую пару праймеров конструировали для внесения рестрикционного сайта BsaI и аминокислотной последовательности с инкорпорированным лизином GKPGTAEAA в N-конец XTEN_AE432-2 и аминокислотной последовательности с инкорпорированным лизином GKAT с 8xHis- маркером (H8) и рестрикционного сайта HindIII в C-конец XTEN_AE432-2. XTEN_AE432-1 содержит 1-432 аминокислотную последовательность, а XTEN_AE432-2 содержит 433-864 аминокислотную последовательность, кодируемую геном XTEN_AE864. Эти две пары праймеров применяли для амплификации, соответственно, генов XTEN_AE432-1 и XTEN_AE432-2 при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты ПЦР необходимых размеров очищали в геле и расщепляли рестрикционными ферментами BamHI/BbsI и BsaI/HindIII, соответственно, как вставки для лигирования. Целевой вектор – производное от pET30 (Novagen), содержащий CBD (целлюлозосвязывающий домен)-спейсер с фланкирующими рестрикционными сайтами BamHI и HindIII, расщепляли рестрикционными ферментами BamHI/HindIII для того, чтобы удалить спейсер, и получали в виде вектора. Вектор лигировали с вышеупомянутыми расщепленным BamHI/BbsI продуктом ПЦР XTEN_AE432-1 и расщепленным BsaI/HindIII продуктом ПЦР XTEN_AE432-2. Лигационную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. Coli* штамма TOP10. Проводили скрининг трансформантов, выделяя ДНК, а нужные конструкции подтверждали путем секвенирования ДНК. Таким образом, конечная плазмида дает ген CBD-GRGSP-XTEN_AE432-TAEAAGKPGTAEAA-XTEN_AE432-GKAT-H8, регулируемый промотором T7. Последовательности ДНК и белковые последовательности приведены в Таблице 28.

Таблица 28: ДНК- и аминокислотные последовательности Lys2-XTEN

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
CBD-R-AE432-K-AE432-K-H8 (AC698)	ATGGCTAATACCCCAGTGAGCGGCAACCTGAAAGT	MANTPVSGNLKVEF
	GGAATTCTACAATAGCAACCCGAGCGACACCACC	Y
	AACAGCATTAATCCGCAGTTCAAAGTGACCAACAC	NSNPSDTTNSINPQF
	GGGTAGCTCCGCGATCGATCTGTCGAAGCTGACGC	KVTNTGSSAIDLSKL
	TGCGTTACTATTACACGGTTGACGGTCAGAAAGAT	TLRYYYTVDGQKD
	CAGACGTTCTGGGCTGACCATGCGGCCATTATTGG	QT
	CAGCAACGGTTCCTACAACGGTATCACGAGCAATG	FWADHAAIIGSNGS
	TCAAAGGCACTTTTGTTAAGATGAGCTCTTCGACC	Y
	AACAATGCCGATACCTATCTGGAGATTAGCTTCAC	NGITSNVKGTFVKM
	CGGTGGTACTCTGGAGCCGGGTGCACACGTTCAAA	S
	TCCAAGGTCGCTTCGCAAAGAATGACTGGAGCAAC	SSTNNADTYLEISFT
	TATACCCAGTCCAATGACTACAGCTTCAAAAGCGC	GGTLEPGAHVQIQG
	TAGCCAATTTGTTGAATGGGATCAGGTCACCGCAT	R
	ACCTGAACGGCGTGCTGGTCTGGGGCAAGGAACC	FAKNDWSNYTQSN
	GGGTGGTAGCGTTGTCGGTTCTGGCAGCGGATCCg	DY
	gtcgtGGGTCTCCAGGTAGCCCAGCTGGTAGCCCAAC	SFKSASQFVEWDQV
	CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTC	T
	CAGAATCCGGTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGC	AYLNGVLVWGKEP
	GAAGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCC	GG
	TACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCACCGAACCAT	SVVGSGSGSGRGSP
	CTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCG	G
	TCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGC	SPAGSPTSTEEGTSE
	AACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTA	SATPESGPGTSTEPS
	CTTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCG	EGSAPGSPAGSPTST
	ACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTCACCGGCGGG	EEGTSTEPSEGSAPG
	TAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAG	TSTEPSEGSAPGTSE
	TCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCAC	SATPESGPGSEPATS
	CGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGGTACCAGC	GSETPGSEPATSGSE
	ACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCC	TPGSPAGSPTSTEEG
	GGCGGGCTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGT	TSESATPESGPGTST
	CCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCAC	EPSEGSAPGTSTEPS
	CAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGC	EGSAPGSPAGSPTST
	ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGG	EEGTSTEPSEGSAPG
	GTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCC	TSTEPSEGSAPGTSE
	AGGTACCTCTGAATCTGCTACCCCAGAATCTGGCC	SATPESGPGTSTEPS
	CGGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACC	EGSAPGTSESATPES
	CCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGC	GPGSEPATSGSETPG
	TCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCG	TSTEPSEGSAPGTST
	CTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGC	EPSEGSAPGTSESAT
	GGCCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAG	PESGPGTSESATPES
	CGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCA	GPGSPAGSPTSTEEG
	CTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAA	TSESATPESGPGSEP
	TCTGGTCCTGGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCC	ATSGSETPGTSESAT
	GAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGACTCCGGA	PESGPGTSTEPSEGS
	ATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAG	APGTSTEPSEGSAPG
	GGTAGCGCACCAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGA	TSTEPSEGSAPGTST
	GGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACGGAACCTTCGG	EPSEGSAPGTSTEPS
	AAGGTTCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCC	EGSAPGTSTEPSEGS
	GAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCACGGAACCGT	APGSPAGSPTSTEEG
	CCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACC	TSTEPSEGSAPTAEA
	GTCGGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCGGGC	AGKPGTAEAAGTSE
	TCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAGCACCG	S
	AGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAACCGCTGAAGCC	ATPESGPGSEPATSG
	GCAGGTaaaccgGGCACTGCGGAAGCTGCAGGTACA	SETPGTSESATPESG

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
	AGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAG CGAGCCTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGC ACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGG TTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCGGAAACGCCG GGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTCC GGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCGGCA CCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCG GTCCGGGCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACCAGCACC GAAGAAGGTTCCCCTGCTGGTAGCCCGACCTCTAC GGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCCAGAA AGCGGTCCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGG CTCTGCACCAGGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAG AAAGCGGCCCAGGTTCTGAACCAGCAACTTCTGGC TCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCC TGAATCCGGTCCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCG GCAGCGAAACCCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACT CCAGAGTCTGGTCCTGGTACTTCCACTGAGCCTAG CGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGGTAGCC CGACCAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGC AACGCCGGAATCGGGCCCAGGTTCGGAGCCTGCA ACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGAATC TGCTACACCGGAAAGCGGTCCTGGCAGCCCTGCTG GTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTCACCGGCA GGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCA CGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAG CGAGAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACC AGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCCAGGTA CTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGT AGCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGG TTCGGAACCAGCGACCAGCGGTTCTGAAACTCCGG GTAGCCCGGCAGGCAGCCCAACGAGCACCGAAGA GGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTGCC CCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGC ACCTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAA CGCCGGGTACCAGCGAAAGCGCTACCCCAGAATC CGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGC TCCGCACCAggtAAAgcgaccCATCACCATCACCACCA TCATCACTAA	PGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGKATHHH H HHHH

[00455] Пример 10: Хозяйский штамм и промотор для экспрессии XTEN для конъюгации

[00456] Плазмиды pCW1054, экспрессирующие CBD-сайт TEV-XTEN_AE864, регулируемые промотором T7/lac, pLCW0968.003, экспрессирующие CBD-сайт TEV-XTEN_AE864-GFP, регулируемые промотором T7/lac, и pLCW0970.030, экспрессирующие CBD-сайт TEV-XTEN_AE864-GFP, регулируемые промотором PhoA, трансформировали в *E. coli* BL21 DE3 и *E. coli* BL21 DE3 rne-131 (Lopez, P. J., et al. (1999) Mol. Microbiol. 33, 188-199). Мутация rne-131 препятствует 3' эндорибонуклеолитической активности РНКазы E (Kido, M., et al. (1996) Journal of Bacteriology, 178: 3917-3925). Стартовые культуры всех шести трансформантов

получали путем отбора одиночных колоний для инокуляции 2 мЛ ЛБ-бульона, содержащего подходящий селективный антибиотик. Стартовые культуры выращивали на протяжении ночи, а 0,5 мЛ использовали для инокуляции в четырёх параллельных опытах 25 мЛ бульона 2xYT для клеток, содержащих pCW1054 и pLCW0968.003, или 25 мЛ индукционного бульона PhoA (Amunix recipe 136-1) для клеток, содержащих pLCW0970.030. Культуры встряхивали на протяжении 3 часов при 37°C. Затем для всех культур температуру понижали до 26°C; а в клетках, содержащих pCW1054 и pLCW0968.003, индуцировали экспрессию белка при помощи ИПТГ при конечной концентрации 1,0 мМ. Индукция промотора PhoA в pLCW070.030 самоиндуцируется после удаления фосфата из культуральной среды. Затем культуры встряхивали на протяжении ночи при 26°C. Образцы каждой культуры лизировали, и 20 мкл каждого лизата подвергали невосстанавливающему SDS-PAGE, используя NuPAGE 4-12% Бис-Трис гель от Invitrogen согласно инструкции производителя с окрашиванием Кумасси. Результаты (ФИГ. 43) показывают, что когда под управлением промотора T7/lac экспрессируется CBD-сайт TEV-XTEN_AE864-GFP или CBD-сайт TEV-XTEN_AE864, выход рекомбинантного белка значительно выше в клетках E. coli BL21 DE3 rne-131 по сравнению с клетками E. coli BL21 DE3. Также для клеток определяли флуоресценцию GFP, используя флуоресцентный планшет-ридер. Результаты (ФИГ. 44) показывают, что экспрессия CBD-сайт TEV-XTEN_AE864-GFP в клетках E. coli BL21 DE3 под управлением промотора почти в три раза больше, чем экспрессия CBD-сайт TEV-XTEN_AE864-GFP под управлением промотора T7/lac. В E. coli BL21 DE3 rne-131 оба промотора, T7/lac и PhoA, приводили к одинаковым уровням экспрессии. Следовательно, только при подавлении 3' эндорибонуклеолитической активности РНКазы E при индукции T7/lac получают те же титры, что и при применении индукции PhoA. Вероятно, более высокая скорость транскрипции T7 РНК полимеразы (Studier, W., et al. (1986) Journal of Molecular Biology 189: 113–130) по отношению к трансляции приводит к восприимчивости мРНК к эндонуклеолитическому воздействию, в то время как в случае индукции PhoA, при которой транскрипция опосредуется нативной E. Coli РНК полимеразой II, скорость транскрипции привязана к скорости трансляции, что защищает мРНК от эндонуклеолитического воздействия.

[00457] Пример 11: Конструирование 1xAmino-XTEN288

[00458] Пару праймеров AE278BsaIfor-AACG и AE278-RH8HindIIIrev использовали для ПЦР плазмиды, содержащей XTEN_AE864_003, для того, чтобы получить продукт ПЦР XTEN_AE278. Для полосы необходимого размера проводили очистку гелем с последующим расщеплением BsaI/HindIII для получения вставки XTEN_AE278-R-H8. Расщепление плазмиды pCW1161, которая кодирует ген N-term-RP11-R-AE432_3Cys-R-H8 (конструкция AC763), при помощи BsaI/HindIII проводили для того чтобы удалить фрагмент AE432_3Cys-R-H8 и

очистить гелем большой фрагмент для получения вектора. Проводили лигирование вектора со вставкой и использовали его для трансформации компетентных клеток BL21 для того чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-AE288-R-H8. Длину XTEN между двумя сайтами расщепления трипсином (R, Аргинин) рассчитывали как XTEN_AE278 плюс некоторые фланкирующие аминокислоты, и она составляет ровно 288 аминокислот. Таким образом, создали проект конструкции для получения предшественника N-term-RP11-R-AE288-R-H8 (последовательность в Таблице 29, ниже) и создания 1xAmino-XTEN288 (Seg 178 из Таблицы 3 с N-концевой аминогруппой для конъюгации) после удаления маркера N-term-RP11 и маркера C-term 8xHis при помощи расщепления трипсином.

Таблица 29: ДНК- и аминокислотные последовательность для 1xAmino-XTEN288

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
N-term-RP11-R-AE288-R-H8	ATGAAAAACCCAGAGCAAGCAGAAGAACAAGCTGAAGAACA GCGCGAAGAAACACGTCCGCGTCCTCGCCCACGTCCACGTCC GCGTCCACGCCCTCGTCCTCGTCCGCGCCCTCGTCCGagcgcgtct cgttccgctGGGTCTCCAAcgGGCCCAGGTTCTGAACCAGCAACTT CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCCTG AATCCGGTCCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGCAGCGAAA CCCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCCTG GTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTC CGGCTGGTAGCCCGACCAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGAAT CTGCAACGCCGGAATCGGGCCCAGGTTCGGAGCCTGCAACGT CTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGG AAAGCGGTCCTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCG AGGAGGGTTCACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAA GGTACTAGCACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTAC GAGCGAGAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAGCG AATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCCAGGTACTTCTGAGAGCG CCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACCTCCG GCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAACCAGCGACCAGCGGTTCTG AAACTCCGGGTAGCCCGGCAGGCAGCCCAACGAGCACCGAA GAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTGCCCCGGG TACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGTAGCGA ACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAGCGAAAG CGCTACCCCAGAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCATC GGAGGGCTCCGCACCAagcgcctctcgctccgcaCATCACCATCACCAC CATCATCACTAA	MKNPEQAEEQAEEQ REETRPRPRPRPRPRP RPRPRPRPRPSASRSA GSPTGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPSASRSA HHHHHHHH

[00459] Пример 12: Оптимизация для экспрессии конструкции XTEN с аффинным маркером RP11

[00460] 1. 1. Проектирование и конструирование конструкций, кодирующих N-term-RP11-AE864-GFP и MalEss-AE48-RP11-AE864.

[00461] Группу высокоэкспрессируемых нативных белков E. Coli, описанную Ishihama Y. et al, BMC Genomics 2008, 9:102, использовали для создания перечня из 20 первых N-концевых аминокислот (колонка 3 Таблицы 30), гидрофобные аминокислоты F, I, W, L, V, M, C из

которого были преобразованы в аланин или серин, либо были удалены с целью получения кандидатов для создания вспомогательных последовательностей, содержащих по меньшей мере 11 аминокислот (колонка 4 Таблицы 30). В целях сравнения первые 20 аминокислот известной последовательности CBD из хорошо экспрессируемой конструкции, созданной на Amunix (AC616), были включены в качестве контроля.

Таблица 30: Перечень N-концевых хелперов, сконструированных в данном исследовании

Плазмида	Описание белка	1-е 20 ак	N-конц. хелперы
pSD0107	30S рибосомный белок S9	MAENQYYGTGRRKSSAARV F	MAENQYYGTGRRKSSAAR
pSD0108	50S рибосомный белок L32	MAVQQNKPTRSKRGMRRSH D	MAAQQNKPTRSKRGARRSH D
pSD0109	30S рибосомный белок S20	MANIKSAKKRAIQSEKARKH	MANAKSAKKRAAQSEKAR KH
pSD0110	HSP-70 кофактор протеина GrpE	MSSKEQKTPEGQAPEEIIMD	MSSKEQKTPEGQAPEE
pSD0111	30S рибосомный белок S14	MAKQSMKAREVKRVALAD KY	MAKQSAKAREAKRAASAD KY
pSD0112	30S рибосомный белок S12	MATVNQLVRKPRARKVAKS N	MATANQAARKPRARKAAK SN
pSD0113	Фактор элонгации Tu (EF-Tu) (P-43)	MSKEKFERTKPHVNVGTIGH	MSKEKAERTKPHANAGT
pSD0114	30S рибосомный белок S15	MSLSTEATAKIVSEFGRDAN	MSASTEATAKAASEAGRDA N
pSD0115	Супероксид дисмутаза [Mn] (EC 1.15.1.1) (MnSOD)	MSYTLPSLPYAYDALEPHFD	MSYTAPSAPYAYDAAEPH
pSD0116	rraB ингибитор рибонуклеазы E протеин B	MANPEQLEEQREETRLIIEE	MANPEQAEEQREETR
pSD0117	Целлюлозосвязы-вающий белок (CBD)	MANTPVSGNLKVEFYNSNPS	MANTPASGNAKAEAYNSNP S
pSD0118	CBD (из предыдущей конструкции AC616)	MANTPVSGNLKVEFYNSNPS	MANTPVSGNLKVEFYNSNP S

[00462] Олигонуклеотиды ДНК ряда от 107N-F&R до 119N-F&R и последовательности RP11F&R из Таблицы 31 синтезировали на Elim Biopharm (Хейворд, Калифорния). Растворы каждой пары ДНК (107N-F и 107N-R, 108N-F и 108N-R и т.д.) смешивали в молярном соотношении 1:1, денатурировали при 95°C на протяжении 3 мин, затем охлаждали до 25°C при 0,1°C/мин, чтобы обеспечить отжиг двухцепочечной ДНК. Базовый вектор LCW0970.030 (кодирующий CBD-AE864-GFP) расщепляли при помощи NdeI/BsaI, и более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Вектор лигировали с отожженными олиго 107-118N-F&R и обработанными ПНК отожженными олиго RP11F&R, а лигационные продукты трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21 (New England Biolabs) для получения колоний, обозначенных от pSD0107 до pSD118. Клоны pSD0107-109, pSD0111-112 и pSD0114-

118 получали и подтверждали при помощи секвенирования ДНК; клон pSD0110.001 содержал одну мутацию сдвига рамки и его использовали в качестве спейсерного вектора.

[00463] Плазмидную конструкцию pCW1110 (кодирующую RP11-AE864) расщепляли при помощи BsaI/NotI, а меньшую полосу, соответствующую нуклеотидам, кодирующим AE864, очищали гелем как вставку. pCW1139 (кодирующую MalEss-AE48-payload-AE864) расщепляли при помощи XhoI/BstXI/NotI, а более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Отожженный продукт олиго из 119-AEN-F&R лигировали со вставкой и вектором, а затем трансформировали в E. coli BL21 для получения колоний с плазмидой, обозначенной как pSD0119. Клоны подтверждали на предмет последовательностей.

[00464] 2. Конструирование библиотек N-концевых хелперов на основе pSD0116

[00465] Пары олигонуклеотидов ДНК Stuffer-RP5for и Stuffer-RP5revP, RP6-SASRSAforP и RP6-SASRSArev, L2for и L2rev, L3for и L3rev, L4for и L4rev, L5for и L5rev, L6for и L6rev, L7for и L7rev, L8for и L8rev, L9for и L9rev, L10for и L10rev, L11for и L11rev, L12for и L12rev и L13for и L13rev (Таблица 31) синтезировали на Elim Biopharm (Хейворд, Калифорния) и каждую пару отжигали как описано выше (Часть 1) для получения двухцепочечной ДНК.

[00466] Плазмиду pSD0110 расщепляли при помощи NdeI/BsaI, а более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Вектор лигировали с отожженными олиго Stuffer-RP5for&revP и RP6-SASRSAforP&rev, а затем трансформировали в E. coli BL21 для получения колоний со спейсерной векторной плазмидой pCW1146 (Stuffer-RP11-XTEN_AE864_003-GFP). Клоны подтверждали на предмет последовательностей.

[00467] Расщепленный NdeI/BsaI вектор pSD0110 лигировали с L5for&rev отожженными олиго для получения колоний LCW1160 (L5).

[00468] Спейсерный вектор pCW1146 расщепляли при помощи NdeI/BsaI, а более крупный фрагмент очищали гелем как вектор. Вектор лигировали с отожженными олиго L2-4 и L6-13 for&rev как в Таблице 31, а затем трансформировали E. coli BL21 для получения колоний конструкций LCW1157 (L2), LCW1158 (L3), LCW1159 (L4), LCW1163 (L6), LCW1171 (L7), LCW1172 (L8), LCW1203 (L9), LCW1204 (L10), LCW1208 (L11), LCW1209 (L12) и LCW1210 (L13).

Таблица 31: Перечень олигонуклеотидов ДНК

Название	Последовательность ДНК
RP11F	CGTCCGCGTCCTCGCCCACGTCCACGTCCGCGTCCACGCCCTCGTCCTCGTCCGCG CCCTCGTCCGagcgcgtctcgttccgctGGGTCTCC
RP11R	ACCTGGAGACCCAGCGGAACGAGACGCGCTCGGACGAGGGCGCGGACGAGGACG AGGGCGTGGACGCGGACGTGGACGTGGGCGAGGACGCG
107N-F	TATGGCTGAAAATCAATATTATGGTACGGGGCGCCGGAAGAGTTCGGCCGCC
107N-R	GACGGGCGGCCGAACTCTTCCGGCGCCCCGTACCATAATATTGATTTTCAGCCA
108N-F	TATGGCAGCTCAGCAGAATAAGCCTACACGAAGTAAAAGAGGCGCGCCGGTC

Название	Последовательность ДНК
	GCACGAT
108N-R	GACGATCGTGCGACCGGCGCGCGCCTCTTTTACTTCGTGTAGGCTTATTCTGCTGAGCTGCCA
109N-F	TATGGCAAATGCTAAGAGTGCAAAGAAACGGGCGGCACAAAGCGAAAAAGCTCGGAAACAT
109N-R	GACGATGTTTCCGAGCTTTTTCGCTTTGTGCCGCCCGTTTCTTTGCACTCTTAGCATTTGCCA
110N-F	TATGTCCAGCAAAGAACAGAAGACTCCGGAAGGTCAAGCGCCAGAGGAG
110N-R	GACGCTCCTCTGGCGCTTGACCTTCCGGAGTCTTCTGTTCTTTGCTGGACA
111N-F	TATGGCCAAACAAAGCGCTAAAGCCCGCGAGGCGAAACGTGCAGCCTCTGCGGACAAATAT
111N-R	GACGATATTTGTCCGCAGAGGCTGCACGTTTCGCCTCGCGGGCTTTAGCGCTTTGTTTGGCCA
112N-F	TATGGCTACTGCAAATCAGGCCGCCCGTAAACCTCGAGCACGAAAGGCTGCTAAATCAAAT
112N-R	GACGATTTGATTTAGCAGCCTTTCGTGCTCGAGGTTTACGGGCGGCCTGATTTGCAGTAGCCA
113N-F	TATGTCCAAAGAAAAAGCCGAACGGACCAAACCTCATGCTAACGCTGGCACG
113N-R	GACGCGTGCCAGCGTTAGCATGAGGTTTGGTCCGTTCGGCTTTTTCTTTGGACA
114N-F	TATGTCAGCGTCTACGGAGGCAACCGCAAAAGCTGCTAGTGAAGCGGGCCGTGATGCGAAT
114N-R	GACGATTCGCATCACGGCCCGCTTCACTAGCAGCTTTTGCGGTTGCCTCCGTAGACGCTGACA
115N-F	TATGAGCTATACTGCACCGAGCGCACCGTATGCTTATGATGCAGCCGAACCTCAC
115N-R	GACGGTGAGGTTCGGCTGCATCATAAGCATACGGTGCGCTCGGTGCAGTATAGCTCA
116N-F	TATGGCAAACCCCGAACAGGCTGAGGAACAGAGAGAAGAAACA
116N-R	GACGTGTTTCTTCTCTCTGTTCCTCAGCCTGTTCGGGGTTTGCCA
117N-F	TATGGCTAATACCCCTGCGAGCGGGAACGCCAAGGCGGAAGCTTACAACAGTAATCCAAGC
117N-R	GACGGCTTGGATTACTGTTGTAAGCTTCCGCCTTGGCGTTCCCGCTCGCAGGGGTATTAGCCA
118N-F	TATGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTGAAGGTTGAATTCTACAACAGCAATCCTTCA
118N-R	GACGTGAAGGATTGCTGTTGTAGAATTCAACCTTCAAATTGCCTGATACCGGTGTATTTGCCA
119-AEN-F	TCGAGCACGGGCAGCCCA
119-AEN-R	GACGTGGGCTGCCCGTGC
Stuffer-RP5for	TATGggctgaGGGTCTCaCGTCCGCGTCCTCGCCCACGTCCACGTCCGCGT
Stuffer-RP5revP	GGACGTGGACGTGGGCGAGGACGCGGACGtGAGACCCtcagccCA
RP6-SASRSAforP	CCACGCCCTCGTCCTCGTCCGCGCCCTCGTCCGagcgcgtctcgttccgc
RP6-SASRSArev	ACCTgcggaacgagacgcgctCGGACGAGGGCGCGGACGAGGACGAGGGCGTGGACGC
L2for	tATGaaaAAYCCNGARCARGCNGARGARCARMGYGARGARACa
L2rev	GACGTGTYTCYTCRCKYTGYTCYTCNGCYTGYTCNGGRTTTTTCA
L3for	tATGGCNAAYCCNGARCARGCNGARGARCARMGYGARGARACa
L3rev	GACGTGTYTCYTCRCKYTGYTCYTCNGCYTGYTCNGGRTTNGCCA

Название	Последовательность ДНК
L4for	tATGaaaAAcCCVGARCARGCDGARGAaCARGCDGARGAaCAgMGYGAaGARACa
L4rev	GACGTGTYTCTTCRCKCTGTTCYTCHGCYTGTTCYTCHGCYTGYTCBGGGTTTTTCA
L5for	tATGaRaCCNCGNCCNCGNCCNCGNCCNCGNCCNCGNCCNCGNCCNCGNCCNCGNC CNCGNCCNCGNCCNGGGTCTCC
L5rev	ACCTGGAGACCCNGGNCGNGGNCGNGGNCGNGGNCGNGGNCGNGGNCGNGGNC GNGGNCGNGGNCGNGGNCGNGGTYTCA
L6for	tATGaaaAAHMMVGARCARGCWGARGAaCARGCDGARGAaCAgMGYGAaGARACa
L6rev	GACGTGTYTCTTCRCKCTGTTCYTCHGCYTGTTCYTCWGCYTGYTCBKKDTTTTTC A
L7for	tATGAAAAAWCAMRARMARRMWRAARAAMAARMDRAARAACAGMGCGAAGAR ACA
L7rev	GACGTGTYTCTTCGCKCTGTTYTTYHKYTTKTTYTTYWKYYTKYTYKTGWTTTTTC A
L8for	tATGAAAAAWCAMRARMARRMWRAARAAMAAGCDGAAGAACAGMGCGAAGAR ACA
L8rev	GACGTGTYTCTTCGCKCTGTTCTTCHGCTTKTTYTTYWKYYTKYTYKTGWTTTTTC A
L9for	tATGAAAAANCMMGAACAAGAARAARAAMAAGCNGAAGAACARCGYGARGARAC A
L9rev	GACGTGTYTCYTCRCGYTGTTCTTCNGCTTKTTYTTYTTCTTGTTCKKGNTTTTTCA
L10for	tATGAAAAANCMMGAACAAGAARAARAAMAAGCNGAAGAAMARMRHRARRARA MA
L10rev	GACGTKTYTYYTYDYKYTKTTCTTCNGCTTKTTYTTYTTCTTGTTCKKGNTTTTTCA
L11for	tATGAAAAAACAAGAACAAGAAAAAGAACAAGCGGAAGAACAAKCNVARKCNVA RCGTGAGGAGACA
L11rev	GACGTGTCTCCTCACGYTBNGMYTBNGMTTGTTCTTCCGCTTGTTCTTTTTCTTGTT CTTGTTTTTTCA
L12for	tATGAAAAAACAAGAACAAGAAAAAGAACAAGCGGAAGAACAAKCVVAAKCVVA AKCVVAAKCVVAACGTGAGGAGACA
L12rev	GACGTGTCTCCTCACGTTBBGMTTBBGMTTBBGMTTBBGMTTGTTCTTCCGCTTGT TCTTTTTCTTGTTCTTGTTTTTTCA
L13for	tATGAAAAAACAAGAACAAGAAAAAGAACAAGCGGAAGAACAANNNNNNNNNN NNCGTGAGGAGACA
L13rev	GACGTGTCTCCTCACGNNNNNNNNNNNNTTGTTCTTCCGCTTGTTCTTTTTCTTGTT CTTGTTTTTTCA

[00469] 3. Скрининг и анализ библиотек N-концевых хелперов LCW1157-1159

[00470] Хозяйские клетки E. Coli, трансформированные плазмидами от pSD0107 до pSD0118, экспрессировали во встряхиваемых колбах, а уровни экспрессии для каждого оценивали путем измерения флуоресценции от C-концевого репортера GFP. Вкратце, на протяжении ночи выращивали культуру для каждой конструкции в СБ среде (с 12,5 мкг/мл тетрациклина), которую затем использовали для инокуляции 200 мл культуры фосфат-дефицитной самоиндуцирующейся PhoA среды при помощи 12,5 мкг/мл тетрациклина (для каждой конструкции выращивали по три встряхиваемые колбы). После выращивания при 26°C при 225 об/мин на протяжении 48 ч, из каждой культуры забирали по 100 мкл аликвоты и измеряли уровень экспрессии GFP при помощи флуоресцентного планшета-ридера с длиной волны возбуждения, составляющей 395 нм, и длиной волны эмиссии, составляющей 510 нм.

Для каждой встряхиваемой колбы отбирали по два показания. Среди исследуемых конструкций самый высокий флуоресцентный сигнал наблюдали для pSD0116, а затем для pSD0114 (ФИГ. 81), но уровни экспрессии для этих двух конструкций были значительно ниже положительного контроля LCW0970.030 (pLCW970).

[00471] Для того чтобы дополнительно улучшить экспрессию на основе pSD0106 создали три библиотеки (LCW1157, 1158 и 1159) и проводили их скрининг в высокопроизводительном формате. Большие количества колоний из этих библиотек (Таблица 32) отбирали для отдельного выращивания в 500 мкл СБ среды (с 12,5 мкг/мл тетрациклина) в глубоких 96-луночных планшетах на протяжении ночи при 37°C, встряхивая при 300 об/мин. 20 мкл насыщенной культуры использовали для инокуляции 500 мл культуры фосфат-дефицитной самоиндуцирующейся PhoA среды (с 12,5 мкг/мл тетрациклина) в глубоких 96-луночных планшетах, которые инкубировали при 26°C, встряхивая при 300 об/мин на протяжении 22-24 ч. Затем определяли экспрессию путем помещения 100 мкл культуры в 96-луночный планшет и измеряя флуоресценцию от C-концевого репортера GFP.

Таблица 32: Библиотеки LCW1157-1159

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

[00472] После оценки флуоресцентного сигнала шесть клонов, демонстрирующих наибольшую экспрессию, и два клона, демонстрирующих низкую экспрессию, выбирали из каждого исследуемого 96-луночного планшета, а экспрессию этих клонов повторно тестировали в 4 репликах. Для всех трех библиотек были определены клоны, имеющие более высокую экспрессию, чем конструкция pSD0116 (ФИГ. 82A-C), а между первоначальными исследованиями и повторными исследованиями наблюдали хорошую корреляцию (ФИГ. 82D-F). Среди трех исследуемых библиотек библиотека LCW1159 показывала в общем случае

высокий уровень экспрессии, и конструкция, характеризующаяся наиболее высокой экспрессией на данном этапе скрининга (LCW1159.004), принадлежала этой библиотеке.

[00473] 8 конструкций с наиболее высокими уровнями экспрессии из этих трех библиотек и контрольные образцы обрабатывали при помощи Pop Culture (EMD Millipore), обрабатывали температурой, а полученные в результате лизаты анализировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания Кумасси (ФИГ. 83). Подтвердили, что уровни экспрессии для 8 конструкций были выше, чем для контрольных образцов (отрицательный контроль, LSD0114 и LSD0116), а полноразмерные белки получали из этих конструкций. Лизаты 4 конструкций с наибольшей экспрессией (после обработки Pop Culture и температурой) и отрицательный контроль (AP32, очищенный белок XTEN-GFP без маркера RP11) загружали в колонку MacroCap SP при pH 8 и проводимости 6.5 мСм/см. Колонку отмывали 20 мМ фосфата натрия, pH 8, 100 мМ NaCl, а белок элюировали при помощи 20 мМ фосфата натрия, pH 8, 500 мМ NaCl. Образцы из загрузки, профильтрованные, отмытые и элюированные, анализировали в SDS-PAGE геле (ФИГ. 84). Результаты показывают, что экспрессируемый белок четырех образцов, которые были отобраны из всех трех библиотек, может захватываться MacroCap SP; таким образом, связывание было обусловлено наличием в белке маркера RP11, так как отрицательный контроль (не содержащий маркера RP11) не связывался с колонкой MacroCap SP.

[00474] Плазмиды клонов, выбранных для повторного исследования, лизировали щелочью и анализировали последовательности ДНК N-концевых хелперов. В некоторых участках наблюдали расхождение в кодонах (Таблица 33). Например, 3-я аминокислота LCW1157, N, кодируется AAC или AAT. Большинство характеризующихся высокой экспрессией клонов (77%) в LCW1157 кодируются AAT в 3-ей аминокислоте, в то время как большинство клонов, характеризующихся низкой экспрессией (885) кодируются AAC, что указывает на то, что AAT в этой позиции является более предпочтительным, чем AAC для высокой экспрессии. Аналогично, CCG является более предпочтительным в 4-ой аминокислоте, в то время как GCG в 7-ой аминокислоте накапливается в клонах с низкой экспрессией. Те же тенденции наблюдали и для библиотек LCW1158 и LCW1159.

Таблица 33: Анализ результатов секвенирования клонов с высокой и низкой экспрессией в библиотеках LCW1157-1159*

LCW1157

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

LCW1158

аминокислота #		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	13	14
		A(GC+)	N(AA+)	P(CC+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	R or S(+G+)		E(GA+)	E(GA+)	T(AC+)
кодон		3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	1-я	3-я	3-я	3-я	
общее количество высок.: 6	A	83%	0%	33%	17%	67%	50%	83%	50%	83%	83%	0%	67%	50%	T(ACA)
	G	0%	0%	0%	83%	33%	0%	17%	50%	17%	0%	0%	33%	50%	
	C	0%	33%	33%	0%	0%	33%	0%	0%	0%	17%	100%	0%	0%	
	T	17%	67%	33%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
общее количество низк.: 2	A	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	
	G	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%	0%	
	C	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	
	T	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	

LCW1159

аминокислота #		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16	17	18
		K(AAA)	N(AA+)	P(CC+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	A(GC+)	E(GA+)	E(GA+)	Q(CA+)	R or S(+G+)		E(GA+)	E(GA+)	T(AC+)
кодон			3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	3-я	1-я	3-я	3-я	3-я	
общее количество высок.: 12	A	K(AAA)	N(AAC)	42%	67%	67%	50%	75%	E(GAA)	67%	50%	58%	E(GAA)	Q(CAG)	25%	0%	E(GAA)	58%	T(ACA)
	G			17%	33%	33%	0%	25%		33%	17%	42%			0%	0%		42%	
	C			42%	0%	0%	0%	0%		0%	0%	0%			75%	75%		0%	
	T			0%	0%	0%	50%	0%		0%	33%	0%			0%	25%		0%	
общее количество низк.: 3	A			33%	100%	67%	0%	67%		67%	100%	100%			33%	0%		33%	
	G			33%	0%	33%	100%	33%		33%	0%	0%			0%	0%		67%	
	C			33%	0%	0%	0%	0%		0%	0%	0%			67%	67%		0%	
	T			0%	0%	0%	0%	0%		0%	0%	0%			0%	33%		0%	

* Общее количество анализируемых клонов с высокой и низкой экспрессией определяли для каждой библиотеки, и анализировали процентное содержание A, G, C или T в каждом участке с изменяющимися кодонами.

[00475] 4. Скрининг и анализ библиотеки N-концевых хелперов LCW1163

[00476] Так как библиотека LCW1159 в общем случае характеризуется более высокой экспрессией, чем LCW1157 и LCW1158, проект следующей библиотеки создавали на основе LCW1159 путем внесения более вариантов в кодирующую область N-концевого вспомогательного домена. Для 672 клонов из этой библиотеки (с теоретическим значением вариабельности в 55296) проводили скрининг и повторное исследование таким же образом, как и для библиотек LCW1157-1159. Наблюдали клоны с более высокой экспрессией, чем LCW1159.004 (образец с наибольшей экспрессией для предыдущего этапа скрининга) (ФИГ. 85). Для клона с наибольшей экспрессией, LCW1163.029, было достигнуто 40% улучшение по сравнению с LCW1159.004, при этом его уровень экспрессии был на 27% ниже, чем для контрольного CBD. Проводили анализ последовательности клонов с высокой и низкой экспрессией, определяли наиболее предпочтительные для экспрессии нуклеотиды (смотрите

Таблицу 34) и обобщали полученную информацию. Большинство участков демонстрировали предпочтительность кодона A для высокой экспрессии, в то время как для остальных предпочтительным являлся C.

Таблица 34: Анализ результатов секвенирования для клонов с высокой и низкой экспрессией в библиотеке LCW1163*

		Экспрессия (Процентное содержание)													
количество нуклеотидов		#9	#10	#11	#12	#15	#18	#21	#24	#30	#33	#36	#43	#45	#51
высокая экспрессия	A	74	17	74	40	37	40	66	77	60	43	66	40	0	34
	C	17	83	26	49	0	0	0	0	0	0	0	60	83	0
	T	9	0	0	0	0	0	34	0	0	29	0	0	17	0
	G	0	0	0	11	63	60	0	23	40	29	34	0	0	66
низкая экспрессия	A	20	70	3	20	40	20	60	50	30	10	20	50	0	60
	C	60	30	70	30	0	0	0	0	0	0	0	50	50	0
	T	20	0	0	0	0	0	40	0	0	40	0	0	50	0
	G	0	0	0	50	60	80	0	50	70	50	80	0	0	40
предпочтение		A	C	A	A/C				A	A		A		C	

[00477] * Проводили анализ процентного содержания A, G, C или T в каждом участке с вариабельным кодоном, а обобщенную информацию по определенным предпочтительным нуклеотидам привели в нижнем ряду.

[00478] 5. Скрининг и анализ RP11библиотеки LCW1160

[00479] В то же время проводили скрининг и анализ 168 колоний из библиотеки LCW1160 (библиотека с вариабельной кодирующей областью RP11- маркера без N-концевого вспомогательного домена (общая теоретическая вариабельность составляла $8.8X10^{12}$)). Однако данная библиотека в общем случае имела очень низкий уровень экспрессии (ФИГ. 86), а после выделения плазмидной ДНК и анализа данных секвенирования было обнаружено, что исключение с высокой экспрессией кодирует процессированный маркер RP11. Результаты скрининга библиотеки в условиях данного эксперимента дают большие основания предполагать, что N-концевой хелпер необходим для достижения высоких уровней экспрессии.

[00480] 6. Скрининг библиотек N-концевых хелперов LCW1171, LCW1172, LCW1203 и LCW1204.

[00481] Проводили скрининг и анализ дополнительного количества N-концевых библиотек (LCW1171, LCW1172, LCW1203 и LCW1204) тем же самым образом, как описано выше. LCW1171 и 1172 были сконструированы одинаково, при этом для LCW1171 допускали большее количество аминокислотных замен во вспомогательной последовательности, чем для LCW1172. Результаты скрининга показали, что в целом LCW1171 характеризуется намного

более низким уровнем экспрессии, чем LCW1172 (ФИГ. 94A и B). LCW1203 и 1204 были сконструированы одинаково, акцент делали на рандомизации разных участков вспомогательной последовательности по сравнению с LCW1171 и 1172. Для LCW1204 допускали большее количество аминокислотных замен, чем для LCW1203, что привело в целом к более низкой экспрессии, чем у LCW1203 (ФИГ. 94C и D). Эти результаты позволяют предположить, что уровень экспрессии чувствителен к заменам в последовательностях вспомогательных доменов.

[00482] 7. Скрининг библиотек N-концевых хелперов LCW1208, LCW1209 и LCW1210.

[00483] Конструировали три новые N-концевые библиотеки (LCW1208, LCW1209 и LCW1210) для того, чтобы исследовать эффект дополнительного продления N-концевой вспомогательной последовательности (Таблица 35). Во вспомогательный домен LCW1208 и LCW1210 вносили 4 дополнительных остатка, а в LCW1209 вносили 8 дополнительных остатков. Результаты скрининга показали общую тенденцию, согласно которой наиболее высокой экспрессией характеризовался LCW1209, за ним следовал LCW1208, а затем – LCW1210 (ФИГ. 95), что подтверждает положительный эффект от добавления дополнительных аминокислот во вспомогательную последовательность.

Таблица 35: Библиотеки LCW1208-1210

Библиотека	**N-концевая вспомогательная последовательность (аминокислота)**	**Вариабельность**	**Количество, для которого проводили скрининг**
LCW1208	MKKQEQEKEQAEEQ*BXBX*REET (B=A/S; X=E/K/Q)	2304	336
LCW1209	MKKQEQEKEQAEEQ*BXBXBXBX*REET (B=A/S; X=E/K/Q)	104976	336
LCW1210	MKKQEQEKEQAEEQ*ZZZZ*REET (Z=любая аминокислота)	262144	336

[00484] Дополнительные остатки во вспомогательной последовательности были подчеркнуты.

[00485] Конструировали три новые N-концевые библиотеки (LCW1208, LCW1209 и LCW1210) для того, чтобы исследовать эффект дополнительного продления N-концевой вспомогательной последовательности (Таблица 36). Во вспомогательный домен LCW1208 и LCW1210 вносили 4 дополнительных остатка, а в LCW1209 вносили 8 дополнительных остатков. Результаты скрининга показали общую тенденцию, согласно которой наиболее высокой экспрессией характеризовался LCW1209, за ним следовал LCW1208, а затем – LCW1210 (ФИГ. 95), что подтверждает положительный эффект от добавления дополнительных аминокислот во вспомогательную последовательность для улучшения экспрессии.

[00486] После повторного исследования из трех библиотек выбирали 4 конструкции с наиболее высокими уровнями экспрессии и проводили анализ их N-концевых вспомогательных последовательностей (Таблица 36). Конструкция с наиболее высокой экспрессией (LCW 1209.029) достигала 90% от уровня экспрессии контрольного CBD, как показали результаты сравнения средней флуоресценции после вычитания отрицательного контроля.

Таблица 36: Конструкции с наиболее высокими уровнями экспрессии из библиотек LCW1208-1210 и контрольные образцы

Название образца	Ср. флуоресценция	Вспомогательная последовательность*
LCW1208.009	9070	MKKQEQEKEQAEEQ*AESE*REET
LCW 1208.007	8870	MKKQEQEKEQAEEQ*AESE*REET
LCW 1208.008	8800	MKKQEQEKEQAEEQ*SQSQ*REET
LCW 1208.010	8740	MKKQEQEKEQAEEQ*SESE*REET
LCW 1209.029	10010	MKKQEQEKEQAEEQ*AKAESEAE*REET
LCW 1209.015	9440	MKKQEQEKEQAEEQ*SKSQAEAE*REET
LCW 1209.023	8980	MKKQEQEKEQAEEQ*AQAQAEDE*REET
LCW 1209.010	8580	MKKQEQEKEQAEEQ*SKSKAEDE*REET
LCW 1210.030	8650	MKKQEQEKEQAEEQ*PEVQ*REET
LCW 1210.032	8310	MKKQEQEKEQAEEQ*VENP*REET
LCW 1210.025	8100	MKKQEQEKEQAEEQ*ELCE*REET
LCW 1210.009	8030	MKKQEQEKEQAEEQ*GIDT*REET
Контрольный CBD	10940	n/a
Отрицательный контроль	1630	n/a

* Дополнительные остатки во вспомогательной последовательности были подчеркнуты.

[00487] Резюмируя результаты скрининга в условиях данного эксперимента, можно с большой вероятностью предположить, что N-концевой хелпер играет важную роль для достижения высоких уровней экспрессии.

[00488] Пример 13: Ферментация XTEN с применением индукции PhoA – оценка выхода экспрессии

[00489] *E. coli* BL21, несущие плазмиды, кодирующие Helper_LCW1159.004-RP11-AE288-His8 (AC767), Helper_LCW1172.033-RP11-AE576-His8 (AC780) и Helper_LCW1172.033-RP11-AE864-His8 (AC786) трансформировали в штамм *E. coli* BL21. Для каждого из 3 штаммов проводили по три 10 Л ферментации. Для инокуляции 125 мЛ ЛБ среды, содержащей 10 мкг/мЛ тетрациклина, использовали исходный раствор глицерола. Затем стартовые культуры встряхивали на протяжении ночи при 37°C. Стартовую культуру использовали для инокуляции 4 Л среды для периодической ферментации, содержащей -20 г сульфата аммония, 10,4 г безводного двухосновного фосфата калия, 5 г дигидрата цитрата натрия; 4,6 г моногидрата одноосновного фосфата натрия; 106 г соевого пептона NZ BL4 (Kerry Bioscience #5X00043); 54 г экстракта дрожжей (Teknova #Y9020); 3,6 Л воды; 0,05 мЛ полипропиленгликоля; 5,2 мЛ раствора следовых элементов (Amunix recipe 144-1); 35 мЛ 1 М сульфата магния; и 4 мЛ

канамицина (50 мг/мЛ)- в 10 Л стеклянном сосуде с рубашкой с B контроллером B. Braun Biostat. Настройки управления ферментацией были следующими: pH = 6,9 +/- 0,1; dO_2 = 10%; каскад растворенного кислорода в режиме перемешивания в диапазоне 125 – 1180 об/мин; поток воздуха 5 литров в минуту с 90% кислорода; начальная температура 37°C; основной контроль 13% гидроксид аммония; отсутствие кислотного контроля. После 6 часов культивирования инициировали подпитку 70% глицеролом при скорости 40 г/ч. Когда культуры достигали ОП600, составляющую 50 +/- 10 ОП, температуру культуры понижали до 26°C, добавляли 54 мЛ 1 М сульфата магния и солевую подпитку, состоящую из: 10 г/л сульфата аммония, 26 г/л безводного двухосновного фосфата калия, 2 г/л дигидрата цитрата натрия; 13 г/л моногидрата одноосновного фосфата натрия; 15 г/л безводного одноосновного фосфата калия; 0,08% раствора следовых элементов, начинали подавать со скоростью 33 г/Л и продолжали 6 часов. После истечения общего времени ферментации в 64-70 часов культуру собирали при помощи центрифугирования, получая сгустки из клеток в 1,6-2,3 килограмма влажной массы. Сгустки хранили замороженными при -80°C до дальнейшего использования. Для анализа титров в конце процесса ферментации образцы из общего бульона замораживали в объеме 0,2 мЛ, затем размораживали, затем добавляли 0,2 мЛ воды, затем для того, чтобы лизировать и флоккулировать хозяйские белки образцы инкубировали при 85°C на протяжении 15 минут, затем выдерживали при 4°C на протяжении 15 минут с последующим центрифугированием на протяжении 10 минут при 20000 g. Полученные в результате флоккулированные растворимые лизаты анализировали при помощи C18 обратнофазной HPLC, а площадь абсорбции A214, соответствующую пикам, представляющим Helper-RP11-XTEN-His8, сравнивали с очищенным контрольным эталоном. Далее, для того чтобы определить сухую массу клеток (СМК), пеллетировали аликвоты клеток и удаляли надосадочную жидкость. Сгусток клеток один раз промывали водой и затем высушивали в духовке при 80° C на протяжении 3 дней. Пробирки, содержащие сгустки клеток, взвешивали, вычитали из измеренной массы массу пробирки, а оставшуюся массу делили на изначальный объем каждого образца (0,0002 Л) чтобы получить СМК. Результаты ферментативного выращивания, анализа титров и сухой массы клеток обобщены в Таблице 37, приведенной ниже. При скрининговом исследовании 96-луночного планшета, когда проводили скрининг библиотеки LCW1160 конструкций RP11-XTEN-His8 без N-концевого хелпера (Пример 12, ФИГ. 86), уровень экспрессии LCW1160.006, конструкции с наибольшей экспрессией, составил только 50% от экспрессии конструкций LCW1159.004 или LCW1172.033 со вспомогательными последовательностями. Следовательно, ожидается, что конструкции XTEN с N-концевыми вспомогательными последовательностями приведут к существенно более высоким титрам

экспрессии по сравнению с конструкциями XTEN, не содержащими вспомогательных последовательностей.

Таблица 37: Измеренные параметры экспрессии

Группы XTEN	Ферментация #	Конечная О.П.	Общее время (часы)	Сухая масса клеток на литр ферм (г/Л)	Титр по объему культуры (г/Л)	Средний титр (микромоли/Л)	Титр / Сухая масса ферм (мг XTEN / г *E. coli*)	ММ (г/моль)	Титр (микромоли /Л)	Средний титр (микромоли/Л)	Ст. погрешность среднего (микромоли/Л)
Helper_ LCW1159.004 -RP11-AE288-His8 (AC767)	EC846	140	67,5	95	0,5	0,7	5,6	26399	212	271	76
	EC888	140	64	85	0,8		9,4	26399	357		
	EC903	136	69	103	0,7		6,4	26399	243		
Helper LCW1172.033 -RP11-AE576-His8 (AC780)	EC850	125	66	107	1,1	2,0	10,0	52929	189	388	182
	EC869	140	70	90	2,1		22,8	52929	430		
	EC883	170	67	102	2,9		28,8	52929	545		
Helper LCW1172.033 -RP11-AE864-His8 (AC786)	EC873	135	68	91	2,0	2,1	22,2	79284	280	272	41
	EC889	145	65,5	95	2,3		24,4	79284	308		
	EC913	108	67	108	2,0		18,1	79284	228		

[00490] Пример 14: Очистка XTEN с маркерами RP11 и His8

[00491] 1. Экспрессия, лизис и очистка

[00492] Гибридный белок MKNPEQAEEQAEEQREET-RP11-SASRSA-XTEN_AE432(C12,C217,C422)-SASRSA-His(8)] с N-концевой вспомогательной последовательностью представителя одной из библиотек LCW1159.004, описанного в Примере 10, с двумя аффинными маркерами, присоединенными к XTEN в N- и C-конце, соответственно, экспрессировали в *E.coli*, используя 4 Л биореактор и условия, описанные в данном тексте. После выращивания клетки собирали при помощи центрифугирования и замораживали при -80°C до использования. Сгусток клеток перерастворяли в лизисном буфере (20 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК pH 8,0, 3 мл буфера на грамм клеточной пасты). Клетки лизировали, трижды пропуская их через APV гомогенизатор при давлении в 830-900 бар. Лизисный буфер (1 мл буфера на грамм клеточной пасты) использовали в качестве вытеснителя, чтобы изъять остаточный объем из гомогенизатора. Гомогенизированный лизат инкубировали в водяной ванне при 85°C на протяжении 20 минут с последующим быстрым охлаждением в ванне с ледяной водой на протяжении 20 минут. После обработки нагреванием и охлаждением лизат центрифугировали на скорости 11000 об/мин на протяжении 90 минут в центрифуге SORVALL. После центрифугирования надосадочную жидкость профильтровывали

через два фильтра CUNO Bio cap 25 (BC0025L90SP08A). Очищенную надосадочную жидкость хранили при 4°C на протяжении ночи.

[00493] 2. Этап захвата: Toyopearl IMAC Хроматография

[00494] Аффинную хроматографию IMAC применяли в качестве этапа захвата для связывания XTEN с интактной С-концевой His- маркером. Вкратце, хроматографическую колонку BPG140/12 (GE Life Sciences) паковали 2000 мл 650 М смолы Toyopearl IMAC (TOSOH Biosciences). Колонку уравновешивали 2 объемами колонки (ОК) равновесного буфера (20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, pH 8,0). Очищенный клеточный лизат доводили до конечной концентрации NaCl в 500 мМ, используя 5 М маточного раствора NaCl, и затем загружали в IMAC смолу. Колонку промывали 2 объемами колонки равновесного буфера, а затем 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазола pH 8,0, а затем – 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 5 мМ имидазола pH 8,0 чтобы удалить соль. Элюирование проводили с 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ имидазола, pH 8,0. Профильтрованные, отмытые и элюированные фракции анализировали при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE/окрашивания Кумасси, а фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли.

[00495] 3. Этап полировки/захвата: MacroCap SP хроматография

[00496] На этапе полировки применяли катионообменную хроматографию для подтверждения N-концевой целостности продукта. Из нескольких катионообменных сред выбрали смолу MacroCap SP (GE Life Sciences) благодаря ее превосходной емкости и избирательности по отношению к продукту. 1000 мл смолы MacroCap SP паковали в хроматографическую колонку BPG100/13 (GE Life Sciences) и уравновешивали 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 20 мМ NaCl. Пул IMAC загружали в колонку, а смолу промывали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, pH 8,0 и 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 150 мМ NaCl. Белок элюировали с 5 объемами колонки линейного градиента от 150 до 500 мМ NaCl в 20 мМ фосфата натрия pH 8,0. Фракции собирали и анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли для следующего этапа.

[00497] 4. Расщепление трипсином элюционного пула Macrocap SP

[00498] Расщепление трипсином (сигма трипсин поджелудочной железы быка) элюционного пула SP проводили при соотношении фермент/белок 1:200 м/м на протяжении ночи при 37°C.

[00499] 5. Этап полировки: Macrocap Q хроматография

[00500] После расщепления трипсином отщепленные маркеры отделяли от конечного продукта при помощи Macrocap Q хроматографии. Колонку BPG100/19 (GE Life Sciences) паковали 1500

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

[00501] 6. Концентрирование и диафильтрация (получение конечного препарата)

[00502] Выбранные фракции Macrocap Q смешивали и концентрировали, используя 10 КД Pellicon mini (Millipore) при давлении подачи питания < 20 фунтов на кв. дюйм и ретентата < 8 фунтов на кв. дюйм, за чем следовала 10X диафильтрация 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0 до достижения конечной концентрации белка > 5 мг/мл.

[00503] 9. Анализ степени очистки белка, очищенного разными методами

[00504] Одну партию (Партия 1) очищали в три этапа очистки, как описано выше. Другую партию (Партия 2) очищали из того же самого ферментированного материала, но при этом пропускали этап полировки MacroCap SP. Процессированные группы XTEN детектировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром в элюционных фракциях MacroCap Q для Партии 2 (ФИГ. 87A), при этом в элюционных фракциях MacroCap Q для Партии 1 практически отсутствовали процессированные варианты (ФИГ. 87B). Данные результаты позволяют предположить, что в применяемых условиях этап MacroCap SP на основе маркера RP11 является существенным для подтверждения N-концевой целостности и общего качества продукта.

[00505] **Пример 15: Конструирование 1xAmino, 9xThiol-XTEN432**

[00506] Следующие группы праймеров 5Afor&CI1BbsIrev-TGGC, CI1BsaIfor-TGGC&CI2-AE38BbsIrev и CI2-AE38BsaIfor&AatIICI3-2P применяли для проведения ПЦР плазмиды pCW1164, содержащей XTEN_AE432 (C422), для получения продуктов ПЦР AE-CI1, CI1-2 и CI2-3, соответственно. CI1, 2&3 обозначали как Cysteine Island1 (Участок цистеина1), 2&3, содержащие одинаковую аминокислотную последовательность TAEAAGCGTAEAA, но с использованием разных кодонов. Очистку гелем продуктов ПЦР проводили для получения полос необходимых размеров, которые расщепляли рестрикционными ферментами SbfI/BbsI, BsaI/BbsI и BsaI/AatII, соответственно, для получения вставок. Расщепление плазмиды pCW1164, которая кодирует ген N-term-RP11-R-XTEN_AE432 (C422)-R-H8, проводили при помощи SbfI/AatII, для того, чтобы удалить фрагмент, состоящий приблизительно из 290

аминокислот в пределах XTEN_AE432, а очистку гелем проводили для получения оставшегося крупного фрагмента в качестве вектора. Проводили лигирование вектора с тремя вставками из продуктов ПЦР, как описано выше, и использовали для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-XTEN_AE432 (C319, C370, C422)-R-H8. Для этой конструкции проводили ПЦР с праймерами CI1BsaIfor-TGGC&AatIICI3-2P для получения продукта ПЦР длиной приблизительно в 360 п.н.о. Проводили очистку гелем полосы с необходимым размером, за которой следовало расщепление при помощи BsaI/AatII, как вставки XTEN_AE120-3Cys, которая содержит три участка цистеина.

[00507] В то же время проектировали и синтезировали (Genscript) кодон-оптимизированный фрагмент ДНК XTEN_AE313-6Cys, содержащий шесть участков цистеина. Фрагмент расщепляли фланкирующими рестрикционными ферментами BsaI/BbsI и очищали гелем для получения вставки, содержащей шесть первых участков цистеина XTEN_AE432. Расщепление плазмиды pCW1161, которая кодирует ген N-term-RP11-R-XTEN_AE432_3Cys-R-H8, проводили при помощи BsaI/AatII, для того, чтобы удалить фрагмент XTEN_AE432_3Cys, а очистку гелем проводили для получения крупного фрагмента в качестве вектора. Проводили лигирование вектора с расщепленной BsaI/BbsI вставкой XTEN_AE313-6Cys и расщепленной BsaI/AatII вставкой XTEN_AE120-3Cys, как описано выше. Лигированный продукт использовали для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-XTEN_AE432 (C12, C63, C114, C165, C217, C268, C319, C370, C422)-R-H8. Конструкцию проектировали для получения предшественника N-term-RP11-R-AE432_9Cys-R-H8 (последовательность в Таблице 38, ниже), продукт которого использовали для создания 1xAmino, 9-Thio-XTEN432 после удаления маркера N-term-RP11 и маркера C-term 8xHis при помощи расщепления трипсином. Конечный продукт содержал девять цистеинов в последовательности XTEN432 (Seg 177).

Таблица 38: ДНК- и аминокислотная последовательность для 1xAmino, 9-Thio-XTEN432

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
N-term-RP11-R-AE432_9Cys-R-H8	ATGAAAAACCCAGAGCAAGCAGAAGAACAAGCTGAAG	MKNPEQAEEQAEE
	AACAGCGCGAAGAAACACGTCCGCGTCCTCGCCCACGT	QREETRPRPRPRP
	CCACGTCCGCGTCCACGCCCTCGTCCTCGTCCGCGCCCT	RPRPRPRPRPRPR
	CGTCCGagcgcgtctcgttccgctGGGTCTCCAACGGCAGAGGCA	PSASRSAGSPTAE
	GCAGGTTGTGGTACAGCAGAAGCAGCTCCGGGTAGCGA	AAGCGTAEAAPGS
	GCCTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGA	EPATSGSETPGTS
	ATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCAGAGCCGGC	ESATPESGPGSEP
	GACGAGCGGTTCGGAAACGCCGGGTACTGCTGAAGCGG	ATSGSETPGTAEA
	CTGGTTGTGGTACTGCTGAAGCTGCATCGACCGAACCAA	AGCGTAEAASTEP
	GCGAAGGTTCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACC	SEGSAPGTSESAT
	CCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACC	PESGPGSPAGSPT
	AGCACCGAAGAAGGTTCCCCTGCTACTGCCGAAGCTGCA	STEEGSPATAEAA
	GGCTGCGGTACTGCGGAGGCGGCGTCCCCAACTTCTACT	GCGTAEAASPTST

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
	GAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCCAGAAAGCGG	EEGTSESATPESG
	TCCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACC	PGTSTEPSEGSAP
	AGGCACTTCTGAGTCTGCTACTACCGCCGAAGCCGCTGG	GTSESATTAEAAG
	TTGTGGTACCGCAGAAGCTGCATCTGAGACTCCAGGCAC	CGTAEAASETPGT
	TTCTGAGTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCCTGGTTCTGA	SESATPESGPGSE
	ACCAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCCCAGGTACCTCTGA	PATSGSETPGTSE
	GTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTACCGCGGAAGCGGCTGG	SATPESGTAEAAG
	TTGTGGTACTGCAGAGGCAGCTGGTTCTCCGGCTGGTAG	CGTAEAAGSPAGS
	CCCGACCAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAA	PTSTEEGTSESAT
	CGCCGGAATCGGGCCCAGGTTCGGAGCCTGCAACGTCTG	PESGPGSEPATSG
	GCAGCGAAACCCCGGGTACCACGGCGGAAGCGGCAGGT	SETPGTTAEAAGC
	TGTGGCACCGCGGAGGCAGCAGCTGGTTCTCCAACCTCT	GTAEAAAGSPTST
	ACCGAGGAGGGTTCACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCAC	EEGSPAGSPTSTE
	TGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTG	EGTSTEPSEGSAP
	CTCCGGGTACGAGCGAGAGCACGGCAGAAGCCGCTGGCt	GTSESTAEAAGCG
	gcGGTACTGCTGAAGCGGCAACCCCTGAGAGCGGCCCAG	TAEAATPESGPGT
	GTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTA	SESATPESGPGSE
	GCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGG	PATSGSETPGSEP
	AACCAGCGACCAGCGGTACCGCTGAAGCCGCAGGTtgtGG	ATSGTAEAAGCGT
	CACTGCGGAAGCTGCAACCGAAGAGGGTACCAGCACGG	AEAATEEGTSTEP
	AACCGAGCGAGGGTTCTGCCCCGGGTACTTCCACCGAAC	SEGSAPGTSTEPS
	CATCGGAGGGCTCTGCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGT	EGSAPGSEPATSG
	CTGGTTCTGAAACGCCGACTGCAGAAGCGGCTGGTtgtGG	SETPTAEAAGCGT
	CACCGCCGAAGCAGCTagcgcctctcgctccgcaCATCACCATCA	AEAASASRSAHHH
	CCACCATCATCACTAA	HHHHH

[00508] Пример 16: Конструирование 1xAmino, 9xThiol-XTEN864

[00509] Праймеры PhoAfor&RP11-SASRSABsaIrevAGGT применяли для проведения ПЦР плазмиды, содержащей маркер N-term-RP11 для получения продуктов ПЦР N-term-RP11-R. Проводили очистку гелем полосы необходимого размера и расщепляли ее при помощи NdeI/BsaI для получения первой вставки. Другую ПЦР проводили с праймерами AE432BsaIforAGGT&AE432_001BbsIrev-AACG для плазмиды, содержащей XTEN_AE864_003 для получения продуктов ПЦР XTEN_AE432. Проводили очистку гелем полосы необходимого размера, которую затем расщепляли при помощи BsaI/BbsI для получения второй вставки. Расщепление конструкции N-term-RP11-R-AE432_9Cys-R-H8 из Примера 10 проводили при помощи NdeI/BsaI для того чтобы удалить фрагмент N-term-RP11-R, а очистку гелем проводили для получения крупного фрагмента в качестве вектора. Проводили лигирование вектора с первой и второй вышеописанными вставками, а полученный продукт использовали для трансформации компетентных клеток BL21 для того, чтобы получить конструкцию N-term-RP11-R-XTEN_AE864 (C444, C495, C546, C597, C649, C700, C751, C802, C854)-R-H8. Полученную в результате конструкцию расщепляли для получения предшественника N-term-RP11-R-AE864_9Cys-R-H8 (последовательность в Таблице 39, ниже), продукт которого позволяет создавать 1xAmino, 9-Thio-XTEN864 после удаления маркера N-term-RP11 и маркера

C-term 8xHis при помощи расщепления трипсином. Конечный продукт содержал N-концевую аминогруппу и девять цистеинов в последовательности XTEN864 для конъюгации (Seg 175).

Таблица 39: ДНК- и аминокислотная последовательность для 1xAmino, 9-Thio-XTEN864

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
N-term-RP11-R-AE864_9Cys-R-H8	ATGAAAAACCCAGAGCAAGCAGAAGAACAAGCTGAAG	MKNPEQAEEQAEE
	AACAGCGCGAAGAAACACGTCCGCGTCCTCGCCCACGT	QREETRPRPRPRP
	CCACGTCCGCGTCCACGCCCTCGTCCTCGTCCGCGCCCT	RPRPRPRPRPRPR
	CGTCCGagcgcgtctcgttccgctGGGTCTCCAGGTAGCCCAGCTG	PSASRSAGSPGSP
	GTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCG	AGSPTSTEEGTSE
	CTACTCCAGAATCCGGTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAA	SATPESGPGTSTE
	GCGAAGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCCTA	PSEGSAPGSPAGS
	CCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAG	PTSTEEGTSTEPS
	GGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGC	EGSAPGTSTEPSE
	AGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAATCC	GSAPGTSESATPE
	GGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACT	SGPGSEPATSGSE
	CCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCA	TPGSEPATSGSET
	GGTTCACCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGG	PGSPAGSPTSTEE
	TACCTCTGAGTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCAC	GTSESATPESGPG
	GAGCACCGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGGTACCA	TSTEPSEGSAPGT
	GCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCCG	STEPSEGSAPGSP
	GCGGGCTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGTCCACT	AGSPTSTEEGTST
	GAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCAGCACTGA	EPSEGSAPGTSTE
	ACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTG	PSEGSAPGTSESA
	CGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCA	TPESGPGTSTEPS
	AGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACC	EGSAPGTSESATP
	CCAGAATCTGGCCCGGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGT	ESGPGSEPATSGS
	TCTGAAACCCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGT	ETPGTSTEPSEGS
	AGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCC	APGTSTEPSEGSA
	GCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGC	PGTSESATPESGP
	CCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCGGTCCA	GTSESATPESGPG
	GGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC	SPAGSPTSTEEGT
	ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCCTGGCTCC	SESATPESGPGSE
	GAACCTGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCG	PATSGSETPGTSE
	GAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCAC	SATPESGPGTSTE
	GGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACTG	PSEGSAPGTSTEP
	AGCCTTCTGAGGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACGGAAC	SEGSAPGTSTEPS
	CTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCAT	EGSAPGTSTEPSE
	CCGAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCACGGAACCGTCC	GSAPGTSTEPSEG
	GAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCGTCGGA	SAPGTSTEPSEGS
	GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCGGGCTCTCCGACAA	APGSPAGSPTSTE
	GCACCGAAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCCGAAGGT	EGTSTEPSEGSAP
	TCCGCACCAACGGCAGAGGCAGCAGGTTGTGGTACAGC	TAEAAGCGTAEAA
	AGAAGCAGCTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAGCGGTT	PGSEPATSGSETP
	CTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGT	GTSESATPESGPG
	CCGGTCCAGGTTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCGGAA	SEPATSGSETPGT
	ACGCCGGGTACTGCTGAAGCGGCTGGTTGTGGTACTGCT	AEAAGCGTAEAAS
	GAAGCTGCATCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCGGCACC	TEPSEGSAPGTSE
	GGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGG	SATPESGPGSPAG
	GCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGT	SPTSTEEGSPATA
	TCCCCTGCTACTGCCGAAGCTGCAGGCTGCGGTACTGCG	EAAGCGTAEAASP
	GAGGCGGCGTCCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCT	TSTEEGTSESATP
	GAGTCCGCTACCCCAGAAAGCGGTCCTGGTACCTCCACT	ESGPGTSTEPSEG
	GAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCTGAGTCT	SAPGTSESATTAE
	GCTACTACCGCCGAAGCCGCTGGTTGTGGTACCGCAGAA	AAGCGTAEAASET

Название клона	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность
	GCTGCATCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACG	PGTSESATPESGP
	CCTGAATCCGGTCCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGC	GSEPATSGSETPG
	AGCGAAACCCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAG	TSESATPESGTAE
	TCTGGTACCGCGGAAGCGGCTGGTTGTGGTACTGCAGAG	AAGCGTAEAAGSP
	GCAGCTGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACCAGCACGGAG	AGSPTSTEEGTSE
	GAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCC	SATPESGPGSEPA
	AGGTTCGGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAAACCCCGG	TSGSETPGTTAEA
	GTACCACGGCGGAAGCGGCAGGTTGTGGCACCGCGGAG	AGCGTAEAAAGSP
	GCAGCAGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTCA	TSTEEGSPAGSPT
	CCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAG	STEEGTSTEPSEG
	CACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCG	SAPGTSESTAEAA
	AGAGCACGGCAGAAGCCGCTGGCtgcGGTACTGCTGAAG	GCGTAEAATPESG
	CGGCAACCCCTGAGAGCGGCCCAGGTACTTCTGAGAGC	PGTSESATPESGP
	GCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACC	GSEPATSGSETPG
	TCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAACCAGCGACCAGC	SEPATSGTAEAAG
	GGTACCGCTGAAGCCGCAGGTtgtGGCACTGCGGAAGCTG	CGTAEAATEEGTS
	CAACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGT	TEPSEGSAPGTST
	TCTGCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCT	EPSEGSAPGSEPA
	GCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACG	TSGSETPTAEAAG
	CCGACTGCAGAAGCGGCTGGTtgtGGCACCGCCGAAGCAG	CGTAEAASASRSA
	CTagcgcctctcgctccgcaCATCACCATCACCACCATCATCACTA A	HHHHHHHH

[00510] Пример 17: Ферментация XTEN для конъюгации

[00511] Стартовые культуры получали путем инокуляции исходных глицероловых растворов *E. coli*, несущей плазмиду, содержащую подходящие XTEN для конъюгации белковых последовательностей, в 125 мЛ ЛБ-среды, содержащей 50 мкг/мЛ канамицина. Затем культуры встряхивали на протяжении ночи при 37°C. Стартовую культуру применяли для инокуляции 2 Л среды для периодической ферментации, содержащей ~12,5 г сульфата аммония, 15 г безводного двухосновного фосфата калия, 2,5 г дигидрата цитрата натрия; 8,5 г моногидрата одноосновного фосфата натрия; 50 г соевого пептона NZ BL4 (Kerry Bioscience #5X00043); 25 г экстракта дрожжей (Teknova #Y9020); 1,8 Л воды; 0,5 мЛ полипропиленгликоля; 2,5 мЛ раствора следовых элементов (Amunix recipe 144-1); 17,5 мЛ 1М сульфата магния; и 2 мЛ канамицина (50 мг/мЛ)- в 5 Л стеклянном сосуде с рубашкой с B контроллером B. Braun Biostat. Настройки управления ферментацией были следующими: pH = 6,9 +/- 0,1; dO_2 = 10%; каскад растворенного кислорода в режиме перемешивания в диапазоне 125 – 1180 об/мин; поток воздуха 5 литров в минуту с 90% кислорода; начальная температура 37°C; основной контроль 13% гидроксид аммония; отсутствие кислотного контроля. После 6 часов культивирования инициировали подпитку 50% глюкозой при скорости 30 г/ч. После 20 часов культивирования добавляли 25 мЛ 1М сульфата магния и 3 мЛ 1М ИПТГ. После истечения общего времени ферментации в 45 часов культуру собирали при помощи центрифугирования, получая сгустки из клеток в 0,45-1,1 килограмма влажной массы для всех конструкций. Сгустки хранили замороженными при -80°C до дальнейшего использования. Образцы культур

брали в разные временные точки на протяжении процесса ферментации, клетки лизировали, затем клеточный дебрис флоккулировали при помощи нагревания и быстрого охлаждения, очищенные растворимые лизаты готовили для центрифугирования и анализировали при помощи невосстанавливающего SDS-PAGE в постоянном поле с применением NuPAGE 4-12% Bis-Tris геля от Invitrogen согласно инструкции производителя с окрашиванием Кумасси. Пример накопления гибридного белка XTEN как функции от времени ферментации показан на ФИГ. 45. Результаты показывают, что гибридные белковые конструкции XTEN экспрессировались при ферментации с титрами > 1 г/Л, с кажущейся молекулярной массой, составляющей около 160 кДа (заметка: фактическая молекулярная масса составляет 100 кДа. Наблюдаемая миграция в SDS-PAGE была сравнима с той, которую наблюдали для других XTEN-содержащих гибридных белков).

[00512] Пример 18: Очистка реагента 1xThiol-XTEN (цистеин-сконструированный XTEN) при помощи меток CBD и His8

[00513] Данный пример описывает очистку цистеин-сконструированного XTEN, содержащего один остаток цистеина.

[00514] Материала и методы:

[00515] 1. Очистка

[00516] 20 г клеточной пасты, полученной при ферментации, перерастворяли в 100 мл 20 мМ фосфата натрия, pH 8,0 (лизисный буфер). Лизат клеток трижды гомогенизировали в гомогенизаторе при приблизительно 800-900 барах. 50 мл лизисного буфера использовали в качестве вытеснителя, чтобы изъять остаточный объем из гомогенизатора. Гомогенизированный лизат инкубировали в водяной ванне при 85°C на протяжении 20 минут с последующим быстрым охлаждением в ванне с ледяной водой на протяжении 20 минут. После обработки нагреванием и охлаждением лизат центрифугировали при 11000 об/мин на протяжении 90 минут в центрифуге SORVALL. После центрифугирования надосадочную жидкость профильтровывали через два фильтра CUNO Bio cap 25 (BC0025L90SP08A). Фильтры прочищали при помощи 40 мл лизисного буфера. Конечный объем очищенного материала составил 230 мл. Очищенную надосадочную жидкость хранили при 4°C на протяжении ночи.

[00517] 2. Этап захвата: Хроматография с гидрофобным взаимодействием

[00518] Хроматографию с гидрофобным взаимодействием применяли на первом этапе, используя гидрофобный маркер CBD для XTEN для подтверждения захвата N-концевого интактного белка. Для пакования XK16 до высоты слоя в 15 см (30 мл объема колонки) использовали Toyopearl Phenyl 650M (Part # 0014783, TOSOH Bioscience). Хроматографию проводили, используя AKTA FPLC (GE Biosciences). Перед загрузкой смолу Toyopearl Phenyl

уравновешивали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 1 М сульфата натрия, pH 8,0. Нагрузку HIC готовили путем добавления сульфата натрия до концентрации 1 М в очищенный вышеприведенным способом лизат (конечный объем ~ 250 мл). Образец загружали на смолу HIC (~ 4 мг/мл нагрузки из смолы) при 2 мл/мин. Загрузку завершали заполнением ~ 9 объемами колонки равновесного буфера (20 мМ фосфата натрия, 1 М сульфата натрия, pH 8,0) до того момента, пока UV215 был стабильным. Белок поэтапно элюировали при помощи 100% B (20 мМ фосфата натрия, pH 8,0). Для подтверждения полного элюирования применяли в общем счете 7 объемов колонки элюционного буфера (ФИГ. 46).

[00519] Образцы анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE (невосстанавливающего) для определения элюционного пула (ФИГ. 47). На основании последующего элюирования в геле фракции E1, E2, E3 и E4 были отобраны для дальнейшей обработки. Общее количество белка было оценено в 85 г в элюционном пуле HIC с 65% выходом на этапе, определенном путем прогонки другого количественного геля.

[00520] 3. Этап полировки/захвата: Toyopearl IMAC хроматография

[00521] На этапе захвата применяли аффинную хроматографию IMAC для связывания с интактной С-концевой His- маркером XTEN. Хроматографическую колонку XK26 паковали Toyopearl IMAC 650 M (Part # 0014907, TOSOH Biosciences) с высотой слоя в 15 см (85 мл объема колонки). Колонку уравновешивали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ имидазола, 0,25 М NaCl, pH 8,0 (равновесный буфер). Нагрузку IMAC готовили, добавляя 5 М NaCl в элюционный пул HIC чтобы получить 0,25 М NaCl в конечном объеме. Образец загружали на смолу IMAC при скорости потока в 4 мл/мин. Загрузку завершали 2 объемами колонки равновесного буфера. Смолу промывали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ имидазола, pH 8,0 для удаления соли. Линейное элюирование проводили от 0 до 100%B в 7 объемах колонки с буфером А (20 мМ фосфата натрия, 10 мМ имидазола, pH 8,0) и буфером В (20 мМ фосфата натрия, 200 мМ имидазола, pH 8,0) с последующим добавлением 2 объемов колонки 100% B. Наличие имидазола обуславливало поглощение на UV 215, составляющее около 3500 мЕа с AKTA FPLC, поэтому элюционный пик не наблюдали. Профильтрованные, отмытые и элюированные фракции анализировали при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE геля (ФИГ. 48). Гель показал успешное удаление белка клеток-хозяев и процессированные группы XTEN (ФИГ. 48А). Фракции С5, С6 и С7 объединяли на основе данных по второму гелю (ФИГ. 48В). Всего в элюционном пуле IMAC было обнаружено 70 мг белка.

[00522] 4. Расщепление трипсином элюционного пула IMAC

[00523] Расщепление трипсином элюционного пула IMAC проводили в соотношении 1:200 м/м. 0,35 мг трипсина из поджелудочной железы быка (Sigma, cat # T1426) инкубировали

вместе с 70 мг белка (элюционный пул IMAC) на протяжении ночи при 37°C. Анализ при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE проводили для подтверждения того, что расщепление маркера CBD было полным, как показано на ФИГ. 49.

[00524] 5. Этап полировки: MacroCap Q хроматография

[00525] После расщепления трипсином отщепленные маркеры отделяли при помощи MacroCap Q хроматографии. Колонку XK 16 паковали MacroCap Q (GE Life Sciences, Cat# 17-5469-02) с высотой слоя в 18 см. Расщепленный трипсином элюционный пул IMAC инкубировали на протяжении 1 часа при 37°C с 2 мМ ТХЭФ для снижения количества димеров XTEN перед загрузкой в колонку MacroCap Q. Колонку уравновешивали 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. Образец загружали при 4 мл/мин (~ 2 мг/мл нагрузки смолой). Загрузку колонки завершали добавлением 2 объемов колонки 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ pH 7,0. Колонку промывали 2 объемами колонки (20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, 150 мМ NaCl pH 7,0). Проводили линейное градиентное элюирование от 150 мМ NaCl до 500 мМ NaCl в буфере из 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, pH 7,0 в 20 объемах колонки. UV 215 наблюдали на высоком уровне на протяжении всего процесса хроматографии (ФИГ. 50) благодаря наличию ТХЭФ, но при этом наблюдали элюционный пик от 22 до 30 мСм/см. Все образцы анализировали при помощи SDS-PAGE, окрашивания серебром и C18 RP-HPLC. Удаление расщепленных CBD наблюдали в профильтрованных образцах (ФИГ. 51A), в то время как слабоинтенсивные полосы XTEN наблюдали в элюционных фракциях (ФИГ. 51B) в элюционных фракциях E11, E12, F12, F11, F10… F6. Отделение процессированных групп XTEN наблюдали при помощи окрашивания серебром в более ранних элюционных фракциях E11, E12, F12 и F11 как в группах, мигрирующих быстрее, чем основной полипептид XTEN (ФИГ. 51C). На основании вышеприведенных результатов элюционные фракции дополнительно анализировали при помощи C18 RP-HPLC. На ФИГ. 52 показана группа профилей RP-HPLC анализа. Более ранние элюционные фракции имеют широкое главное плечо, указывающее на существенное присутствие процессированных групп. Также эти более ранние элюционные фракции (E12, F12 и F11) обогащали протеолизисными маркерами. На основе вышеприведенного анализа были объединены элюционные фракции F10, F9, F8, F7 и F6. Элюционный пул снова анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 53). Обнаружили, что очищенный белок был очищен на 97,5%.

[00526] 6. Концентрирование и диафильтрация (получение конечного препарата)

[00527] Вышеупомянутый пул MacroCap Q концентрировали при помощи центрифуги Amicon Ultracel-15 (НОММ 10к) до 5 мл с последующей 7X диафильтрацией с 20 мМ ГЭПЭС pH 7,0 до конечной концентрации белка, составляющей 8,13 мг/мл. Всего из 20 г сгустка клеток было очищено 43 мг белка. Общее выделение для трех этапов хроматографии оценили в ~ 33%.

[00528] Пример 19: Очистка реагента 1xAmino-XTEN с маркерами CBD и His8

[00529] Очистку амино-XTEN проводили практически таким же способом, который описан для очистки 1xThiol-XTEN, содержащего один цистеин (для подробностей смотрите Пример 15). 20 г клеточной пасты, полученной при ферментации, гомогенизировали в 100 мл 20 мМ фосфата натрия, pH 8,0 (лизисный буфер), обрабатывали теплом и очищали при помощи центрифугирования и фильтрации. Хроматографию с гидрофобным взаимодействием применяли на первом этапе для захвата N-концевого интактного белка. (ФИГ. 54). Фракции E2, E3 и E4 объединяли для дальнейшей обработки. Аффинную хроматографию IMAC использовали на этапе захвата для связывания интактного C-концевого His- маркера XTEN (ФИГ. 55). Фракции E2 и E3 объединяли. Расщепление трипсином элюционного пула IMAC проводили в соотношении 1:200 м/м на протяжении ночи при 37°C. После этого отщепленные трипсином маркеры отделяли при помощи MacroCap Q хроматографии. Фракции анализировали при помощи SDS-PAGE с последующим окрашиванием серебром (ФИГ. 56) и C18 RP-HPLC (ФИГ. 57). На основе вышеприведенного анализа были объединены элюционные фракции C10, C11 и C12. Элюционный пул анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 58). Было обнаружено, что белок очищен на >98%. Пул MacroCap Q концентрировали при помощи центрифуги Amicon Ultracel-15 (НОММ 10к) при 3000 об/мин до 5 мл с последующей 7X диафильтрацией при помощи 20 мМ ГЭПЭС pH 7,0 до конечной концентрации белка в 5,35 мг/мл.

[00530] Пример 20: Очистка и оценка системы RP11/His8-XTEN с двумя маркерами

[00531] Используя вышеописанные экспрессионные векторы, конструировали белки XTEN с двумя маркерами для кодирования гибридных белков со следующими аминокислотными последовательностями или компонентами:
MKIKTGARILALSALTTMMFSASALAAPTTAGAG-Tag-XTEN_AE869(Am1)-RHHHHHHHH, где: MKIKTGARILALSALTTMMFSASALA является распознающей последовательностью MalE, которая отщепляется от экспрессируемого полипептида и транспортируется в периплазму клетки-хозяина, APTTAGAG является спейсером, а маркер выбран из следующих (название маркера сопровождается последовательностью в скобках): RP5 (RPRPRPRPRPGR); RP7 (RPRPRPRPRPRPRPGR); KP5 (KPKPKPKPKPGR); RP9 (RPRPRPRPRPRPRPRPRPGR); RP11 (RPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPGR); P5K4P9 (RPRPKPRPKPRPKPRPKPGR); и R6K5P11 (RPRPKPRPKPRPKPRPKPRPKPGR). Были созданы все вариации конструкций с маркерами, а белки экспрессировались в *E.coli*, при помощи описанных в Примере 15 методов. Из клетки-хозяина получали растворимые экстракты для проведения анализа при помощи SDS-PAGE/окрашивания Кумасси. Согласно анализу, длина и аминокислотный состав N-концевого маркера не оказывали существенного влияния на экспрессию белка (смотрите ФИГ. 59) в

случае экспрессии конструкций с маркерами RP7, RP9, RP11 и R6K5P11. Экспрессируемые белки с белковыми маркерами RP5, RP7, RP9 и RP11 дополнительно исследовали на предмет связывания со смолой MacroCap SP. Белки с более длинными маркерами связывались более эффективно с катионообменной смолой, а оставшиеся связывались в более жестких отмывочных условиях. Таким образом, маркер RP11 выбрали в качестве N-концевого маркера для очистки XTEN при помощи катионообменной хроматографии. Дополнительный эксперимент показал, что полипептид RP11-XTEN-His8 эффективно экспрессировался в биореакторе, а большая часть экспрессируемого белка была обнаружена в клеточном сгустке (ФИГ. 60).

[00532] Пример 21: Очистка реагента системы 1xAmino-XTEN с двумя маркерами RP11/H8

[00533] 1. Экспрессия

[00534] Предшественник RP11-XTEN-His8 для 1xAmino-XTEN получали путем экспрессии в трансформированных *E. coli*, применяя вышеописанную 4 Л реакцию ферментации. Клетки собирали при помощи центрифугирования и замораживали при -80°C до использования.

[00535] 2. Лизис и очистка

[00536] 25 г клеточной пасты перерастворяли в 75 мЛ 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК. Лизис проводили путем трехкратного пропускания перерастворенной пасты через гомогенизатор при 800-900 барах. Гомогенат выдерживали при 85°C в водяной ванне на протяжении 15 мин перед тем, как быстро охладить, используя ледяную/водяную ванну, пока температура не падала ниже 10°C. Затем обработанный гомогенат центрифугировали при 10, 000 об/мин на роторе SLA-3000 на протяжении 60 минут. Надосадочную жидкость собирали и фильтровали, используя 0,22 мкм фильтрующую насадку.

[00537] 3. Этап катионообменного захвата

[00538] На этапе захвата применяли катионообменную хроматографию для подтверждения N-концевой целостности продукта. Из нескольких катионообменных сред выбрали смолу MacroCap SP (GE Life Sciences) благодаря ее превосходной емкости и избирательности по отношению к продукту. 20 мЛ колонку MacroCap SP паковали в среду Redi-Sep и уравновешивали буфером из 20 мМ фосфата натрия (pH 8,0), 20 мМ NaCl. Лизат загружали в колонку при помощи гравитации. Три объема колонки (ОК) 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 100 мМ NaCl применяли на этапе отмывки перед тем, как проводить этап элюирования белка с 3 ОК 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 500 мМ NaCl. Половину фракций ОК (10 мЛ) собирали для элюатов и анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE (ФИГ. 61). Элюционные фракции 2-4 объединяли для последующего этапа хроматографии.

[00539] 4. Этап полировки IMAC

[00540] 20-мЛ колонку ToyoPearl AF-Chelate паковали в колоночную среду Redi-Sep и заряжали 100 мМ сульфата никеля. Колонку уравновешивали 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 500 мМ NaCl перед тем как загружать пул MacroCap SP в колонку при помощи гравитации. Применяли два отмывочных этапа, используя буфер из 20 мМ фосфата натрия (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазола, а затем – 20 мМ фосфата натрия (pH 8,0), 5 мМ имидазола. Затем продукт элюировали из колонки, используя 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ имидазола, а половину фракций ОК (10 мЛ) собирали для 4 ОК элюата. Образцы на каждом этапе исследовали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE (ФИГ. 62). На основе данных по гелю элюаты 2 и 3 объединяли для дополнительной обработки. Общий выход составил 30%.

[00541] 5. Расщепление трипсином элюционного пула IMAC

[00542] Расщепление трипсином элюционного пула IMAC проводили в соотношении 1:200 и 1:500 м/м путем добавления 1 мг/мЛ бычьего трипсина (Sigma, Cat # T1426, трипсин из поджелудочной железы быка) в пул IMAC. Реакционную смесь выдерживали при 37°C на протяжении ночи, а завершение расщепления подтверждали при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF. Образцы до и после расщепления анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS/PAGE с окрашиванием Кумасси и серебром (ФИГ. 63). Менее интенсивное окрашивание в окрашенном Кумасси геле, а также сдвиг по молекулярной массе для образцов после расщепления по сравнению с образцами до расщепления указывает на успешное удаление как N- , так и С-концевых меток. В окрашенном серебром геле после расщепления наблюдали гомогенные полосы, предполагающие отсутствие в образце процессированных групп, подтверждая вывод о том, что система с двумя маркерами RP11/H8 и методы очистки обеспечивают гомогенный конечный продукт XTEN.

[00543] **Пример 22: Очистка XTEN с аффинными маркерами RP11 и His8**

[00544] 1. Экспрессия

[00545] Гибридный белок RP11-XTEN-His8 с двумя аффинными маркерами, присоединенными к XTEN в N- и С-концах, соответственно, экспрессировался в E.coli с применением 4 Л реакции ферментации с вышеописанными условиями.

[00546] 2. Лизис и очистка

[00547] После выращивания клетки собирали при помощи центрифугирования и замораживали при -80°C до использования. Клеточный сгусток перерастворяли в лизисном буфере (20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 50 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК pH 8,0, 3 мл буфера на грамм клеточной пасты). Клетки лизировали, трижды пропуская их через гомогенизатор APV при давлении в 830-900 бар. Лизисный буфер (1 мл буфера на грамм клеточной пасты) использовали в качестве вытеснителя, чтобы изъять остаточный объем из гомогенизатора. Гомогенизированный лизат инкубировали в водяной ванне при 85°C на протяжении 20 минут, а

затем быстро охлаждали в ванне с ледяной водой на протяжении 20 минут. После обработки нагреванием и охлаждением лизат центрифугировали на скорости 11000 об/мин на протяжении 90 минут в центрифуге SORVALL. После центрифугирования надосадочную жидкость профильтровывали через два фильтра CUNO Bio cap 25 (BC0025L90SP08A). Очищенную надосадочную жидкость хранили при 4°C на протяжении ночи.

[00548] 3. Этап захвата: Toyopearl IMAC Хроматография

[00549] Аффинную хроматографию IMAC применяли в качестве этапа захвата для связывания XTEN с интактным С-концевым His-маркером. Вкратце, хроматографическую колонку BPG140/12 (GE Life Sciences) паковали 2000 мл 650 М смолы Toyopearl IMAC (TOSOH Biosciences). Колонку уравновешивали 2 объемами колонки (ОК) равновесного буфера (20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, pH 8,0). Очищенный клеточный лизат доводили до конечной концентрации NaCl в 500 мМ, используя 5 М маточного раствора NaCl, и затем загружали в IMAC смолу. Колонку промывали 2 объемами колонки равновесного буфера, а затем 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазола pH 8,0, а затем – 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 5 мМ имидазола pH 8,0, чтобы удалить соль. Элюирование проводили с 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 100 мМ имидазола, pH 8,0. Профильтрованные, отмытые и элюированные фракции анализировали при помощи невосстанавливающего 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE/окрашивания Кумасси, а фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли.

[00550] 4. Этап полировки/захвата: MacroCap SP хроматография

[00551] На этапе полировки применяли катионообменную хроматографию для подтверждения N-концевой целостности продукта. Из нескольких катионообменных сред выбрали смолу MacroCap SP (GE Life Sciences) благодаря ее превосходной емкости и избирательности по отношению к продукту. 1000 мл смолы MacroCap SP паковали в а хроматографическую колонку BPG100/13 (GE Life Sciences) и уравновешивали 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 20 мМ NaCl. Пул IMAC загружали в колонку, а смолу промывали 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия, 50 мМ NaCl, pH 8,0 и 2 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия pH 8,0, 150 мМ NaCl. Белок элюировали с 5 объемами колонки линейного градиента от 150 до 500 мМ NaCl в 20 мМ фосфата натрия pH 8,0. Фракции собирали и анализировали при помощи 4-12% Bis-Tris SDS/PAGE. Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли для следующего этапа.

[00552] 5. Расщепление трипсином элюционного пула Macrocap SP

[00553] Расщепление трипсином (сигма трипсин поджелудочной железы быка) элюционного пула SP проводили при соотношении фермент/белок 1:200 м/м на протяжении ночи при 37ºC.

[00554] 6. Этап полировки: Macrocap Q хроматография

[00555] После расщепления трипсином отщепленные маркеры отделяли от конечного продукта при помощи Macrocap Q хроматографии. Колонку BPG100/19 (GE Life Sciences) паковали 1500 мл объема колонки смолы Macrocap Q (GE Life Sciences). Расщепленный трипсином элюционный пул Macrocap SP инкубировали на протяжении 15 мин при 80° С с 20 мМ ДТТ и 2 мМ ЭДТК для того чтобы восстановить дисульфидные связи и инактивировать трипсин. Охлажденный белковый раствор разбавляли до проводимости ниже 5 мСм/см водой Milli-Q и загружали в колонку Macrocap Q, уравновешенную 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0. Колонку промывали 2 объемами колонки 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0, затем – 2 объемами колонки 20 мМ ГЭПЭС, 2 мМ ТХЭФ, 150 мМ NaCl pH 7,0. Белок элюировали с линейным градиентом от 150мМ NaCl до 500 мМ NaCl в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0 в 20 объемах колонки. Фракции анализировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром.

[00556] 7. Концентрирование и диафильтрация (получение конечного препарата)

[00557] Выбранные фракции Macrocap Q смешивали и концентрировали, используя 10 КД Pellicon mini (Millipore) при давлении подачи питания < 20 фунтов на кв. дюйм и ретентата < 8 фунтов на кв. дюйм, за чем следовала 10X диафильтрация 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,0 для достижения конечной концентрации белка > 5 мг/мл.

[00558] 8. Анализ степени очистки белка, очищенного разными методами

[00559] Одну партию (Партия 1) очищали в три этапа очистки, как описано выше. Другую партию (Партия 2) очищали из того же самого ферментированного материала, но при этом пропускали этап полировки MacroCap SP. Процессированные группы XTEN детектировали при помощи SDS-PAGE/окрашивания серебром в элюционных фракциях MacroCap Q для Партии 2 (ФИГ. 87A), при этом в элюционных фракциях MacroCap Q для Партии 1 практически отсутствовали процессированные варианты (ФИГ. 87B). Данные результаты позволяют предположить, что в применяемых условиях этап MacroCap SP на основе маркера RP11 является существенным для подтверждения N-концевой целостности и общего качества продукта, а также что система с двумя маркерами RP11/H8 и методы очистки обеспечивают гомогенный конечный продукт XTEN.

[00560] Пример 23: Конъюгация линкера ДБЦО-Мал с 3xThiol-XTEN для создания предшественника XTEN

[00561] Цистеин-сконструированный сегмент XTEN из 3х-Thiol-XTEN (XTEN_AE905 (Am1,C8,C453,C898, Seg 174)) готовили для реакции в виде 193 мкМ (16 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. ДБЦО-малеинимид (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A108) растворяли в ДМФ до конечной концентрации в 50 мМ. Аликвоту 3xThiol-XTEN (5,1 мг, 320 мкл) восстанавливали при помощи 10 мМ недавно перерастворенного ДТТ при 70°С на

протяжении 20 минут. Образец белка разводили водой до общего объема в 600 мкл. Добавляли 1200 мкл 100% ацетонитрила и центрифугировали смесь при 13000 об/мин на протяжении 5 минут. Надосадочную жидкость удаляли, добавляли 1000 мкл 80% ацетонитрила и центрифугировали смесь при 13000 об/мин на протяжении 1 минуты. Этап отмывки повторяли еще один раз. Сгусток растворяли в 300 мкл 100 мМ ГЭПЭС pH 7,0. Добавляли 7,7 мкл 50 мМ раствора ДБЦО-малеинимид в ДМФ (молярное соотношение 3xThiol-XTEN к ДБЦО-малеинимиду составляло 1:6) и инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи анализа C18 RP-HPLC (ФИГ. 64A). Белковую смесь очищали при помощи хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), используя 1,6 мл бутиловую колонку Toyopearl. Элюирование проводили в 30 объемах колонки с понижающимся градиентом сульфата аммония от 1,05 М до 0,3 М в 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,0 при скорости потока 0,5 мл/мин (ФИГ. 64B). Хроматографические фракции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 64C).

[00562] Пример 24: Расщепление трипсином и очистка дважды меченого предшественника.

[00563] Расщепление трипсином

[00564] Дважды меченный (CBD/His8) предшественник XTEN_AE870_Am1,C1 хорошо окрашивается Кумасси благодаря наличию последовательности CBD, в то время как немеченая версия XTEN_AE870_Am1,C1 плохо окрашивается Кумасси, но ее можно детектировать при помощи окрашивания серебром. Следовательно, завершение расщепления трипсином отслеживали при помощи методов окрашивания как Кумасси (ФИГ. 65A), так и серебром (ФИГ. 65B). Дважды меченый предшественник XTEN_AE870_Am1,C1 расщепляли, применяя разные соотношения бычьего трипсина и свиного трипсина по протеономической шкале (положительный контроль) в 20 мМ фосфатного буфера, pH 8. Инкубация на протяжении ночи при 37°C позволила получить более полное расщепление, чем инкубация на протяжении ночи при 25°C, что показали данные по детектированию оставшейся окрашенной Кумасси полосы дважды меченого предшественника в 160 кДа (ФИГ. 65A: все соотношения являются соотношениями масса/масса трипсина к субстрату). ФИГ. 65B показывает, что при соотношениях 1:100, 1:200 и 1:500 расщепление происходит с бычьим трипсином, а при 1:100 расщепление происходит со свиным трипсином, что приводит к эффективному расщеплению предшественника XTEN.

[00565] MacroCap Q очистка расщепленного трипсином дважды меченного предшественника

[00566] Для расщепления на протяжении ночи при 37°C использовали соотношение 1:200 бычьего трипсина к дважды меченому предшественнику (масса/масса). ФИГ. 66A показывает >90% преобразования дважды меченого предшественника в расщепленный продукт. Это

демонстрировало исчезновение после расщепления окрашенной Кумасси полосы в ~160 кДа и появление фрагмента CBD в 20 кДа.

[00567] Расщепленный трипсином материал подвергали поэтапной очистке с применением анионообменной смолы MacroCap Q и следующих буферов: A: 20 мМ ГЭПЭС, 50 мМ NaCl, pH 7,5 и B: 20 мМ ГЭПЭС, 500 мМ NaCl, pH 7,5. Расщепленные материалы загружали при помощи гравитации и элюировали поэтапным методом, используя последовательную отмывку 3 объемами колонки 0%, 20%, 40%, 60%, 80% и 100% буфером B. XTEN_AE870 элюировали в 60% B. ФИГ. 66B показывает, что расщепленный фрагмент CBD не связывался с MacroCap Q в применяемых условиях и был полностью отделен от XTEN. Поэтапное элюирование XTEN от MacroCap Q только частично отделяет процессированные полипептиды. Лучшего отделения достигали при помощи градиентного элюирования XTEN (ФИГ. 66C).

[00568] Исследование остаточной активности трипсина

[00569] Для исследования наличия остаточной активности трипсина в конечных составах препаратов XTEN образец белка смешивали с синтетическим пептидом [G2]GLP2 в соотношении масса/масса 10:1. Положительный контроль для расщепления содержал пептид [G2]GLP2 и бычий трипсин; отрицательный контроль содержал только пептид [G2]GLP2. Все образцы инкубировали на протяжении ночи при 37°C. После инкубации образцы блокировали 1% ТФК и подвергали C18 RP-HPLC анализу, используя C18 5 мкм 300A аналитическую колонку от Phenomenex Jupiter. Буфер A содержал 0,1% ТФК, 99,9% H_2O по шкале HPLC; Буфер B содержал 0,1% ТФК, 99,9% ацетонитрила по шкале HPLC. Анализ проводили, используя градиент от 5% B до 50% B за 45 минут времени элюирования. ФИГ. 67 показывает результаты RP-HPLC анализа остаточной активности трипсина в конечном препарате XTEN_AE869(Am1,C2). На ФИГ. 67A показан интактный пептид GLP2 (время удержания – 41 минута). На ФИГ. 67B показано расщепление трипсином пептида GLP2 с двумя характерными фрагментами трипсина (время удержания – 33,5 минуты и 34 минуты). ФИГ. 67C показывает, что пептид GLP2 остается интактным после инкубации на протяжении ночи с XTEN, и не наблюдается никаких фрагментов трипсина. Этот результат указывает на то, что конечные очищенные MacroCap Q препараты не содержат никакой остаточной активности трипсина.

[00570] Пример 25: Ферментация и очистка цистеин-сконструированного XTEN для конъюгации

[00571] *E. coli*, содержащие AC292 на плазмиде, выращивали до насыщения на протяжении ночи в 2xYT, а затем использовали 200 мл этой культуры для инокуляции 25 Л культуры среды 2xYT в одноразовом биореакторе. Обе культуры находились в присутствии 50 мкг/мл канамицина. Вторую культуру выращивали до ОП600 в ~1,0 при 37°C, охлаждали до 26°C и индуцировали 12 мл 1M ИПТГ на протяжении ночи. Клеточный сгусток собирали при 4000

об/мин в роторе SLA-3000 на протяжении 20 минут вращения. Сгусток клеток (184 г) перерастворяли в 736 мл 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl. Перерастворенные клетки лизировали при помощи микрофлюидизатора при 20000 фунтах на кв. дюйм, а затем нагревали до 75°С на протяжении 15 минут с последующим быстрым охлаждением на льду на протяжении 30 минут. Затем лизат очищали при помощи центрифугирования. Очищенный лизат загружали в колонку DE52, предварительно очищенную NaOH и уравновешенную 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl. Колонку отмывали 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 150 мМ NaCl и элюировали с 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 250 мМ NaCl. Затем объединенные элюционные фракции загружали в колонку macrocapQ, предварительно очищенную NaOH и уравновешенную 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl. Колонку отмывали 9 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 50 мМ NaCl, 9 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 100 мМ NaCl и элюировали с 9 объемами колонки 20 мМ Трис pH 6,8, 250 мМ NaCl. Объединенные элюционные фракции доводили до 15% м/о сульфата натрия и затем загружали в октил сефарозную FF колонку предварительно очищенную NaOH и уравновешенную с Трис pH 7,5. Колонку отмывали 4 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5 15% м/о сульфата натрия и элюировали с 4 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5 15% м/о сульфата натрия. Образец хранили при 4°С и присвоили ему номер # AP197. Очищенный цистеин-сконструированный XTEN может впоследствии служить в качестве подходящего реактанта для конъюгации с нагрузочным веществом, таким как лекарственное вещество из Таблицы 11, которая приводит к образованию конъюгата XTEN-нагрузочное вещество.

[00572] Пример 26: Конъюгация GLP2-Cys с 1xAmino-XTEN для получения конъюгата XTEN-нагрузочное вещество GLP2-XTEN

[00573] 1xAmino-XTEN (XTEN_AE869(Am1)) готовили в виде 67 мкМ (5,35 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Сульфо-СМЦК (Thermo Scientific, cat. # 22322) был свежеприготовленным в виде 100 мМ раствора в ДМСО. 10 мг амино-XTEN (1,87 мл) смешивали с 15-кратно превышающим в молярном отношении количеством сульфо-СМДК (18,7 мкл) и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°С. Избыточные кросс-линкеры удаляли при помощи фильтрации в центрифуге, используя центрифугу Amicon Ultra-15, НОММ 5к. Реакционную смесь объемом 1,8 мл смешивали с 8 мл 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl и центрифугировали на протяжении 20 мин в центрифуге Sorvall RT6000 при 3000 об/мин, 4°С. Процедуру повторяли еще два раза. Конечный объем восстановленного ретентата составил 1,8 мл. Пептид GLP2-Cys (CSBio, обычный синтез) растворяли в 20 мМ ГЭПЭС,pH 7,0, 50 мМ NaCl до конечной концентрации в 3 мг/мл. N-малеинимид-XTEN смешивали с 2,3-кратно превышающим в молярном отношении количеством пептида GLP2-Cys и инкубировали на

протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации и полученный в результате конъюгат отслеживали при помощи C18 RP-HPLC. 20 мкг белковых образцов загружали на C18 5 мкМ 300A 4,6 мм x 150 мм колонку Phenomenex Jupiter. Белки элюировали с 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте и детектировали по поглощению на 214 нм. Практически все N-малеинимид-XTEN были преобразованы в конъюгат GLP2-Cys-XTEN согласно результатам HPLC и масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI-MS анализ образцов проводили для 100 мкг белковых образцов, обессоленых при помощи центрифуги NanoSep 3K Omega (Pall Corp.). Белковые растворы в 50% ацетонитриле, 0,5% муравьиной кислоте заливали в масс-спектрометр с высоким разрешением при скорости потока в 10 мкл/мин. Спектры получали в диапазоне 800-1600 а.е.м. и пересчитывали в спектры для нулевого заряда при помощи программного обеспечения Bayesian Protein Reconstruction (ФИГ. 68). Непрореагировавшие XTEN и пептиды GLP2 отделяли от конъюгата при помощи последовательных этапов хроматографии с анионным обменом (MacroCap Q) и гидрофобным взаимодействием (Toyopearl Phenyl). Результаты RP-HPLC а MS-анализа демонстрируют высокий выход и степень очистки реактантов и конечного продукта (ФИГ. 68).

[00574] Пример 27: Конъюгация GLP2-N-Mal с 1xThiol-XTEN (цистеин-сконструированным XTEN)

[00575] 1xThiol-XTEN (XTEN_AE880(Am1,C8)(Seg 181) готовили в виде 122 мкМ (9,84 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Пептид GLP2-N-малеинимид (CSBio, обычный синтез) растворяли в ДМСО до финальной концентрации в 3 мг/мл. 1xThiol-XTEN (8,8 мг в 900 мкл) смешивали с 3-кратно превышающим в молярном отношении количеством пептида GLP2-N-Mal и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации и полученный в результате конъюгат отслеживали при помощи C18 RP-HPLC (20 мкг образцов белка загружали на C18 5 мкМ 300A 4,6 мм x 150 мм колонку Phenomenex Jupiter. Белки элюировали с 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте и детектировали по поглощению на 214 нм) и масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI-MS анализ образцов проводили для 100 мкг белковых образцов, обессоленых при помощи центрифуги NanoSep 3K Omega (Pall Corp.). Белковые растворы в 50% ацетонитриле, 0,5% муравьиной кислоте заливали в масс-спектрометр с высоким разрешением при скорости потока в 10 мкл/мин. Спектры получали в диапазоне 800-1600 а.е.м. и пересчитывали в спектры для нулевого заряда при помощи программного обеспечения Bayesian Protein Reconstruction. Результаты анализа приведены на ФИГ. 69. Конъюгат GLP2-XTEN очищали при помощи препаративной C4 RP-HPLC (колонка белка Vydac C4 5 мкм 300A 10 мм x 250 мм), используя 5-50% градиент ацетонитрила в 0,1% ТФК в качестве мобильной фазы (смотрите ФИГ. 70A). Конечный HPLC-очищенный конъюгат GLP2-XTEN анализировали, используя C18 5 мкМ

300A 4,6 мм x 150 мм колонку Phenomenex Jupiter (смотрите ФИГ. 70B). Выход очищенного конъюгата GLP2-XTEN составил 6,2 мг (70%).

[00576] Пример 28: Конъюгация ДБЦО-Мал с 1xThiol-XTEN

[00577] 1xThiol-XTEN (XTEN_AE880(Am1,C8) (Seg 181) готовили в виде 150 мкМ (12 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. ДБЦО-малеинимид (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A108) растворяли в ДМФ до конечной концентрации в 50 мМ. Объем 200 мкл (2,4 мг) 1xThiol-XTEN доводили до 100 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, используя 1М маточного раствора. 1,2 мкл объем 50 мМ ДБЦО-Мал в ДМФ добавляли в белковый раствор (в молярном соотношении 1:2 между 1xThiol-XTEN и реагентом ДБЦО-малеинимид) и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение реакции модификации отслеживали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 71A). Белковую смесь очищали при помощи хроматографии с белковым взаимодействием (HIC), используя 1,6 мл колонку Toyopearl Butyl. Элюирование проводили с 30 объемами колонки в понижающемся градиенте сульфата аммония от 1,05 М до 0,3 М в буфере из 20 мМ фосфата, pH 7,0 при скорости потока в 0,5 мл/мин (ФИГ. 71B). Хроматографические фракции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 71C).

[00578] Пример 29: Получение А биспецифического конъюгата из моноспецифических предшественников XTEN, связанных в N-концах.

[00579] Данный пример описывает создание композиции XTEN-нагрузочное вещество при помощи связывания двух разных предшественников XTEN-нагрузочное вещество в конфигурации N- к N-концу; одного с нагрузочным веществом A и второго с нагрузочным веществом B, что приводит к образованию биспецифического конъюгата.

[00580] На первом этапе молекулы XTEN, содержащие множественные цистеины (цистеин-сконструированные XTEN) готовили, используя описанную выше систему очистки RP11-His8 с двумя маркерами, и формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Нагрузочное вещество A-малеинимид растворяли в водном растворе 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, ДМФ или ДМЦО либо любом другом подходящем растворителе в зависимости от растворимости реагента. Нагрузочное вещество A-малеинимид добавляли в цистеин-сконструированный XTEN в количестве, которое в молярном отношении в 2-6 раз превышает XTEN, и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи C18 RP-HPLC. Полученный в результате конъюгат нагрузочного вещества и A-XTEN очищали от примесей и непрореагировавших компонентов при помощи препаративной C4-C18 RP-HPLC. Конъюгат нагрузочного вещества и A-XTEN формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Далее конъюгат нагрузочного вещества и A-XTEN дополнительно модифицировали путем добавления дибензилциклооктина (ДБЦО)-NHS эфира или ДБЦО-сульфо-NHS эфира в количестве, которое в молярном отношении в 10-50 превышает XTEN, и

инкубировали на протяжении 1-2 ч при 25°С. Завершение модификации отслеживали при помощи аналитической C18 RP-HPLC. В случае низкой конъюгационной активности (например, <90%) или образования большого количества неспецифических продуктов конъюгат ДБЦО-нагрузочное вещество и A-XTEN очищали, используя препаративную C4-C18 RP-HPLC. В случае высокой конъюгационной эффективности ДБЦО-NHS эфира (>90%) без существенного присутствия побочных продуктов, конъюгат ДБЦО-нагрузочное вещество и A-XTEN очищали от избытка реагента при помощи буферного обмена, используя центрифугу с 10-30 кДа НОММ, преципитацию ацетонитрилом или анионообменную хроматографию.

[00581] Для создания второго предшественника XTEN-нагрузочное вещество, нагрузочное вещество B-малеинимид растворяли в водном растворе 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, ДМФ или ДМЦО либо любом другом подходящем растворителе в зависимости от растворимости реагента. Нагрузочное вещество B-малеинимид добавляли во второй цистеин-содержащий XTEN в количестве, которое в молярном отношении в 2-6 раз превышает XTEN, и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°С. Завершение модификации отслеживали при помощи аналитической C18 RP-HPLC. Полученный в результате конъюгат нагрузочного вещества и B-XTEN очищали от примесей и реактантов при помощи препаративной C4-C18 RP-HPLC. Конъюгат нагрузочного вещества и B-XTEN формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Азид-ПЭГ4-NHS эфир добавляли в количестве, которое в молярном отношении в 10-50 превышает нагрузочное вещество B-XTEN и инкубировали на протяжении 1-2 ч при 25°С. Завершение модификации отслеживали при помощи C18 RP-HPLC. В случае низкой конъюгационной активности (например, <90%) или образования большого количества неспецифических продуктов конъюгат азид-нагрузочное вещество и B-XTEN очищали, используя препаративную C4-C18 RP-HPLC. В случае высокой конъюгационной эффективности ДБЦО-NHS эфира (>90%) без существенного присутствия побочных продуктов, конъюгат азид-нагрузочное вещество и B-XTEN очищали от избытка реагента при помощи буферного обмена, используя центрифугу с 10-30 кДа НОММ, преципитацию ацетонитрилом или анионообменную хроматографию. Конечный продукт создавали путем смешивания очищенных и концентрированных белков ДБЦО-нагрузочное вещество A-XTEN и азид-нагрузочное вещество B-XTEN в эквимолярном соотношении в 20 мМ ГЭПЭС буфере, pH 7,0, 50 мМ NaCl и инкубировали при 25°С на протяжении 1 ч или более до завершения реакции. Завершение модификации отслеживали при помощи C4 или C18 RP-HPLC. При необходимости биспецифический конъюгат нагрузочное вещество A-XTEN-нагрузочное вещество B очищали при помощи препаративной RP-HPLC, хроматографии с гидрофобным взаимодействием или анионным обменом.

[00582] Пример 30: Приготовление тримерного конъюгата из моноспецифических предшественников XTEN, связанных в N-концах.

[00583] Моноспецифические предшественники XTEN-нагрузочное вещество получают в виде N-концевых продуктов слияния нагрузочного вещества A связанного с молекулой XTEN; например, имеющих длину в диапазоне от AE144 до AE890, содержащих один цистеин в C-конце (полученных и очищенных как описано в Примере 25). Очищенные предшественники формулировали в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Трис-(2-малеинимидоэтил)амин (ТМЭА, Thermo Scientific, cat. # 33043) и растворяли в ДМЦО или ДМФ. Предшественник (в количестве в молярном отношении в 4-6 раз превышающем количество кросс-линкера) и реагент ТМЭА смешивали и инкубировали на протяжении 1 ч при 25°C. Завершение модификации отслеживали при помощи C4 или C18 RP-HPLC или эксклюзионной хроматографии. Полученный в результате трехвалентный конъюгат нагрузочное вещество A-XTEN очищали от белковых реактантов или смеси частичных продуктов при помощи хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC), анионообменной хроматографии или препаративной C4-C18 RP-HPLC.

[00584] Пример 31: Конъюгация и очистка FITC-X-XTEN

[00585] Очищенный белок, полученный из AC272, lot # AP197, метили малеинимидом FITC. Образец восстанавливали путем инкубации при комнатной температуре с 5 мМ ТХЭФ на протяжении 1 часа. Затем образец обессоливали в ФСБ, используя колонки DG-10. Образец метили, добавляя 25-кратно превышающее в молярном отношении количество FITC-малеинимида в ДМЦО и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 2 часов. Следует отметить, что объем доводили таким образом, что концентрация ДМЦО составляла <5% от общего растворителя. Реакцию завершали, добавляя 2 мМ ДТТ, а затем образец расщепляли на протяжении ночи при помощи TEV-протеазы. Образец разводили до двух объемов с 20 мМ Трис pH 7,5 и загружали в колонку macrocapQ, предварительно очистив NaOH и уравновесив 20 мМ Трис pH 7,5. Колонку отмывали 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 135 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 175 мМ NaCl и элюировали с 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 250 мМ NaCl. Затем объединенные элюционные фракции расщепляли при помощи TEV более 60 часов при 4C для завершения расщепления. Затем расщепленные образцы дважды пропускали через колонку с 1 мл перлозы, предварительно очистив NaOH и уравновесив 20 мМ Трис pH 7,5, 135 мМ NaCl. Для удаления из образца свободных FITC образец диализировали против 20 мМ Трис pH 7,5, 135 мМ NaCl, используя 10000 НОММ мембрану. Совместная миграция белкового сигнала ОП214 и FITC-сигнала ОП495 в SEC-колонеке указывает на успешную конъюгацию XTEN с маркером с минимальным загрязнением свободными красителями (ФИГ. 72B). На успешную конъюгацию

также указывает большая величина кажущейся молекулярной массы белка с FITC-флуоресценцией в SDS-PAGE (ФИГ. 72A).

[00586] Пример 32: Очистка GFP-X-XTEN

[00587] GFP (AC219) химическим способом перекрестно сшивали с XTEN посредством бифункционального кросс-линкера с амин- реакционно-способной группой для сопряжения с лизинами GFP и цистеин- реакционно-способной группой для сопряжения со свободным цистеином, внесенным в XTEN в AC292. GFP метили бифункциональным кросс-линкером сульфо-СМЦК при помощи инкубации при комнатной температуре на протяжении 2 часов. Белок обессоливали в ФСБ, используя колонки DG-10 для удаления свободных сульфо-СМЦК. Очищенный белок, полученный из AC272, lot # AP197, восстанавливали и обессоливали в ФСБ на колонках DG-10 и смешивали с меченым GFP для того, чтобы обеспечить возможность перекрестного сшивания. Реакцию перекрестного сшивания завершали с 2 мМ ДТТ и TEV, которую добавляли, чтобы удалить домен CBD во время инкубации на протяжении ночи при 4°C. На следующий день добавляли дополнительное количество TEV для завершения расщепления с дополнительной 60-часовой инкубацией при 4°C. После расщепления TEV образец разводили до 100 мл в 20 мМ Трис pH 7,5 и загружали в колонку macrocapQ, предварительно очистив NaOH и уравновесив 20 мМ Трис pH 7,5. Колонку отмывали 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 50 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 100 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 200 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 250 мМ NaCl, 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 300 мМ NaCl и 5 объемами колонки 20 мМ Трис pH 7,5, 500 мМ NaCl. Пиковые элюционные фракции объединяли и хранили при 4°C. Перекрестное сшивание подтверждали по совместной миграции белкового сигнала ОП214 и GFP-сигнала ОП395 в SEC-колонке, на ФИГ. 73 выход SEC показан в виде накладывающегося слоя.

[00588] Пример 33: Фармакокинетика конъюгатов GFP-XTEN и FITC-XTEN

[00589] Фармакокинетику перекрестно-сшитых конъюгатов GFP-XTEN и FITC-XTEN, полученных как описано в вышеприведенных Примерах, исследовали на яванских макаках. GFP-XTEN и FITC-XTEN вводили взрослым макакам IV в дозировке 2 мг/кг и с объемами доз, составляющими 0,77 и 0,68 мЛ, соответственно. Образцы крови (1,0 мЛ) собирали в предварительно охлажденные гепаринизированные пробирки перед дозированием и через временные отрезки, составляющие 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216, 264, 336, 388, 432, 504 часа после дозирования, и перерабатывали в плазму. Количественную оценку проводили при помощи метода ELISA, используя антитело к XTEN как для захвата, так и для и детектирования в случае GFP-XTEN, и анти-XTEN для захвата и анти-FITC для детектирования

в случае FITC-XTEN. Анализ без учета компартментов проводили в WinNonLin с включением всех временных отрезков для определения ФК параметров. Результаты фармакокинетики обобщены в Таблице 40 и на ФИГ. 74. Данные показывают, что XTEN может продлевать период полувыведения молекул, к которым он конъюгирован химически, способом, сравнимым с генетическим слиянием с нагрузочными веществами сходного размера.

Таблица 40: ФК параметры конъюгационных композиций XTEN-нагрузочное вещество.

Конструкция	Cmax (нг/мЛ)	ППК (ч*нг/мЛ)	T ½ (ч)
GFP-X-XTEN (AP197d)	52800	8220000	107
FITC-X-XTEN AP197e	18900	3930000	84,2

[00590] Фармакокинетику GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-XTEN_Y576 и XTEN_AD836-GFP исследовали на яванских макаках, чтобы установить влияние состава и длины неструктурированных полипептидов на параметры ФК. Анализировали образцы крови в разные временные отрезки после инъекции, а концентрацию GFP в плазме крови определяли при помощи ELISA, используя поликлональное антитело к GFP для захвата и биотинилированное приготовление того же самого поликлонального антитела для детектирования. Результаты обобщены на ФИГ. 75. Они показывают резкое увеличение периода полувыведения с увеличением длины последовательности XTEN. Например, для GFP-XTEN_L288 (с 288 аминокислотными остатками в XTEN) был зарегистрирован период полувыведения, составляющий 10 ч. Удвоение длины неструктурированного полипептидного участника слияния до 576 аминокислот увеличивало период полувыведения до 20-22 ч для множественных гибридных белковых конструкций; т.е., GFP-XTEN_L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-XTEN_Y576. Дополнительное увеличение длины неструктурированного полипептидного участника слияния до 836 остатков приводило к периоду полувыведения в 72-75 ч для XTEN_AD836-GFP. Таким образом, увеличение длины полимера на 288 остатков от 288 до 576 остатков увеличивало in vivo период полувыведения приблизительно на 10 ч. При этом, увеличение длины полипептида на 260 остатков от 576 остатков до 836 остатков увеличивало период полувыведения на более чем 50 ч. Данные результаты показывают, что существует определенное пороговое значение длины неструктурированного полипептида, которое приводит к in vivo приросту в периоде полувыведения, который превышает пропорциональное увеличение. Таким образом, ожидается, что гибридные белки, содержащие продленные неструктурированные полипептиды, будут обладать свойством усиленной фармакокинетики по сравнению с полипептидами меньшей длины.

[00591] Пример 34: Приготовление 1xDBCO,3xLHRH-XTEN путем конъюгации

[00592] Аликвоту 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 196 мкМ (7,7 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. На ФИГ. 88A показан C18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. 2,2'-дипиридилдисульфид (ДПД, Sigma, cat. # D5767) растворяли в диметилформамиде (ДМФ) до конечной концентрации в 100 мМ. 4 мл раствора 1xAmino,3xThiol-XTEN432 смешивали с 0,2 мл 1 М ГЭПЭС, pH 8,0, чтобы довести pH до ~7,5 и с 78 мкл раствора ДПД (в количестве, в 10x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 88B). ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 10 мМ. 0,865 мл раствора ДБЦО-сульфо-NHS добавляли в белковый раствор (в количестве, в 11x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 88C). Добавляли раствор 1 М этаноламина pH 8,0 до конечной концентрации в 50 мМ для погашения непрогеагировавшего ДБЦО-сульфо-NHS. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а затем на протяжении ночи при 4°C. Добавляли 500 мМ ТХЭФ-раствора Bond-Breaker™ (Thermo Scientific, cat. # 77720) до конечной концентрации в 20 мМ. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 88D). Реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную C4 RP-HPLC колонку Vydac C4 250 x 22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO,3xThiol-XTEN432, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме. Пептид Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2, модифицированный 3-малеинимидопропионовой кислотой в ε-аминогруппе D-Lys (LHRH-Mal) синтезировали при помощи CSBio Co. (Менло Парк, Калифорния). Пептид растворяли до конечной концентрации в 25 мг/мл в безводном ДМФ и добавляли в раствор 1xDBCO,3xThiol-XTEN432 в количестве, в 5x превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 88E). Реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 22 мм. Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO,3xLHRH-XTEN432, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М

ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме до 2 мл для получения конечного продукта.

[00593] Пример 35: Приготовление 1xAzide,3xMMAE-XTEN путем конъюгации

[00594] Аликвоту гибридного белка 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 196 мкМ (7,7 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. На ФИГ. 89A показан C18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. MA6-Val-Cit-PAB-MMAE (MMAE-Mal, стандартный синтез от Concortis Biosystems, Inc.) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до конечной концентрации в 1 мг/мл. 2,2 мл объем раствора 1xAmino,3xThiol-XTEN432 смешивали с 2,5 мл MMAE-Mal (в количестве, в 3,5x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 89B). Азид-ПЭГ4-NHS эфир (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A103) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 500 мМ. Реакционную смесь (4,7 мл) смешивали с 0,235 мл 1 М ГЭПЭС, pH 8,0 и с 9,75 мкл 500 мМ азид-ПЭГ4-NHS (в количестве, в 10x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 89C). Конъюгационную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xAzide,3xMMAE-XTEN432, доводили до ~ pH 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

[00595] Пример 36: Приготовление 3xLHRH,3xMMAE-XTEN путем конъюгации

[00596] Аликвоту гибридного белка 1xDBCO,3xLHRH-XTEN432 готовили в виде 143 мкМ (6,26 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. 1xAzide,3xMMAE-XTEN432 готовили в виде 135 мкМ (5,90 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. Два белковых реактанта смешивали в растворе для получения молярного избытка 1xDBCO,3xLHRH-XTEN432, составляющего 1,1. Реакционную смесь инкубировали на протяжении ночи при 25°C. Завершение реакции клик-химии анализировали при помощи SDS-PAGE (ФИГ. 90A) и RP-HPLC (ФИГ. 90B). Конъюгационную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции,

содержащие 3xLHRH,3xMMAE-XTEN, доводили до ~ pH 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

[00597] Пример 37: Приготовление 1xLHRH,3xMMAE-XTEN путем конъюгации

[00598] Аликвоту гибридного белка 1xAmino,3xThiol-XTEN905 (XTEN_AE905(Am1,C8,C453,C898, Seg 174)) готовили в виде 131 мкМ (10,9 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. На ФИГ. 91A показан C18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. 2,2'-дипиридилдисульфид (ДПД, Sigma, cat. # D5767) растворяли в диметилформамиде (ДМФ) до конечной концентрации в 100 мМ. Раствор 1xAmino,3xThiol-XTEN905 доводили до pH to ~7,5, используя 1 М ГЭПЭС pH 8, и смешивали с раствором ДПД (в количестве, в 10x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 91B). ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 10 мМ. Раствор ДБЦО-сульфо-NHS добавляли в белковый раствор (в количестве, в 10x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 91C). 1 М этаноламина pH 8,0 добавляли до конечной концентрации в 50 мМ для погашения непрогеагировавшего ДБЦО-сульфо-NHS. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а затем на протяжении ночи при 4°C. 500 мМ ТХЭФ-раствора Bond-Breaker™ (Thermo Scientific, cat. # 77720) добавляли до конечной концентрации в 20 мМ. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 91D). Реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO,3xThiol-XTEN905, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме. MA6-Val-Cit-PAB-MMAE (MMAE-Mal, стандартный синтез от Concortis Biosystems, Inc.) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до конечной концентрации в 1 мг/мл. Раствор 1xDBCO,3xThiol-XTEN905 смешивали с MMAE-Mal в количестве, в 3,5x превышающем его в молярном отношении. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC. Пептид Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2 модифицировали азидо-гексановой кислотой в ε-аминогруппе D-Lys (LHRH-Mal, стандартный синтез от CS Bio Co., Менло Парк, Калифорния). Пептид растворяли до конечной концентрации в 25 мг/мл в безводном ДМФ и добавляли в раствор

1xDBCO,3xMMAE-XTEN905 в количестве, в 1,5-5x превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC. Конечную реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 22 мм. Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO,3xLHRH-XTEN432, доводили до ~ pH 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

[00599] Пример 38: Приготовление 1xDBCO,3xFolate(γ)-XTEN путем конъюгации

[00600] Аликвоту гибридного белка 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 203 мкМ (8,0 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. На ФИГ. 107A показан C18 RP-HPLC и ESI-MS анализ белка. Фолат-_-аминопентил-малеинимид (FA(γ)-Mal, стандартный синтез от CPC Scientific) растворяли в диметилформамиде (ДМФ) до конечной концентрации в 21 мг/мл (9,8 мМ). 1,1 мл объем раствора 1xAmino,3xThiol-XTEN432 смешивали с 0,08 мл FA(γ)-Mal (в количестве, в 3,5x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 107B). pH реакционной смеси доводили при помощи 0,06 мл буфера из 1 М ГЭПЭС pH 8,0. ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, Inc., cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 50 мМ. 0,53 мл раствора ДБЦО-сульфо-NHS добавляли в белковый раствор (в количестве, в 11x превышающем в молярном отношении белок). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 107C). 1 М этаноламина pH 8,0 добавляли до конечной концентрации в 50 мМ для погашения непрогеагировавшего ДБЦО-сульфо-NHS. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а затем на протяжении ночи при 4°C. Реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO,3xFA(γ)-XTEN432, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта.

[00601] Конъюгат 1xDBCO,3xFolate(α)-XTEN готовили преимущественно так, как описано выше, используя фолат-альфа-малеинимид (FA(α)-Mal, стандартный синтез от CPC Scientific).

[00602] Пример 39: Приготовление 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN путем конъюгации

[00603] Аликвоту гибридного белка 1xDBCO,3xFA(γ)-XTEN432 готовили в виде 191 мкМ (8,8 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. 1xAzide,3xMMAE-XTEN432 (полученный так, как описано в Примере 32) готовили в виде 242 мкМ (11,1 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0. Два белковых реактанта смешивали в растворе, чтобы получить количество 1xDBCO,3xFA(γ)-XTEN432 с 1.1 молярным избытком. Реакционную смесь инкубировали на протяжении ночи при 25°C. Завершение реакции клик-химии анализировали при помощи RP-HPLC (ФИГ. 108). Конъюгационную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме для получения конечного продукта. Конечный продукт анализировали при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC-HPLC) (ФИГ. 109A), RP-HPLC (ФИГ. 109B) и ESI-MS (ФИГ. 109C).

[00604] Конъюгат 3xFA(α),3xMMAE-XTEN готовили преимущественно так, как описано выше, используя клик-реакцию между 1xDBCO,3xFA(α)-XTEN432 и 1xAzide,3xMMAE-XTEN432.

[00605] Пример 40: Сравнение вязкости в растворах разветвленных и линейных XTEN

[00606] Вязкость линейных и разветвленных XTEN (последние – в виде тримерных и тетрамерных конфигураций) можно определить при помощи вискозиметров и реометров разных типов. Например, можно определить время, необходимое для набора 1 мЛ жидкости в шприц через 30G иглу, как описано у Miller, M. A., et al. (2010) Langmuir, 26:1067. Для того чтобы сравнить вязкость мономерных и тримерных или тетрамерных конфигураций XTEN, готовят конструкции, имеющие одинаковые молекулярные массы аминокислотных компонентов XTEN, и затем делают растворы с фиксированными, эквивалентными концентрациями белка, составляющими 20, 50, 100 мг/мл для каждого. Затем растворы оценивают, используя метод Миллера. Используя данный метод, берут данные по известным характеристикам для построения калибровочной кривой, а затем измеряют характеристики растворов XTEN. Ожидается, что результаты покажут, что вязкость эквимолярных растворов XTEN с одинаковыми молекулярными массами будет значительно снижаться с повышением разветвленности; трехрукий конъюгат XTEN288 будет обладать значительно меньшей вязкостью по сравнению с такой же концентрацией линейного XTEN864, даже если они содержат одинаковые количества аминокислот. Аналогично, ожидается, что XTEN216 с четырехрукой конфигурацией будет иметь еще меньшую вязкость, чем трехрукий конъюгат XTEN288.

[00607] Пример: 41: Приготовление Her2-XTEN-PTX путем конъюгации

[00608] Аликвоту гибридного белка 1xAmino,3xThiol-XTEN432 (XTEN_AE432(Am1,C12,C217,C422)) готовили в виде 196 мкМ (7,7 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Паклитаксел-Мал (PTX-Mal) представляет собой стандартно синтезируемую модификацию паклитаксела с янтарным ангидридом с последующей конъюгацией с аминоэтилмалеинимидом. PTX-Mal растворяли в диметилформамиде (ДМФ) и добавляли в белок в количестве, в 3,5-5x превышающем его в молярном отношении. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1-2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC. Сульфо-СМЦК (Thermo Scientific, cat. #22122) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 50 мМ и добавляли в белковый раствор в количестве, в 10x превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 часов при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (смотрите ФИГ. 92). Реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК и доводили pH до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор загружали на препаративную колонку C4 RP-HPLC Vydac C4 250 x 22 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP1022). Белок элюировали с 1200 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 15 мл/мин. Фракции, содержащие 1xMal,3xPTX-XTEN432, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме. Антитело герцептин (трастузумаб, Roche) восстанавливали в воде согласно инструкциям и меняли буфер на ФСБ pH 7,2, содержащий 5 мМ ЭДТК. ДТТ добавляли в белковый раствор до 1-10 мМ конечной концентрации и инкубировали на протяжении 5-30 мин при 37°C. Избыток ДТТ удаляли при помощи гель-фильтрации или фильтрации при помощи отделяющей мембраны. 1xMal,3xPTX-XTEN432 добавляли к частично восстановленному антителу в количестве, в 3-4x превышающем его в молярном отношении. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а конечные продукты реакции анализировали при помощи SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографии в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

[00609] Пример 42: Приготовление йодоацетил-XTEN путем конъюгации

[00610] Аликвоту гибридного белка 1xAmino-XTEN869 (XTEN_AE869(Am1) готовили в виде 164 мкМ (13,1 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. 1/20 объема 1М ГЭПЭС, pH 8 добавляли в белковый раствор, чтобы довести pH белкового раствора до ~7,5. N-сукцинимидил йодоацетат (SIA, Thermo Scientific, cat. # 22349) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 100 мМ и добавляли в количестве, в 10x превышающем в молярном отношении белок. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 1 часа при 25°C, а продукты реакции анализировали при помощи C18 RP-HPLC (ФИГ. 93A). Избыток SIA

удаляли при помощи смены буфера, используя ультрацентрифугирующее устройство Vivaspin 500 (HOMM 5000, VivaScience, cat. # VS0112). Модификация N-концевой аминогруппы йодоацетильной группой не приводит к изменению времени удержания модифицированного XTEN (ФИГ. 93A), следовательно, ковалентная модификация подтверждалась при помощи ESI-MS (ФИГ. 93B). Также, конъюгат IA-XTEN эффективно реагировал с цистеин-содержащим пептидом HCKFWW (Bachem, cat. # H-3524) (ФИГ. 93C).

[00611] Пример 43: In vitro клеточный скрининг конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности

[00612] Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество оценивали на предмет *in vitro* активности и избирательности. Каждый конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество, соответствующую ему ненацеленную молекулу XTEN-лекарственное вещество и соответствующий ему контрольное свободное лекарственное вещество исследовали в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к рецепторам LHRH клеточных линий, перечисленных в Таблице 41. Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и время инкубации, определяли, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество исследовали следующим образом: клетки собирали в лог-фазе, пересчитывали и высевали с заданной клеточной плотностью в 96-луночный микротитровальный аналитический планшет. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C в атмосфере с 5% CO_2. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносили в растворах в подходящих диапазонах дозировок, в двух параллельных исследованиях, а планшеты инкубировали на протяжении 2-5 дополнительных дней. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo, смешивали на протяжении 2 минут на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугировали при 90 x g и инкубировали при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 минут, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывали при помощи люминометра и рассчитывали величины IC_{50} (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC_{50} даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям. Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество продемонстрируют высокоселективную эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к рецепторам LHRH клеток, но не в отношении

негативных к рецепторам LHRH клеток. В отличие от этого, для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в цитотоксичности к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец XTEN-лекарственное вещество будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с LHRH-рецепторами путем добавления в анализ свободного конкурентоспособного пептида LHRH, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество, дополнительно подтверждая избирательную активность данных конструкций.

Таблица 41: Позитивные и негативные к рецепторам LHRH клеточные линии

Клеточная линия	Ткань	Статус LHRHR
MCF-7	Молочная железа	Позитивный
MDA-MB-231	Молочная железа (HER2-/ER-/PR-)	Позитивный
HCC1806	Молочная железа (HER2-/ER-/PR-)	Позитивный
HCC1937	Молочная железа (HER2-/ER-/PR-)	Позитивный
OV-1063	Яичники	Позитивный
EFO-21	Яичники	Позитивный
EFO-27	Яичники	Позитивный
NIH:OVCAR-3	Яичники	Позитивный
BG-1	Яичники	Позитивный
HEC-1A	Эндометрий	Позитивный
HEC-1B	Эндометрий	Позитивный
Ishikawa	Эндометрий	Позитивный
KLE	Эндометрий	Позитивный
AN-3-CA	Эндометрий	Позитивный
MiaPaCa	Поджелудочная железа	Позитивный
Panc-1	Поджелудочная железа	Позитивный
rat Dunning R-3327-H	Простата (андроген-зависим)	Позитивный
PC-82	Простата (андроген-зависим)	Позитивный
MDA-PCa-2b	Простата (андроген-независим)	Позитивный
C4-2 (производное от LNCaP)	Простата (андроген-зависим)	Позитивный
A549	Легкие	Позитивный
UCI-107	Яичники	Негативный
SK-OV-3	Яичники	Негативный
SW 626	Яичники	Негативный
MFE-296	Эндометрий	Негативный

ER: рецептор эстрогена; PR: рецептор прогестерона

[00613] Пример: 44: *In vitro* клеточный скрининг конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности

[00614] Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество впервые подвергали скринингу *in vitro* активности и избирательности. Каждый конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество, соответствующую ему ненацеленную молекулу XTEN-лекарственное вещество и соответствующий ему контрольное свободное лекарственное вещество исследовали в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к фолатным рецепторам клеточных линий, перечисленных в Таблице 42. Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолиевой кислоты, клетки выращивают, а анализ проводят в среде, не содержащей фолиевой кислоты, но содержащей 5-10% инактивированной теплом фетальной телячьей сыворотки (ФТС) при 37°C, в атмосфере 5% CO_2 (инактивированная теплом ФТС содержит эндогенный уровень фолиевой кислоты, достаточный для выживания и пролиферации экспрессирующих фолатные рецепторы клеток). Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и времена инкубации, устанавливают, используя бесфолатную среду, содержащую 5-10% инактивированную теплом ФТС, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Затем конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество исследовали следующим образом: клетки собирали в лог-фазе, пересчитывали и высевали с заданной клеточной плотностью в 96-луночные микротитровальные аналитические планшеты. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO_2. Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносили в растворах в подходящих диапазонах дозировок, в двух параллельных исследованиях, а планшеты инкубировали на протяжении 2-5 дополнительных дней. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo, смешивали на протяжении 2 минут на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугировали при 90 x g и инкубировали при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 минут, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывали при помощи люминометра и рассчитывали величины IC_{50} (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC_{50} даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям. Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество продемонстрируют высокоселективную эффективную

цитотоксичность в отношении позитивных к фолатным рецепторам клеток, но не в отношении негативных к фолатным рецепторам клеток. В отличие от этого, для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в цитотоксичности к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец XTEN-лекарственное вещество будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с фолатными рецепторами путем добавления в анализ свободной конкурентоспособной фолиевой кислоты, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество, дополнительно подтверждая избирательную активность данных конструкций.

Таблица 42: Позитивные и негативные к фолатным рецепторам клеточные линии

Клеточная линия	Ткань	Статус фолатного рецептора
KB	Носоглоточная	Позитивный
IGROV	Яичники	Позитивный
SK-OV-3	Яичники	Позитивный
HeLa	Шейная	Позитивный
LoVo	Толстая кишка	Позитивный
SW620	Толстая кишка	Позитивный
A549	Легкие	Негативный
A375	Множественная меланома	Негативный
LS-174T	Толстая кишка	Негативный
SK-BR-3	Молочная железа	Негативный

[00615] Пример 45: *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00616] При определении стабильности конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и мыши при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Количество свободного лекарственного вещества оценивают при помощи RP-HPLC и/или LC-MS/MS, а количество интактного конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество определяют, используя ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или LHRH/лекарственное вещество.

[00617] Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу, и сравнивают с известными стандартами лекарственных веществ. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопиии и сравнивают с известными стандартами лекарственных веществ. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированной версии детекторного антитела) либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированной версии детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы. *t*1/2 для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

[00618] **Пример 46: *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество**

[00619] При определении стабильности конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и мыши при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Количество свободного лекарственного вещества оценивают при помощиHPLC и/или LC-MS/MS, а количество интактного конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество определяют, используя ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или фолат/лекарственное вещество.

[00620] Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу, и сравнивают с известными стандартами лекарственных веществ. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопиии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированной версии детекторного антитела) либо подходящую вторичную антитело-

пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированной версии детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы. *t*1/2 для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

[00621] Пример 47: *In Vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгата LHRH-XTEN-Cy5.5

[00622] Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 LHRH-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей активности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к рецепторам LHRH опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Вкратце, самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к рецепторам LHRH опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой LHRH-XTEN-Cy5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Cy5.5 контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 часа после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Cy5.5 выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения по меньшей мере нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области Cy5.5. Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, красный определяет самую высокую интенсивность, а полученные в результате изображения используют для оценки поглощения конъюгатов и контрольных образцов.

[00623] Пример 48: *In Vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгатов фолат-XTEN-Cy5.5

[00624] Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 фолат-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей активности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к фолатным рецепторам опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолата, позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, нормальная пища грызунов содержит высокую концентрацию фолиевой кислоты; бестимусных мышей в данном исследовании держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении визуализационного анализа для того, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке крови.

[00625] Вкратце, самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой фолат-XTEN-Cy5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Cy5.5 контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 часа после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Cy5.5 выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения по меньшей мере нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области Cy5.5. Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, красный определяет самую высокую интенсивность, а полученные в результате изображения используют для оценки поглощения конъюгатов и контрольных образцов.

[00626] Пример 49: Анализ фармакокинетики конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00627] *In vivo* фармакокинетику конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов, полученных от мышей, крыс, яванских макаков и собак. Составы конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество готовят в водных буферах, совместимых с in vivo введением (например: фосфатно-солевой буфер, Трис-солевой буфер или Гэпэс-солевой буфер). Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно – внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 часов и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS. Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество, например, комбинации XTEN/LHRH, XTEN/лекарственное вещество, LHRH/лекарственное вещество и/или XTEN/XTEN. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу) либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры.

[00628] Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного

лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами.

[00629] Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопиии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами.

[00630] Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление XTEN к LHRH и лекарственному компоненту сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства нацеленного и лекарственного компонента, не связанного с XTEN.

[00631] Пример 50: Анализ фармакокинетики конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00632] *In vivo* фармакокинетику конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов, полученных от мышей, крыс, яванских макаков и собак. Так как в нормальном питании содержатся высокие концентрации фолиевой кислоты (приблиз. 6 мг/кг мышиного корма), животных, принимающих участие в фармакокинетических исследованиях фолатных конъюгатов, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно – внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 часов и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS.

[00633] Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество, например, комбинации XTEN/фолат, XTEN/лекарственное вещество, фолат/лекарственное вещество и/или XTEN/XTEN. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным

антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу) либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры.

[00634] Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами.

[00635] Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопиии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами.

[00636] Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление XTEN к фолату и лекарственному компоненту сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства нацеленного и лекарственного компонента, не связанного с XTEN.

[00637] Пример 51: In vivo анализ эффективности и токсичности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00638] Конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество предназначен для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к рецепторам LHRH опухолевым клеткам. Поэтому *in vivo* фармакологическую активность конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие рецепторы LHRH, трансплантированные бестимусным мышам.

[00639] Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений LHRH-XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Вкратце, эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирований определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на LHRH веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (смотрите выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съеживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение отслеживают ежедневно. Наибольшая доза соединения LHRH-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД. Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом LHRH-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД; другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В Таблице 42 приведены примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Таким образом, подходящее количество позитивных к рецепторам LHRH клеток из соответствующей человеческой опухолевой линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как 0,5 x L x W^2, где L = значение для большей оси в миллиметрах, а W = значение для оси, перпендикулярной L, в миллиметрах. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, контрольное лекарственное вещество и конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи

оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и проводят клинические исследования патологии и гистопатологии основных органов.

[00640] Предполагается, что результаты подтвердят то, что конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество будет иметь положительный терапевтический индекс, что демонстрирует высокая эффективность, и низкую общую токсичность. В противоположность этому, ожидается, что ненацеленное на LHRH свободное лекарственное вещество при одинаковых дозах будет менее эффективно, но намного более токсично. Ожидается, что контрольный растворитель приведет к неконтролируемому росту опухоли и будет высокотоксичным.

[00641] Пример 52: In vivo анализ эффективности и токсичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00642] Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество предназначены для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к фолатным рецепторам опухолевым клеткам. *In vivo* фармакологическую активность конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие фолатные рецепторы, трансплантированные бестимусным мышам. Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений фолат-XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Так как в нормальном корме для грызунов содержится высокая концентрация фолиевой кислоты (6 мг/кг корма), мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирований определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на фолат веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (смотрите Пример ФК выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съеживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение тщательно отслеживают ежедневно. Наибольшая

доза соединения фолат-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД.

[00643] Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом фолат-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД, другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В Таблице 42 приведены примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Для снижения содержания фолата позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке, мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении исследования. Подходящее количество позитивных к фолатным рецепторам клеток из соответствующей человеческой опухолевой линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как 0,5 x L x W^2, где L = значение для большей оси в миллиметрах, а W = значение для оси, перпендикулярной L, в миллиметрах. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, контрольное лекарственное вещество и конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и удаляют основные органы для проведения клинических исследований патологии и гистопатологии.

[00644] Предполагается, нацеленный химиотерапевтический конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество будет более эффективным и менее токсичным, чем одно свободное цитотоксичное лекарственное вещество, для позитивных к фолатным рецепторам опухолей в мышиной модели.

[00645] Пример 53: Проекты клинических исследований на человеке для оценки конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00646] Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. LHRH представляет собой пептид, который функционирует в репродуктивных органах. Так как его рецепторы сконцентрированы преимущественно на определенных опухолях и не

экспрессируются в большинстве нормальных тканей, рецептор LHRH является идеальной мишенью для избирательного разрушения злокачественных опухолей. Действительно, ~52% образцов рака молочной железы, ~80% образцов рака яичников и эндометрия и ~85% образцов рака простаты являются мишенями вследствие наличия рецепторов LHRH. Следует отметить, что LHRH-зависимая терапия была бы в особенности целесообразной для тройных негативных опухолей молочной железы, которые не характеризуются сверхэкспрессией рецепторов эстрогена или прогестерона или HER2 и, следовательно, не подходят для лечения многими доступными нацеленными лекарственными веществами. У пациентов с поздними стадиями рака эндометрия, яичников или простаты часто наблюдается исключительно неблагоприятный сход, так как данные опухоли могут иметь тенденцию к повторному появлению и/или быть устойчивыми к современным способам лечения. Слияние XTEN, несущего ≥1 копии LHRH с XTEN, несущим ≥ 3 молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенные терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях ниже МПД, уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

[00647] Клиническую оценку композиции LHRH-XTEN-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от распространенных раков молочной железы, эндометрия, яичников и простаты или мочевого пузыря, с исследованиями, разработанными так, чтобы подтвердить эффективность и безопасность конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество для человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в Фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетике, чтобы определить максимальную переносимую дозу (МПД) и охарактеризовать ограничивающие дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах с метастатическими или неоперабельными раками и пациентах, для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся, а критерием отбора является позитивный статус в отношении рецепторов LHRH у пациента. Схемой исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров, которые позволяют определить МПД, а также пороговую и максимальную концентрации для дозировок и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в Фазе II и Фазе III, а также определить потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях.

[00648] Клинические исследования на людях в Фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (стадия 3 или 4) или повторным раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря. В данном исследовании оценивают эффективность и безопасность конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно вводят клинический кандидатный конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество в дозировке и согласно лечебной схеме, предопределенным в Фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость.

[00649] В фазе III проводят исследования эффективности и безопасности на пациентах с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (устойчивым, повторным) раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря, чтобы исследовать способность достижения статистически значительных клинических конечных точек, таких как отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Результаты эффективности определяют, используя стандартные статистические методы. Токсичность и признаки побочных эффектов также отслеживают при исследовании, чтобы подтвердить, что соединение является безопасным при применении описанным способом.

[00650] Пример 54: Проекты клинических исследований на человеке для оценки конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00651] Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. Фолат, также известный как фолиевая кислота, витамин B_9, является жизненно важным питательным веществом, необходимым для всех живых клеток для нуклеотидного биосинтеза, и функционирует как кофактор в некоторых биологических процессах. Фолатный рецептор является точкой фокусировки для разработки терапии для лечения быстро развивающихся злокачественных опухолей; в частности, рака яичников и немелкоклеточной карциномы легких. Хотя экспрессия фолатных рецепторов в нормальных яичниках является весьма незначительной, при ~90% эпителиальных раков яичников наблюдается сверхэкспрессия фолатных рецепторов, то же самое наблюдается для многих аденокарцином легких, тем самым

открывая возможность для нацеленной терапии. Слияние XTEN, несущего ≥1 копии фолата с XTEN, несущим ≥ 3 молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенные терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях значительно ниже максимальной переносимой дозы (МПД), уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

[00652] Клиническую оценку композиции фолат-XTEN-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей, или для пациентов, страдающих от рака яичников, устойчивого к лечению препаратами платины, или немелкоклеточной карциномы легких, которым не помогло применение другой химиотерапии. Клинические исследования, разработаны так, чтобы подтвердить эффективность и преимущества конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество по сравнению со стандартными терапиями человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в Фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетике, чтобы определить МПД и охарактеризовать ограничивающие дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам статусом, которые имеют повторные или не поддающиеся лечению распространенные опухоли, и для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся. Предметом исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров, которые позволяют определить МПД, а также установить пороговую и максимальную концентрации для дозировок и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в Фазе II и Фазе III, а также определить потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях.

[00653] Клинические исследования на людях в Фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам раком яичников, устойчивым к лечению препаратами платины, пациентам с немелкоклеточной карциномой легких, которым не помогли многочисленные химиотерапии, и пациентам, страдающим от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей. В данных исследованиях оценивают эффективность и безопасность конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно

вводят конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество в дозировке и согласно лечебной схеме, определенным в Фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость.

[00654] В фазе III проводят исследования эффективности и безопасности на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам раком яичников, устойчивым к лечению препаратами платины, пациентам с немелкоклеточной карциномой легких или пациентам с повторными или не поддающимися лечению распространенными раками, чтобы исследовать способность достижения статистически значительных клинических конечных точек, таких как отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Результаты эффективности определяют, используя стандартные статистические методы. Токсичность и признаки побочных эффектов также отслеживают при исследовании, чтобы подтвердить, что соединение является безопасным при применении описанным способом.

[00655] Пример 55: Стабильность XTEN в сыворотке крови

[00656] Гибридный белок, содержащий XTEN_AE864, сшитый с N-концом GFP, инкубировали в плазме крови обезьяны и лизате из почек крысы до 7 дней при 37°C. Образцы брали в самом начале, на день 1 и день 7 и анализировали при помощи SDS-PAGE с последующим детектированием при помощи Вестерн-блоттинга с антителами к GFP, как показано на ФИГ. 76. Последовательность XTEN_AE864 демонстрировала незначительные признаки деградации после 7 дней в плазме крови. Однако XTEN_AE864 быстро деградировал в лизате из почек крысы после 3 дней. В образцах плазмы исследовали in vivo стабильность гибридного белка, при этом GFP_AE864 был иммунопреципитирован и проанализирован при помощи SDS-PAGE, как описано выше. Образцы, которые брали вплоть до 7 дней после инъекции, демонстрировали очень небольшое количество признаков деградации. Данные результаты демонстрируют устойчивость ааТ-XTEN деградации, обусловленной сывороточными протеазами; это является одним из факторов, приводящих к усилению фармакокинетических свойств гибридных белков ааТ-XTEN.

[00657] Пример 56: Характеристика вторичной структуры XTEN, связанного с эксендином-4

[00658] Уровень вторичной структуры XTEN_AE864-Ex4 оценивали при помощи спектроскопии кругового дихроизма. КД-спектроскопию проводили на спектрополяриметре

Jasco J-715 (Jasco Corporation, Токио, Япония), оборудованном температурным регулятором Jasco Peltier (TPC-348WI). Концентрацию белка доводили до 0,2 мг/мЛ в 20 мМ фосфата натрия pH 7,0, 50 мМ NaCl. Эксперименты проводили, используя кварцевые ячейки HELLMA с длиной оптического пути в 0,1 см. КД-спектры снимали при 5°, 25°, 45° и 65°С и обрабатывали, используя J-700 версию 1.08.01 (Build 1) программного обеспечения Jasco для Windows. Образцы при каждой температуре уравновешивали на 5 мин перед проведением КД-измерений. Все спектры записывали в двойном экземпляре от 300 нм до 185 нм, используя ширину полосы в 1 нм и временную постоянную в 2 с при скорости сканирования в 100 нм/мин. На КД-спектре, приведенном на ФИГ. 77, отсутствуют признаки стабильной вторичной структуры, и он соответствует неструктурированному полипептиду.

[00659] Пример 57: Увеличение растворимости и стабильности нагрузочного пептида, обусловленное присоединением к XTEN

[00660] Для того чтобы оценить способность XTEN усиливать физико-химические свойства, такие как растворимость и стабильность, готовили и оценивали гибридные белки из глюкагона плюс XTEN меньшей длины. Исследуемые объекты готовили в Трис-солевом буфере при нейтральном уровне pH, а характеристику раствора Gcg-XTEN получали при помощи HPLC и эксклюзионной хроматографии для подтверждения гомогенности и неагрегированности белка в растворе. Данные представлены в Таблице 43. В целях сравнения измеряли порог растворимости для немодифицированного глюкагона при 60 мкМ (0,2 мг/мЛ), и результат демонстрирует, что для всех длин добавляемого XTEN было достигнуто существенное увеличение растворимости. Важным является то, что в большинстве случаев гибридные белки глюкагон-XTEN готовили так, чтобы получить целевые концентрации, и не оценивали в плане определения порога максимальной растворимости для данной конструкции. Однако, в случае глюкагона, соединенного с AF-144 XTEN, определили порог растворимости с результатом, который показал достижение 60-кратного увеличения растворимости по сравнению с глюкагоном, не соединенным с XTEN. Вдобавок, при оценке стабильности глюкагон-AF144, обнаружили, что это соединение стабильно в составе жидкого препарата на протяжении по меньшей мере 6 месяцев в охлажденном состоянии и приблизительно на протяжении одного месяца при 37ºС (данные не приведены).

[00661] Данные подтверждают заключение о том, что соединение полипептидов XTEN небольшой длины с биологически активным белком, таким как глюкагон, может значительно усилить свойства растворимости посредством образования гибридного белка, а также обеспечивает стабильность при более высоких концентрациях.

Таблица 43: Растворимость конструкций глюкагон-XTEN

Объект исследования	Растворимость

Глюкагон	60 мкМ
Глюкагон-Y36	>370 мкМ
Глюкагон-Y72	>293 мкМ
Глюкагон-AF108	>145 мкМ
Глюкагон-AF120	>160 мкМ
Глюкагон-Y144	>497 мкМ
Глюкагон-AE144	>467 мкМ
Глюкагон-AF144	>3600 мкМ
Глюкагон-Y288	>163 мкМ

[00662] Пример 58: Аналитическая эксклюзионная хроматография XTEN, соединенных с различными нагрузочными веществами

[00663] Анализ при помощи эксклюзионной хроматографии проводили для гибридных белков, содержащих различные терапевтические белки и неструктурированные рекомбинантные белки с увеличивающейся длиной. В одном из примеров исследований использовали колонку TSKGel-G4000 SWXL (7,8 мм x 30 см), в которой 40 мкг очищенного гибридного белка глюкагона с концентрацией 1 мг/мл отделяли при скорости потока в 0,6 мл/мин в 20 мМ фосфата pH 6,8, 114 мМ NaCl. Профили хроматограмм отслеживали, используя ОП214 нм и ОП280 нм. Калибровку колонок для всех исследований проводили, используя калибровочный стандарт для эксклюзионной хроматографии от BioRad; маркеры включают тироглобулин (670 кДа), бычий гамма-глобулин (158 кДа), цыплячий овальбумин (44 кДа), конский миоглобулин (17 кДа) и витамин B12 (1,35 кДа). Типичные хроматографические профили для Глюкагон-Y288, Глюкагон-Y144, Глюкагон-Y72, Глюкагон-Y36 показаны в виде накладывающихся слоев на ФИГ. 78. Данные показывают, что молекулярная масса каждого компонента пропорциональна длине присоединенной последовательности XTEN. Однако данные также показывают, что кажущаяся молекулярная масса каждой конструкции значительно выше ожидаемой для глобулярного белка (как показано в сравнении со стандартными белками, оцененными в том же исследовании). На основе данных SEC-анализа для всех оцениваемых конструкций в Таблице 44 приведены кажущиеся молекулярные массы, фактор кажущейся молекулярной массы (выраженный как отношение кажущейся молекулярной массы к рассчитанной молекулярной массе) и гидродинамический радиус (R_H в нм). Результаты указывают на то, что инкорпорация различных XTEN длиной в 576 аминокислот или более обеспечивает кажущуюся молекулярную массу гибридного белка приблизительно от 339 кДа до 760, и что XTEN длиной в 864 аминокислоты или более обеспечивает кажущуюся молекулярную массу, большую чем приблизительно 800 кДа. Результаты, показывающие пропорциональное увеличение кажущейся молекулярной массы по

сравнению с фактической молекулярной массой согласованы для гибридных белков, созданных при помощи XTEN из нескольких разных семейств мотивов; т.е., AD, AE, AF, AG и AM, при этом увеличение является по меньшей мере четырехкратным, а отношение достигает 17-кратного. Вдобавок, инкорпорация участников слияния XTEN, содержащих 576 аминокислот или более, в гибридные белки с различными нагрузочными веществами (и 288 остатков в случае глюкагона, слитого с Y288) приводит к значению гидродинамического радиуса в 7 нм или более; что сильно превышает размер гломерулярных пор, составляющий приблизительно 3-5 нм. Соответственно, ожидается, что гибридные белки, содержащие прирост и XTEN, будут характеризоваться сниженным почечным клиренсом вследствие увеличения конечного периода полувыведения и улучшением терапевтического или биологического эффекта по сравнению с соответствующим негибридным биологическим нагрузочным белком.

Таблица 44: SEC-анализ разных полипептидов

Название конструкции	**XTEN или участник слияния**	**Терапевтический белок**	**Фактическая ММ (кДа)**	**Кажущаяся ММ (кДа)**	**Фактор кажущейся молекулярной массы**	**R_H (нм)**
AC14	Y288	Глюкагон	28,7	370	12,9	7,0
AC28	Y144	Глюкагон	16,1	117	7,3	5,0
AC34	Y72	Глюкагон	9,9	58,6	5,9	3,8
AC33	Y36	Глюкагон	6,8	29,4	4,3	2,6
AC89	AF120	Глюкагон	14,1	76,4	5,4	4,3
AC88	AF108	Глюкагон	13,1	61,2	4,7	3,9
AC73	AF144	Глюкагон	16,3	95,2	5,8	4,7
AC53	AG576	GFP	74,9	339	4,5	7,0
AC39	AD576	GFP	76,4	546	7,1	7,7
AC41	AE576	GFP	80,4	760	9,5	8,3
AC52	AF576	GFP	78,3	526	6,7	7,6
AC398	AE288	ФVII	76,3	650	8,5	8,2
AC404	AE864	ФVII	129	1900	14,7	10,1
AC85	AE864	Эксендин-4	83,6	938	11,2	8,9
AC114	AM875	Эксендин-4	82,4	1344	16,3	9,4
AC143	AM875	ГРЧ	100,6	846	8,4	8,7
AC302	AE912 + AE144	ГРЧ	119,1	2,287	19,2	11,0
AC227	AM875	IL-1ra	95,4	1103	11,6	9,2
AC228	AM1318	IL-1ra	134,8	2286	17,0	10,5
AC493	AE864	FIX	127,7*	3967	31,1	12,2
AC616	AE864	GLP2-2G	83,1	1427	17,2	10
AC647	AE864	Ghrelin	82,7	996	12	9,2

Название конструкции	XTEN или участник слияния	Терапевтический белок	Фактическая ММ (кДа)	Кажущаяся ММ (кДа)	Фактор кажущейся молекулярной массы	R_H (нм)
AC659	AE864	C-пептид	82,7	822	10	8,8
AC663	AE1296	C-пептид	122,2	2348	19,2	11,1
AC434	AE288	aaT	71,1	500	7,0	7,7
AC435	AE576	aaT	97,5	1,127	11,6	9,5
AC345	AM875	aaT	122,6	1,390	11,3	9,9
AC450	AE288	aHer2_scFv	56,2	312	5,5	6,7
AC451	AE576	aHer2_scFv	82,6	760	9,2	8,6
AC452	AE864	aHer2_scFv	109,1	1,390	12,7	9,9

* за исключением гликозилирования

[00664] Пример 59: Анализ вторичной структуры последовательностей при помощи алгоритмов прогнозирования

[00665] Вторичную структуру аминокислотных последовательностей можно оценить при помощи определенных компьютерных программ или алгоритмов, таких как широко известный алгоритм Чоу-Фасмана (Chou, P. Y., *et al*. (1974) *Biochemistry*, **13**: 222-45) и метод Гарнье-Осгуторпа-Робсона или "GOR" (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol 266:540-553). Для заданной последовательности с помощью алгоритмов можно спрогнозировать наличие какой-либо вторичной структуры или ее полное отсутствие, выраженное в виде общего количества и/или процентного содержания в последовательности остатков, которые образуют, например, альфа-спирали или бета-слои, либо процентного содержания в последовательности остатков, для которых прогнозируется образование произвольных спиралей.

[00666] Оценивали несколько типичных последовательностей, принадлежащих "семействам" XTEN, используя два инструмента для алгоритмов согласно методам Чоу-Фасмана и GOR для оценки уровня вторичной структуры в этих последовательностях. Инструмент для алгоритма Чоу-Фасмана предоставлен Вильямом Р. Пирсоном и Университетом Виржинии на интернет-сайте "Biosupport", URL в World Wide Web: .fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1 на момент 19 июня 2009 г. Инструмент для алгоритма GOR предоставлен Pole Informatique Lyonnais на интернет-сайте Network Protein Sequence Analysis, URL в World Wide Web: .npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl на момент 19 июня 2008 г.

[00667] На первом этапе анализа единичную последовательность XTEN анализировали при помощи двух алгоритмов. Композиция AE864 представляет собой XTEN с 864 аминокислотными остатками, созданный из множественных копий четырех мотивов 12-

аминокислотных последовательностей, состоящих их аминокислот G, S, T, E, P и A. Мотивы последовательностей характеризуются тем фактом, что в пределах мотивов и в пределах полной последовательности существует ограничение по повторяемости, так, что последовательность из двух последовательных аминокислот не повторяется более чем дважды в любом из 12-аминокислотных мотивов, а в полноразмерном XTEN не существует идентичных групп из трех последовательных аминокислот. Более протяженные части последовательности AF 864 из N-конца анализировали одну за другой при помощи алгоритмов Чоу-Фасмана и GOR (для последнего необходима минимальная длина в 17 аминокислот). Последовательности анализировали путем введения последовательностей в формате FASTA в инструменты прогнозирования и проведения анализа. Результаты анализа представлены в Таблице 45.

[00668] Результаты показывают, что согласно расчетам по алгоритму Чоу-Фасмана короткие XTEN из семейств AE и AG длиной по меньшей мере в 288 аминокислотных остатков не образуют альфа-спиралей и бета-слоев, но количество прогнозируемого процентного содержания произвольных спиралей согласно алгоритму GOR варьируется в пределах 78-99%. С увеличением длины XTEN от 504 остатков до более чем 1300, анализ XTEN по алгоритму Чоу-Фасмана дал прогноз процентного содержания альфа-спиралей или бета-слоев от 0 до около 2%, а рассчитанное процентное содержание произвольных спиралей возросло до 94-99%. XTEN с прогнозируемыми альфа-спиралями или бета-слоями были те последовательности, которые содержали одну или более групп из трех последовательных остатков серина, что привело к прогнозированию образования бета-слоев. При этом даже эти последовательности характеризуются вероятностью образования произвольных спиралей в 99%.

[00669] Данный анализ подтверждает заключение о том, что: 1) для XTEN, созданных из множественных мотивов последовательностей из G, S, T, E, P и A, которые имеют ограниченную повторяемость в отношении последовательных аминокислот, прогнозируется очень низкая вероятность образования альфа-спиралей и бета-слоев; 2) увеличение длины XTEN не приводит к значительному увеличению вероятности образования альфа-спиралей и бета-слоев; и 3) прогрессивное увеличение длины последовательности XTEN путем добавления неповторяющихся 12-меров, состоящих из аминокислот G, S, T, E, P и A, приводит к увеличенному процентному содержанию произвольных спиральных образований. На основе многих последовательностей, оцененных при помощи данных методов, можно заключить, что XTEN, созданные из мотивов последовательностей G, S, T, E, P и A, которые имеют ограничение по повторяемости (определяемое как присутствие не более двух идентичных последовательных аминокислот в любом из мотивов), как ожидается, имеют очень ограниченную вторичную структуру. За исключением мотивов, содержащих три последовательных серина, в общем случае любой порядок или комбинацию мотивов

последовательностей из Таблицы 1 можно использовать для создания полипептида XTEN, что приведет к образованию последовательности XTEN, практически лишенной вторичной структуры, а эффект, оказываемый тремя последовательными серинами, улучшается при увеличении длины XTEN. Ожидается, что такие последовательности будут обладать характеристиками, описанными в вариантах реализации XTEN-содержащих композиций изобретения, раскрытых в данном тексте.

Таблица 45: Прогнозные расчеты по методам ЧОУ-ФАСМАНА и GOR для последовательностей полипептидов

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
AE36: LCW0402_002	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	36	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AE36: LCW0402_003	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	36	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AG36: LCW0404_001	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	36	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	77,78%
AG36: LCW0404_003	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	36	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	83,33 %
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS	42	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	90,48%
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS	42	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	90,48%
AG42_1	GAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGP	42	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	88,10%
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP	42	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	88,10%
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP	144	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E:	98,61%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP		0,0	
AG144_1	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS	144	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	91,67%
AE288	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	288	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	99,31%
AG288_2	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP	288	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	92,71
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSNPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSNPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	504	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AD 576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGG	576	Итоги по остаткам: H: 7 E: 0 процент: H: 1,2 E:	99,65%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	PGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSS ESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGS SEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGS ESGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGE PSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSG SESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSG SGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPG GSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGSS GSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSE GSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESG SSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSES GSSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESS GSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS		0,0	
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP	576	Итоги по остаткам: H: 2 E: 0 процент: H: 0,4 E: 0,0	99,65%
AG576	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG	576	Итоги по остаткам: H: 0 E: 3 процент: H: 0,4 E: 0,5	99,31%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS			
AF540	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTS ESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAE SPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPS GTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTST PESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESG SASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTS STAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESG SASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAP	540	Итоги по остаткам: H: 2 E: 0 процент: H: 0,4 E: 0,0	99,65
AD836	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESP GGSSGSESGSGGEPSESGSSGESPGGS SGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGG PGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGES PGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGG SSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEG GPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPG SSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGG EPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSS GSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESS GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSE GSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGESPGGSSGSESGSGGEPSESG SSGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGS GGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPG ESSGSEGSSGPGESSGSGGEPSESGSSG SSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPG GSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGP GESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGSSE SGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSG PGESSGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGES SGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGES PGGSSGSESGESPGGSSGSESGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGS ESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESG	836	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	98,44%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	SSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSES GSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSES GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSG GEPSESGSS			
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	864	Итоги по остаткам: H: 2 E: 3 процент: H: 0,2 E: 0,4	99,77%
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESG SASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGES STAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGPXXXGASASGAPSTXXXX SESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTS	875	Итоги по остаткам: H: 2 E: 0 процент: H: 0,2 E: 0,0	95,20%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	PSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTS PSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTA PGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGST SESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTA PGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTS PSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTA PGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSP			
AG864	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSP	864	Итоги по остаткам: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,91%
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESG SASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE	875	Итоги по остаткам: H: 7 E: 3 процент: H: 0,8 E: 0,3	98,63%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTA PGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGT SPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESP GPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP			
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESG SASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGPEPTGPAPSGGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAE SPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS	1318	Итоги по остаткам: H: 7 E: 0 процент: H: 0,7 E: 0,0	99,17%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPSG ESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESST APGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTSTPESG SASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGTSTPESGSASPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSSTAESPGPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAP			
AM923	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPE SGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG STSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTS STAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGES STAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAP	924	Итоги по остаткам: H: 4 E: 3 процент: H: 0,4 E: 0,3	98,70%
AE912	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGS	913	Итоги по остаткам:	99,45%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAP		Н: 8 Е: 3 процент: Н: 0,9 Е: 0,3	
ВС 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEP ATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATS GTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEP SGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSE PATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATS GTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGS AGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGS EPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSGAS EPTSTEPGTSEPSTSEPGAGSEPATSGT EPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAG TSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPA TSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGT EPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAG SEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTE PSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTS TEPGTSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPG SEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPA TSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEP GSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEP GTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTST EPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSE PGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSA		Итоги по остаткам: Н: 0 Е: 0 процент: Н: 0 Е: 0	99,77%

Название SEQ	Последовательность	Кол-во остатков	Расчет по Чоу-Фасману	Расчет по GOR
	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA			

* H: альфа-спираль E: бета-слой

[00670] Пример 60: Анализ полипептидных последовательностей на повторяемость

[00671] Повторяемость полипептидных аминокислотных последовательностей можно оценить путем подсчета количества появлений более короткой подпоследовательности во всем полипептиде. Например, полипептид из 200 аминокислотных остатков содержит 192 перекрывающихся 9-аминокислотных подпоследовательности (или 9-мерных “рамок”), но количество уникальных 9-мерных подпоследовательностей зависит от количества повторов в пределах последовательности. В настоящем анализе оценивали на повторяемость различные последовательности путем суммирования появления всех уникальных 3-мерных подпоследовательностей для каждой 3-аминокислотной рамки среди первых 200 аминокислот части полимера и деления на абсолютное количество уникальных 3-мерных подпоследовательностей в пределах последовательности из 200 аминокислот. Полученное в результате значение для подпоследовательностей отображает степень повторяемости в пределах полипептида.

[00672] Результаты, приведенные в Таблице 46, указывают на то, что неструктурированные полипептиды, состоящие из 2 или 3 типов аминокислот, имеют высокие значения для подпоследовательностей, в то время как те, что состоят из 12 аминокислотных мотивов из шести аминокислот G, S, T, E, P и A с низкой степенью интервальной повторяемости, имеют значения для подпоследовательностей менее 10 и, в некоторых случаях, менее 5. Например, последовательность L288 содержит два типа аминокислот и имеет короткие, часто повторяющиеся последовательности, что приводит к значению для подпоследовательностей в 50,0. Полипептид J288 содержит три типа аминокислот, но также имеет короткие, часто повторяющиеся последовательности, что приводит к значению для подпоследовательностей в 33,3. Y576 также содержит три типа аминокислот, но не состоит из интервальных повторов, что отображается на величине для подпоследовательностей, составляющей 15,7 для первых 200 аминокислот. W576 состоит из четырех типов аминокислот, но имеет более высокую степень

интервальной повторяемости, например, “GGSG”, что приводит к значению для подпоследовательностей в 23,4. AD576 состоит из четырех типов 12-аминокислотных мотивов, каждый из которых состоит из четырех типов аминокислот. Из-за низкой степени интервальной повторяемости отдельных мотивов общее значение для подпоследовательностей среди первых 200 аминокислот составляет 13,6. В противоположность этому, XTEN, состоящий из четырех мотивов, содержит шесть типов аминокислот, каждая с низкой степенью интервальной повторяемости, и имеет более низкие значения для подпоследовательностей: т.е., AE864 (6,1), AF864 (7,5) и AM875 (4,5).

[00673] Выводы: Данные результаты указывают на то, что комбинация из 12-аминокислотных мотивов подпоследовательностей, каждый из которых содержит от четырех до шести типов аминокислот, которые являются в основном неповторяемыми, в более протяженном полипептиде XTEN приводит к тому, что вся последовательность является неповторяемой. Это справедливо, несмотря на тот факт, что каждый мотив подпоследовательностей может быть неоднократно использован на протяжении последовательности. В противоположность этому, полимеры, созданные из меньшего количества типов аминокислот, имеют более высокие значения для подпоследовательностей, хотя реальная последовательность может быть обрезана для уменьшения степени повторяемости и получения более низких значений для подпоследовательностей.

Таблица 46: Расчеты значений для подпоследовательностей для полипептидных последовательностей

Название посл.	Аминокислотная последовательность	Значение
J288	GSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGS GGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGG EGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEG GSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGS GGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGG EGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEGGSGGEG	33,3
K288	GEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGE GGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGE GGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEG EGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGG EGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGE GEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEGGEGEGGGEG	46,9
L288	SSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSE SSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSS ESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSS SESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESS SSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSESSSESSESSSSES	50,0
Y288	GEGSGEGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGGSEGSEGEGGSEGSEGEGGSEG SEGEGSGEGSEGEGGSEGSEGEGSGEGSEGEGSEGGSEGEGGSEGSEGEGSG EGSEGEGGEGGSEGEGSEGSGEGEGSGEGSEGEGSEGSGEGEGSGEGSEGEG SEGSGEGEGSEGSGEGEGGSEGSEGEGSEGSGEGEGGEGSGEGEGSGEGSEG EGGGEGSEGEGSGEGGEGEGSEGGSEGEGGSEGGEGEGSEGSGEGEGSEGG	26,8

Название посл.	Аминокислотная последовательность	Значение
	SEGEGSEGGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGE	
Q576	GGKPGEGGKPEGGGGKPGGKPEGEGEGKPGGKPEGGGKPGGGEGGKPEGG KPEGEGKPGGGEGKPGGKPEGGGGKPEGEGKPGGGGGKPGGKPEGEGKPG GGEGGKPEGKPGEGGEGKPGGKPEGGGEGKPGGGKPGEGGKPGEGKPGGG EGGKPEGGKPEGEGKPGGGEGKPGGKPGEGGKPEGGGEGKPGGKPGEGGE GKPGGGKPEGEGKPGGGKPGGGEGGKPEGEGKPGGKPEGGGEGKPGGKPE GGGKPEGGGEGKPGGGKPGEGGKPGEGEGKPGGKPEGEGKPGGEGGGKPE GKPGGGEGGKPEGGKPGEGGKPEGGKPGEGGEGKPGGGKPGEGGKPEGGG KPEGEGKPGGGGKPGEGGKPEGGKPEGGGEGKPGGGKPEGEGKPGGGEGK PGGKPEGGGGKPGEGGKPEGGKPGGEGGGKPEGEGKPGGKPGEGGGGKPG GKPEGEGKPGEGGEGKPGGKPEGGGEGKPGGKPEGGGEGKPGGGKPGEGG KPEGGGKPGEGGKPGEGGKPEGEGKPGGGEGKPGGKPGEGGKPEGGGEGK PGGKPGGEGGGKPEGGKPGEGGKPEG	18,5
U576	GEGKPGGKPGSGGGKPGEGGKPGSGEGKPGGKPGSGGSGKPGGKPGEGGK PEGGSGGKPGGGGKPGGKPGGEGSGKPGGKPEGGGKPEGGSGGKPGGKPE GGSGGKPGGKPGSGEGGKPGGGKPGGEGKPGSGKPGGEGSGKPGGKPEGG SGGKPGGKPEGGSGGKPGGSGKPGGKPGEGGKPEGGSGGKPGGSGKPGGK PEGGGSGKPGGKPGEGGKPGSGEGGKPGGGKPGGEGKPGSGKPGGEGSGK PGGKPGSGGEGKPGGKPEGGSGGKPGGGKPGGEGKPGSGGKPGEGGKPGS GGGKPGGKPGGEGEGKPGGKPGEGGKPGGEGSGKPGGGGKPGGKPGGEG GKPEGSGKPGGGSGKPGGKPEGGGGKPEGSGKPGGGGKPEGSGKPGGGKP EGGSGGKPGGSGKPGGKPGEGGGKPEGSGKPGGGSGKPGGKPEGGGKPEG GSGGKPGGKPEGGSGGKPGGKPGGEGSGKPGGKPGSGEGGKPGGKPGEGS GGKPGGKPEGGSGGKPGGSGKPGGKPEGGGSGKPGGKPGEGGKPGGEGSG KPGGSGKPG	18,1
W576	GGSGKPGKPGGSGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGGGSG KPGSGKPGGGGKPGSGSGKPGGGKPGGSGGKPGGGSGKPGKPGSGGSGKP GSGKPGGGSGGKPGKPGSGGSGGKPGKPGSGGGSGKPGKPGSGGSGGKPG KPGSGGSGGKPGKPGSGGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGSGGSGKPGKPG SGGSGKPGSGKPGSGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGSGGSGKPGKPGSGG GKPGSGSGKPGGGKPGSGSGKPGGGKPGGSGGKPGGSGGKPGKPGSGGGS GKPGKPGSGGGSGKPGKPGGSGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGSGGSGKP GKPGSGGSGGKPGKPGSGGGKPGSGSGKPGGGKPGSGSGKPGGGKPGSGSG KPGGGKPGSGSGKPGGSGKPGSGKPGGGSGGKPGKPGSGGSGKPGSGKPGS GGSGKPGKPGGSGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGGGSGKPGSGKPGGGSG KPGSGKPGGGGKPGSGSGKPGGSGGKPGKPGSGGSGGKPGKPGSGGSGKPG SGKPGGGSGGKPGKPGSGG	23,4
Y576	GEGSGEGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGGSEGSEGEGSEGSGEGEGGEGS GEGEGSGEGSEGEGGGEGSEGEGSGEGGEGEGSEGGSEGEGGSEGGEGEGS EGSGEGEGSEGGSEGEGSEGGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGE GSEGSGEGEGSEGGSEGEGGSEGSEGEGSGEGSEGEGGSEGSEGEGGGEGSE GEGSGEGSEGEGGSEGSEGEGGSEGSEGEGGEGSGEGEGSEGSGEGEGSGEG SEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGGSEGSEGEGSGEGSEGEGSEGSGEGEGSE GSGEGEGGSEGSEGEGGSEGSEGEGGSEGSEGEGGEGSGEGEGSEGSGEGEG SGEGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGGSEGSEGEGSEGSGEGEGGEGSGEG EGSGEGSEGEGGGEGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGSEGGSEGEGGSEGS EGEGSEGGSEGEGSEGGSEGEGSEGSGEGEGSEGSGEGEGSGEGSEGEGGSE GGEGEGSEGGSEGEGSEGGSEGEGGEGSGEGEGGGEGSEGEGSEGSGEGEG SGEGSE	15,7
AD576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESS GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS GSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES	13,6

Название посл.	Аминокислотная последовательность	Значение
	GESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSES GSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS	
AE576	AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	6,1
AF540	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTA ESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESS TAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTS ESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSES PSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPG TSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTS PSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	8,8
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSNPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSNPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSP	7,0
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	6,1
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESS TAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTS	7,5

Название посл.	Аминокислотная последовательность	Значение
	ESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPE SGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPG TSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGPXXXGASASGA PSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGST SESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESST APGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSE SPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGT SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAES PGPGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	
AG868	GGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSNPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSNPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	7,5
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPES GSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASG APSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGS TSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	4,5
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPES GSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGPEPTGP APSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSE	4,5

Название посл.	Аминокислотная последовательность	Значение
	SPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGAS ASGAPSTGGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA P	

[00674] **Пример 61: Расчет значений для TEPITOPE**

[00675] Значения для TEPITOPE 9-мерной пептидной последовательности можно рассчитать путем добавления карманных потенциалов, как описано у Sturniolo [Sturniolo, T., et al. (1999) Nat Biotechnol, 17: 555]. В настоящем Примере отдельные значения для Tepitope рассчитывали для индивидуальных аллелей HLA. В Таблице 47 в качестве примера приведены карманные потенциалы для HLA*0101B, который имеет большую частоту появления среди европиоидной расы. Для того чтобы рассчитать значение для TEPITOPE пептида с последовательностью P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9, добавляли соответствующие индивидуальные карманные потенциалы из Таблицы 47. Значение для HLA*0101B 9-мерного пептида с последовательностью FDKLPRTSG представляет собой сумму 0, -1,3, 0, 0,9, 0, -1,8, 0,09, 0, 0.

[00676] Для оценки значений TEPITOPE протяженных пептидов можно повторить процесс для всех 9-мерных подпоследовательностей, принадлежащих последовательностям. Этот процесс можно повторять для белков, кодируемых другими аллелями HLA. В Таблицах 48-51 приведены карманные потенциалы для белковых продуктов аллелей HLA, которые имеют большую частоту появления среди европиоидной расы.

[00677] Рассчитанные по данному методу значения для TEPITOPE находятся в диапазоне от приблизительно -10 до +10. При этом 9-мерные пептиды, у которых отсутствует гидрофобная аминокислота (FKLMVWY) в позиции P1, характеризуются расчетными значениями TEPITOPE в диапазоне от -1009 до -989. Данная величина является биологически бессмысленной и отображает тот факт, что гидрофобная аминокислота служит в качестве якорного остатка для связывания HLA, а пептиды, у которых отсутствует гидрофобный остаток в P1, считаются не связывающимися с HLA. Так как в большинстве последовательностей XTEN отсутствуют гидрофобные остатки, все комбинации 9-мерных подпоследовательностей будут

характеризоваться значениями TEPITOPEs в диапазоне от -1009 до -989. Данный метод подтверждает то, что полипептиды XTEN прогнозируемо могут содержать мало или не содержать эпитопы Т-клеток.

Таблица 47: Карманный потенциал для аллеля HLA*0101B.

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-2,4	-	-2,7	-2	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,4	-	-2,4	-0,6	-	-1,9
F	0	0,8	0,8	0,08	-	-2,1	0,3	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	-0,7	-	-0,3	-1,1	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	-0,7	-	-2,2	0,1	-	-1,1
I	-1	1,1	1,5	0,5	-	-1,9	0,6	-	0,7
K	-999	1,1	0	-2,1	-	-2	-0,2	-	-1,7
L	-1	1	1	0,9	-	-2	0,3	-	0,5
M	-1	1,1	1,4	0,8	-	-1,8	0,09	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	0,04	-	-1,1	0,1	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-1,9	-	-0,2	0,07	-	-1,1
Q	-999	1,2	0	0,1	-	-1,8	0,2	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	-2,1	-	-1,8	0,09	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,7	-	-0,6	-0,2	-	-0,3
T	-999	0	0	-1	-	-1,2	0,09	-	-0,2
V	-1	2,1	0,5	-0,1	-	-1,1	0,7	-	0,3
W	0	-0,1	0	-1,8	-	-2,4	-0,1	-	-1,4
Y	0	0,9	0,8	-1,1	-	-2	0,5	-	-0,9

Таблица 48: Карманный потенциал для аллеля HLA*0301B.

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	2,3	-	-2,4	-0,6	-	-0,6
E	-999	0,1	-1,2	-1	-	-1,4	-0,2	-	-0,3
F	-1	0,8	0,8	-1	-	-1,4	0,5	-	0,9
G	-999	0,5	0,2	0,5	-	-0,7	0,1	-	0,4
H	-999	0,8	0,2	0	-	-0,1	-0,8	-	-0,5
I	0	1,1	1,5	0,5	-	0,7	0,4	-	0,6
K	-999	1,1	0	-1	-	1,3	-0,9	-	-0,2
L	0	1	1	0	-	0,2	0,2	-	-0
M	0	1,1	1,4	0	-	-0,9	1,1	-	1,1
N	-999	0,8	0,5	0,2	-	-0,6	-0,1	-	-0,6

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
P	-999	-0,5	0,3	-1	-	0,5	0,7	-	-0,3
Q	-999	1,2	0	0	-	-0,3	-0,1	-	-0,2
R	-999	2,2	0,7	-1	-	1	-0,9	-	0,5
S	-999	-0,3	0,2	0,7	-	-0,1	0,07	-	1,1
T	-999	0	0	-1	-	0,8	-0,1	-	-0,5
V	0	2,1	0,5	0	-	1,2	0,2	-	0,3
W	-1	-0,1	0	-1	-	-1,4	-0,6	-	-1
Y	-1	0,9	0,8	-1	-	-1,4	-0,1	-	0,3

Таблица 49: Карманный потенциал для аллеля HLA*0401B.

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	1,4	-	-1,1	-0,3	-	-1,7
E	-999	0,1	-1,2	1,5	-	-2,4	0,2	-	-1,7
F	0	0,8	0,8	-0,9	-	-1,1	-1	-	-1
G	-999	0,5	0,2	-1,6	-	-1,5	-1,3	-	-1
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-1,4	0	-	0,08
I	-1	1,1	1,5	0,8	-	-0,1	0,08	-	-0,3
K	-999	1,1	0	-1,7	-	-2,4	-0,3	-	-0,3
L	-1	1	1	0,8	-	-1,1	0,7	-	-1
M	-1	1,1	1,4	0,9	-	-1,1	0,8	-	-0,4
N	-999	0,8	0,5	0,9	-	1,3	0,6	-	-1,4
P	-999	-0,5	0,3	-1,6	-	0	-0,7	-	-1,3
Q	-999	1,2	0	0,8	-	-1,5	0	-	0,5
R	-999	2,2	0,7	-1,9	-	-2,4	-1,2	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	0,8	-	1	-0,2	-	0,7
T	-999	0	0	0,7	-	1,9	-0,1	-	-1,2
V	-1	2,1	0,5	-0,9	-	0,9	0,08	-	-0,7
W	0	-0,1	0	-1,2	-	-1	-1,4	-	-1
Y	0	0,9	0,8	-1,6	-	-1,5	-1,2	-	-1

Таблица 50: Карманный потенциал для аллеля HLA*0701B.

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-1,6	-	-2,5	-1,3	-	-1,2
E	-999	0,1	-1,2	-1,4	-	-2,5	0,9	-	-0,3
F	0	0,8	0,8	0,2	-	-0,8	2,1	-	2,1
G	-999	0,5	0,2	-1,1	-	-0,6	0	-	-0,6

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
H	-999	0,8	0,2	0,1	-	-0,8	0,9	-	-0,2
I	-1	1,1	1,5	1,1	-	-0,5	2,4	-	3,4
K	-999	1,1	0	-1,3	-	-1,1	0,5	-	-1,1
L	-1	1	1	-0,8	-	-0,9	2,2	-	3,4
M	-1	1,1	1,4	-0,4	-	-0,8	1,8	-	2
N	-999	0,8	0,5	-1,1	-	-0,6	1,4	-	-0,5
P	-999	-0,5	0,3	-1,2	-	-0,5	-0,2	-	-0,6
Q	-999	1,2	0	-1,5	-	-1,1	1,1	-	-0,9
R	-999	2,2	0,7	-1,1	-	-1,1	0,7	-	-0,8
S	-999	-0,3	0,2	1,5	-	0,6	0,4	-	-0,3
T	-999	0	0	1,4	-	-0,1	0,9	-	0,4
V	-1	2,1	0,5	0,9	-	0,1	1,6	-	2
W	0	-0,1	0	-1,1	-	-0,9	1,4	-	0,8
Y	0	0,9	0,8	-0,9	-	-1	1,7	-	1,1

Таблица 51: Карманный потенциал для аллеля HLA*1501B.

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-0,4	-	-0,4	-0,7	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,6	-	-1	-0,7	-	-1,9
F	-1	0,8	0,8	2,4	-	-0,3	1,4	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	0	-	0,5	0	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-0,5	0,6	-	-1,1
I	0	1,1	1,5	0,6	-	0,05	1,5	-	0,7
K	-999	1,1	0	-0,7	-	-0,3	-0,3	-	-1,7
L	0	1	1	0,5	-	0,2	1,9	-	0,5
M	0	1,1	1,4	1	-	0,1	1,7	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	-0,2	-	0,7	0,7	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-0,3	-	-0,2	0,3	-	-1,1
Q	-999	1,2	0	-0,8	-	-0,8	-0,3	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	0,2	-	1	-0,5	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,3	-	0,6	0,3	-	-0,3
T	-999	0	0	-0,3	-	-0	0,2	-	-0,2
V	0	2,1	0,5	0,2	-	-0,3	0,3	-	0,3
W	-1	-0,1	0	0,4	-	-0,4	0,6	-	-1,4
Y	-1	0,9	0,8	2,5	-	0,4	0,7	-	-0,9

[00678] Пример 62: Анализ мобилизационной активности GPCR Ca2+

[00679] Рекомбинантный GLP2-2G-XTEN готовили как описано в Alters, S. et al. (2012) GLP2-2G-XTEN: фармацевтический белок с улучшенными сывороточным периодом полувыведения и эффективностью в крысиной модели болезни Крона. PLoS One; 7(11): e50630. Конъюгат GLP2-2G-XTEN готовили как описано в Примере 26 (ФИГ. 68) и очищали при помощи препаративной RP-HPLC (ФИГ. 70). Анализ мобилизационной активности потока GPCR Ca2+ проводили, используя кальций-оптимизированную стабильную клеточную линию рекомбинантных человеческих рецепторов GLP-2 семейства глюкагонов от EMD Millipore ChemiSCREEN, используемую согласно инструкциям производителя, с результатами, представленными на ФИГ. 110. Данные по рекомбинантному и конъюгированному GLP2-2G-XTEN были представлены в виде восьмиточечной кривой доза-ответ для трехкратного серийного разведения. Кривые доза-ответ аппроксимировали, используя 4PL-регрессионный график, где по оси Y отложены ОЕФ, с данными, выраженными в процентах относительно абсолютного максимума ОЕФ, в зависимости от концентрации, отложенной по оси X. Как рекомбинантный GLP2-2G-XTEN, так и конъюгат GLP2-2G-XTEN демонстрировали зависимую от дозировки активность агонистов с прогнозированными величинами эффективности EC50 в 423 нМ и 529 нМ, соотвественно.

[00680] Пример 63: Анализ in vitro плазменной стабильности конъюгата GLP2-2G-XTEN

[00681] Одинаковые концентрации рекомбинантного GLP2-2G-XTEN и конъюгата GLP2-2G-XTEN независимо вносили соответственно в плазму крови крысы, яванского макака и человека. Образцы инкубировали при 37°C до 10 дней, забирая аликвоты в соответствующие временные интервалы, и хранили при -80°C до проведения анализа. Плазменную стабильность конъюгированного GLP2-2G-XTEN для различных видов сравнивали с соответствующей величиной для рекомбинантного GLP2-2G-XTEN при помощи анти-XTEN/GLP2 ELISA, проводимого в соответствующих плазменных матрицах. Анти-XTEN/GLP2 ELISA состоит из мышиного антитела к XTEN в качестве захватывающего антитела и биотинилированного антитела к человеческому GLP2 в качестве детекторного антитела. Как показано на ФИГ. 111, in vitro стабильность конъюгата GLP2-2G-XTEN в человеческой плазме сравнима со значением для рекомбинантного GLP2-2G-XTEN, имеющего рассчитанный стабильный период полувыведения >240 ч. Аналогичную in vitro стабильность наблюдали для двух белков GLP2-2G-XTEN в плазме крови крысы и яванского макака (данные не приведены).

[00682] Пример 64: Фармакокинетика конъюгата GLP2-2G-XTEN для крыс

[00683] Самок крыс штамма SD (200-220 г) случайным образом собирали в группы по 3 животных в каждой. Рекомбинантный GLP-2G-XTEN и конъюгат GLP2-2G-XTEN вводили каждому животному путем подкожной инъекции в дозировке 2 мг/кг. Образцы крови (0,2 мл)

собирали в предварительно охлажденные гепаринизированные микротайнеры перед дозированием, и через 0,08, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 и 168 часов после введения исследуемых соединений. Затем кровь перерабатывали в плазму, моментально замораживали и хранили при -80°C до проведения анализа. Образцы плазмы анализировали при помощи анти-XTEN/GLP2 ELISA, в котором используется мышиное антитело к XTEN в качестве захватывающего антитела и биотинилированное антитело к человеческому GLP2 в качестве детекторного антитела. ELISA проводили, используя подходящий рекомбинантный GLP2-2G-XTEN или конъюгат GLP2-2G-XTEN в качестве соответствующих калибровочных стандартов ELISA (ФИГ. 112). Рассчитанный период полувыведения для рекомбинантного GLP2-2G-XTEN (36 (±7) ч) и конъюгата GLP2-2G-XTEN (37 (±7) ч) оказался сходным.

[00684] Пример 65: Тримерный конъюгат XTEN, соединенный посредством С-концевых цистеинов

[00685] Тримерный конъюгат XTEN готовили согласно следующей процедуре. Аликвоту белка XTEN 1xAmino,1xThiol-XTEN432 (XTEN_AE432(Am1,C422)) с одним внутренним остатком цистеина готовили в виде 587 мкМ (23,23 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. Трис-[2-малеинимидоэтил]амин (ТМЭА, Thermo Scientific, cat. # 33043) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 10 мМ. ТМЭА добавляли в белковый раствор для связывания тиоловой группы XTEN (с количеством белка, в 5х превышающем в молярном отношении количество линкера). Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°C, а продукт реакции анализировали при помощи SEC-HPLC (Phenomenex BioSep-SEC-s4000 600 х 7,80 мм, буфер: 50 мМ фосфата натрия pH 6,5, 300 мМ NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, изократическое элюирование на протяжении 70 мин). Линейные XTEN_432, XTEN_864 и XTEN_1296 (содержащие 432, 864 и 1296 аминокислоты, соответственно) анализировали в тех же условиях, чтобы определить реакционные продукты (ФИГ. 113). Пик 1, элюированный на 28 мин, в то же время, что и XTEN_1296, идентифицировали как тример XTEN_432. Пик 2, элюированный на 30,5 мин, в то же время, что и XTEN_864, идентифицировали как димер XTEN_432. Пик 3, элюированный на 35 мин, в то же время, что и XTEN_432, идентифицировали как предшественник XTEN_432. Выходы тримерного конъюгата XTEN и димерного конъюгата XTEN составили 19% и 36%, соответственно. В основном схожие времена удержания для тримерного конъюгата 3xXTEN_432 и линейной молекулы XTEN_1296 дают возможность предположить, что кажущаяся молекулярная масса и гидродинамический радиус белка XTEN не зависят от его геометрической конфигурации.

[00686] Пример 66: Тримерный конъюгат XTEN, соединенный посредством N-концевых α-аминогрупп

[00687] Тримерный конъюгат XTEN готовили согласно следующей процедуре.

[00688] 1. Синтез 1xDBCO-XTEN288

[00689] Аликвоту белка 1xAmino-XTEN288 (XTEN_AE288(Am1)) готовили в виде 758 мкМ (20 мг/мл) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. 2 мл белка смешивали с 0,1 мл 1М ГЭПЭС pH 8,0 и 0,152 мл 50 мМ ДБЦО-сульфо-NHS (Click Chemistry Tools, cat. # A124) растворяли в безводном ДМФ для связывания группы ДБЦО с N-концевой аминогруппой XTEN. Реакционную смесь инкубировали на протяжении 2 ч при 25°С и анализировали при помощи аналитической RP-HPLC (ФИГ. 114А). Реакционную смесь разводили до 15 мЛ с 0,01% ТФК, а pH доводили до ~3, используя 10% раствор ТФК. Белковый раствор делили на две одинаковые части, и каждую часть загружали в препаративную C4 RP-HPLC колонку Vydac C4 250 x 10 мм (Grace Davison Discovery Sciences, cat. # 214TP510). Белок элюировали с 180 мл линейным 5-50% градиентом ацетонитрила в 0,01% ТФК при скорости потока 2 мл/мин. Фракции, содержащие 1xDBCO-XTEN288, доводили до pH ~ 7 при помощи 1 М ГЭПЭС pH 8 и концентрировали выпариванием в вакууме.

[00690] 2. Синтез 3xAzide-PEG4-TAEA

[00691] Трис(2-аминоэтил)амин (TAEA, Sigma Aldrich, cat. # 225630) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 200 мМ. Азидо-ПЭГ4-NHS эфир (Click Chemistry Tools, cat. # AZ103) растворяли в безводном ДМФ до конечной концентрации в 1 М. Азидо-ПЭГ4-NHS смешивали в количестве, 5-кратно превышающем в молярном отношении, с Трис(2-аминоэтил)амином и инкубировали при 25°С на протяжении 1 часа. 3хАзид-ПЭГ4-ТАЭА очищали, используя C18 RP-HPLC, используя колонку Phenomenex Jupiter C18 5u 300Å 150 x 4.60 мм, буфер А 0,1% ТФК в воде, буфер В 0,1% ТФК в ацетонитриле, скорость потока 1 мл/мин, градиент от 5 до 50%В за 45 мин. Хроматографические пики собирали и анализировали при помощи MALDI-TOF MS и ESI-MS, чтобы зарегистрировать продукт с ММ в 966 Да. 3хАзид-ПЭГ4-ТАЭА определяли как пик со временем удержания в 33 мин (ФИГ. 114В). Фракции нейтрализовали, используя 1М ГЭПЭС pH 8,0 и концентрировали выпариванием в вакууме.

[00692] 3. Синтез тримерного конъюгата XTEN

[00693] 1хДБЦО-XTEN288 готовили в виде 7,85 мг/мл (293 мкМ) раствора в 20 мМ ГЭПЭС, pH 7,0, 50 мМ NaCl. 3хАзид-ПЭГ4-ТАЭА очищали при помощи RP-HPLC и формулировали в том же буфере. Концентрацию синтезированного линкера не определяли, а 1хДБЦО-XTEN288 и 3хАзид-ПЭГ4-ТАЭА смешивали эмпирически в разных соотношениях и инкубировали при 25°С на протяжении 4 часов. Продукты конъюгации анализировали, используя SEC-HPLC (Phenomenex BioSep-SEC-s4000 600 x 7,80 мм, буфер: 50 мМ фосфата натрия pH 6,5, 300 мМ NaCl, скорость потока 0,5 мл/мин, изократическое элюирование на протяжении 70 мин). Линейные XTEN_288, XTEN_576 и XTEN_864 анализировали в тех же условиях, чтобы

определить реакционные продукты (ФИГ. 115). Пик 1, элюированный на 30,5 мин, в то же время, что и XTEN_864, идентифицировали как тример XTEN288. Пик 2, элюированный на 34 мин, в то же время, что и XTEN_576, идентифицировали как димер XTEN_288. Пик 3, элюированный на 39 мин, в то же время, что и XTEN_288, идентифицировали как предшественник XTEN_288. Пик 4 соответствует соединениям с низкой молекулярной массой и не был включен в количественный анализ групп XTEN. Выход тримерного конъюгата XTEN при оптимизированном соотношении белок/линкер составил 57%. В основном схожие времена удержания для тримерного конъюгата 3xXTEN_288 и линейной молекулы XTEN_864 подтверждают более раннее наблюдение, что кажущаяся молекулярная масса и гидродинамический радиус белка XTEN не зависят от его геометрической конфигурации.

[00694] Пример 67: Избирательная цитотоксичность 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN для KB-клеток

[00695] Оценивали способность избирательного нацеливания и уничтожения клеток, содержащих фолатные рецепторы. Исследуемые образцы свободного MMAE, ненацеленного конъюгата 3xMMAE-XTEN (XTEN, соединенный с токсином) и нацеленного на фолатный рецептор конъюгата 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN оценивали в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа, используя позитивную к фолатным рецепторам клеточную линию KB. Так как культуральная среда характеризуется высоким содержанием фолиевой кислоты, KB-клетки выращивали в не содержащей фолиевой кислоты среде, содержащей 10% инактивированную теплом фетальную телячью сыворотку при 37°C, 5% CO_2 на протяжении по меньшей мере 7 дней до начала эксперимента по жизнеспособности клеток. Также эту среду использовали для проведения эксперимента. Вкратце, KB-клетки высевали в количестве 10000 клеток на лунку на 96-луночный микротитровальный планшет для анализа. KB-клеткам давали возможность прикрепиться к планшету путем инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO2. Затем использованную среду удаляли, и в лунки, содержащие конкурентное фолиевой кислоте вещество, добавляли среду для количественного определения, содержащую фолиевую кислоту, в то время как в лунки, не содержащие конкурентное фолиевой кислоте вещество, добавляли только среду для количественного определения. Планшет инкубировали на протяжении 30 мин при 37°C, 5% CO2 перед тем как удалить среду для количественного определения, и планшет отмывали средой для количественного определения. Свободный MMAE, 3xMMAE-XTEN и 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN в присутствии или отсутствие конкурентного фолиевой кислоте вещества добавляли затем в соответствующих диапазонах дозировок. Затем планшет дополнительно инкубировали на протяжении 2-4 ч при 37°C, 5% CO2. Затем среду удаляли, планшет отмывали и вносили свежую среду, а планшет инкубировали на протяжении дополнительных 48-72 ч. После истечения соответствующего

времени инкубации, в каждую лунку добавляли реагент CellTiter-Glo и считывали планшет на люминометре. Для каждого исследуемого объекта определяли IC50, используя аппроксимацию логистической кривой с 4 параметрами при помощи GraphPad Prism.

[00696] Результаты: Как показано на ФИГ. 116, свободное лекарственное вещество MMAE демонстрирует высокоэффективный киллинг KB-клеток и характеризуется IC50 в 0,8 нМ, в то время как 3 копии MMAE, конъюгированного с ненацеленным XTEN, приводят по меньшей мере к 3 log снижению клеточного киллинга (IC50 >1000 нМ). Важным является то, что дополнительные 3 копии нацеленных на фолат доменов конъюгата 3xMMAE-XTEN сохранили свойство клеточного киллинга и характеризуется IC50 в 4,2 нМ; а также имеют уровень активности, близкий наблюдаемому для свободного MMAE. Также важно то, что внесение фолиевой кислоты в качестве конкурента нацеленного конъюгата снизило наблюдаемую активность клеточного киллинга у 3xFA(γ),3xMMAE-XTEN в отношении клеточной линии KB. Данное снижение эффективного клеточного киллинга лекарственного конъюгата фолат-XTEN (от 4,2 нМ до >1000 нМ) подтверждает вывод о том, что зарегистрированная клеточная токсичность в условиях эксперимента стимулировалась применением фолата в качестве механизма нацеливания лекарственного конъюгата на клеточную линию KB.

[00697] Пример 68: In vitro клеточно-основанный скрининг конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности

[00698] Оценивали способность избирательного нацеливания и киллинга клеток, содержащих фолатные рецепторы, применяя нацеленные конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество, при помощи in vitro-основанного скрининга и анализа избирательности.

[00699] Каждый конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество, соответствующая ему ненацеленная молекула XTEN-лекарственное вещество и соответствующее свободное контрольное лекарственное вещество исследуют в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к фолатным рецепторам клеточных линий. Выбор клеточных линий основан на соответствии предложенным клиническим применениям и включает KB, IGROV, SK-OV-3, HeLa, LoVo, SW620, Madison 109, A549, A375, LS-174T, HT-29, 4T1, SK-BR-3. Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолиевой кислоты, клетки выращивают, а анализ проводят в среде, не содержащей фолиевой кислоты, но содержащей 5-10% инактивированной теплом фетальной телячьей сыворотки (ФТС) при 37°C, 5% CO_2. Инактивированная теплом ФТС содержит эндогенный уровень фолиевой кислоты, достаточный для выживания и пролиферации экспрессирующих фолатные рецепторы клеток. Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и времена инкубации, устанавливают, используя бесфолатную среду, содержащую 5-

10% инактивированную теплом ФТС, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Затем конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество исследуют следующим образом: клетки собирают в лог-фазе, пересчитывают и высевают с заданной клеточной плотностью в 96-луночные микротитровальные аналитические планшеты. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO_2. Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносят в растворах в подходящих диапазонах дозировок, в двух параллельных исследованиях, а планшеты инкубируют на протяжении 2-5 дополнительных дней. В альтернативном варианте в клетки на протяжении 2-6 ч импульсно вносят конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли, отмывают, добавляют свежую среду, и инкубируют на протяжении дополнительных 48-72 ч. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляют реагент CellTiter-Glo, смешивают на протяжении 2 минут на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугируют при 90g и инкубируют при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 минут, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывают при помощи люминометра и рассчитывают величины IC_{50} (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC_{50} даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям.

[00700] Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество демонстрируют высокоселективную эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к фолатным рецепторам клеток, но не в отношении негативных к фолатным рецепторам клеток. В отличие от этого, для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в высокой цитотоксичности к позитивным и негативным к фолатным рецепторам клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец XTEN-лекарственное вещество будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с фолатными рецепторами путем добавления в анализ свободной конкурентоспособной фолиевой кислоты, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

[00701] Пример 69: In vitro клеточно-основанный скрининг конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество на предмет активности и специфичности

[00702] Оценивали способность избирательного нацеливания и киллинга клеток, содержащих рецепторы LHRH, применяя нацеленные конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество, при помощи in vitro-основанного скрининга и анализа избирательности. Каждый конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество, соответствующая ему ненацеленная молекула XTEN-лекарственное вещество и соответствующее свободное контрольное лекарственное вещество исследуют в ходе CellTiter-Glo антипролиферативного анализа для набора позитивных и негативных к рецепторам LHRH клеточных линий. Выбор клеточных линий основан на соответствии предложенным клиническим применениям и включает MCF-7, MDA-MB-231, HCC1806, HCC1937, OV-1063, EFO-21, EFO-27, NIH:OVCAR-3, BG-1, HEC-1A, HEC-1B, Ishikawa, KLE, AN-3-CA, MiaPaCa, Panc-1, rat Dunning R-3327-H, PC-82, MDA-PCa-2b, C4-2 (производное LNCaP), A549, A2780, UCI-107, SK-OV-3, SW 626, MFE-296. Подходящие условия для исследования, включая оптимальную плотность клеток и времена инкубации, устанавливают, используя в качестве контроля соответствующее свободное лекарственное вещество. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество исследуют следующим образом: клетки собирают в лог-фазе, пересчитывают и высевают с заданной клеточной плотностью в каждую лунку в 96-луночный микротитровальный аналитический планшет. Для адгезивных клеток существует возможность присоединиться к планшету при инкубации на протяжении ночи при 37°C, 5% CO_2. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество и соответствующие контроли вносят в растворах в подходящих диапазонах дозировок, в двух параллельных исследованиях, а планшет инкубируют на протяжении 2-5 дополнительных дней в зависимости от используемых клеточных линий. После истечения соответствующего времени инкубации, в каждую лунку добавляют реагент CellTiter-Glo, смешивают на протяжении 2 минут на орбитальной качалке. Затем планшет центрифугируют при 90 x g и инкубируют при комнатной температуре на протяжении дополнительных 10 минут, чтобы стабилизировать сигнал люминесценции. Сигналы люминесценции затем считывают при помощи люминометра и рассчитывают величины IC50 (половина от максимальной ингибиторной концентрации) при помощи GraphPad Prism или схожего программного обеспечения. Количественное сравнение величин IC50 даст возможность классифицировать конструкции по их активности по подавлению клеточного роста и избирательности по отношению к позитивным и негативным к рецепторам LHRH клеточным линиям.

[00703] Ожидается, что результаты подтвердят то, что конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество демонстрируют высокоселективную и эффективную цитотоксичность в отношении позитивных к рецепторам LHRH клеток, но не в отношении негативных к рецепторам LHRH клеток. В отличие от этого, для свободного лекарственного вещества не ожидается разницы в высокой цитотоксичности к позитивным и негативным к рецепторам

LHRH клеточным линиям. Ожидается, что контрольный образец XTEN-лекарственное вещество без нацеленного на LHRH компонента будет обладать низкой цитотоксической активностью. Конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество, обладающие подходящей активностью и избирательностью в отношении клеточных линий по сравнению с контрольными образцами, будут дополнительно исследовать на предмет ассоциации с рецепторами LHRH путем добавления в анализ свободного конкурентоспособного пептида LHRH, что приведет к ослаблению цитотоксичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество.

[00704] Пример 69: *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00705] При определении стабильности соединения с лекарственным веществом конъюгаты LHRH-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и грызуна при 37°C до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°C до проведения анализа. Стабильность конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Количество свободного лекарственного вещества оценивают при помощи RP-HPLC и/или LC-MS/MS, а количество интактного конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество определяют при помощи ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или LHRH/лекарственное вещество. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения.

Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°С. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированной версии детекторного антитела) либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированной версии детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы. *t*1/2 для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

[00706] Пример 70: *In vitro* сывороточная стабильность конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00707] При определении стабильности соединения с лекарственным веществом конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество независимо инкубируют в нормальной плазме крови человека, яванского макака и грызуна при 37°С до 2 недель, забирая через периодические интервалы аликвоты и сохраняя их при -80°С до проведения анализа. Стабильность конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить как по количеству высвобождаемого свободного лекарственного вещества, так и по целостности конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество в течение времени. Наличие свободного лекарственного вещества оценивают при помощи HPLC, LC-MS/MS и/или антипролиферативного анализа, описанного в соответствующем разделе выше. Количество интактного конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество определяют, используя ELISA для XTEN/лекарственное вещество и/или фолат/лекарственное вещество. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные

количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. При применении антипролиферативного анализа в качестве метода детектирования наличия де-конъюгированного лекарственного вещества, можно использовать позитивные или негативные к фолатным рецепторам клетки. Ингибитор фолиевой кислоты добавляют при проведении оценки позитивных к рецепторам клеточных линий, а для негативных к рецепторам клеточных линий он не нужен. Для любых типов рецепторных клеток увеличение концентрации де-конъюгированного лекарственного вещества приводит к увеличению клеточной токсичности. Для количественного ELISA оптимальные концентрации антител для конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество в ELISA определяют, используя метод перекрестного серийного разведения. Подходящими захватывающими антителами, распознающими один из компонентов конъюгата, покрывают 96-луночный микротитровальный планшет путем инкубации на протяжении ночи при 4°C. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки образцы, для которых исследуется сывороточная стабильность и которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить оптимальный захват конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество иммобилизованным антителом. После отмывки добавляют детекторное антитело, распознающее другой компонент конъюгата, и обеспечивают возможность его связывания с конъюгатом, захваченным на планшете. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированной версии детекторного антитела) либо подходящую вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированной версии детекторного антитела). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации интактного конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество в соответствующем типе плазмы. *t*1/2 для уменьшения количества конъюгата в сыворотке крови

человека, макака и мыши определяют, применяя линейнорегрессионный анализ зависимости логарифма концентрации от времени.

[00708] Пример 71: *In Vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгата LHRH-XTEN-Cy5.5

[00709] Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 LHRH-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей эффективности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к рецепторам LHRH опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Вкратце, самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к рецепторам LHRH опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой LHRH-XTEN-Cy5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Cy5.5 контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 часа после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Cy5.5 выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения по меньшей мере нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области Cy5.5. Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, а красный определяет самую высокую интенсивность.

[00710] Пример 72: *In Vivo* и *ex vivo* визуализация конъюгатов фолат-XTEN-Cy5.5

[00711] Молекулу флуоресцентно меченого Cy5.5 фолат-XTEN применяют в качестве имитатора для исследования нацеленности и биораспределяющей эффективности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество. Эксперименты проводят на бестимусных мышах с выращенными подкожно ксенотрансплантатами позитивных к фолатным рецепторам опухолевых клеток, используя *in vivo*, а затем *ex vivo* флуоресцентную визуализацию при помощи системы оптической визуализации IVIS 50 (Caliper Life Sciences, Хопкинтон, Массачусетс). Так как культуральные среды характеризуются высоким содержанием фолата,

позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без антибиотиков. Аналогично, нормальная пища грызунов содержит высокую концентрацию фолиевой кислоты; бестимусных мышей в данном исследовании держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении визуализационного анализа для того, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке крови. Самкам бестимусных мышей, несущим позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки, делают единичные внутривенные инъекции с высокой или низкой дозой фолат-XTEN-Cy5.5 и соответствующими дозами ненацеленного меченого Cy5.5 контрольного XTEN. При помощи системы оптической визуализации IVIS 50 для живых анестезированных животных проводят сканирование всего организма перед инъекцией, а затем приблизительно через 8, 24, 48 и 72 часа после инъекции. После измерения распределения флуоресценции по всему организму животного в последний временной отрезок в 72 ч опухоль и здоровые органы, включая печень, легкие, сердце, селезенку и почки, вырезают и регистрируют и анализируют их флуоресценцию при помощи системы визуализации. Фильтры возбуждения (615-665 нм) и эмиссии (695-770 нм) Cy5.5 выбирают как соответствующие длинам волн флуоресцентных веществ. Используют низкий и средний биннинг интегральной схемы на ПЗС и время экспозиции, оптимизированное для получения по меньшей мере нескольких тысяч отсчетов от сигналов, наблюдаемых на изображении для каждой мыши, и недопущения перегрузки интегральной схемы на ПЗС. Для нормировки изображений перед количественным определением получают фоновое изображение флуоресценции, используя фоновые фильтры возбуждения и эмиссии для спектральной области Cy5.5. Интенсивность флуоресценции выражают посредством разных цветов, при этом голубой цвет соответствует самой низкой интенсивности, красный определяет самую высокую интенсивность.

[00712] Пример 73: Анализ фармакокинетики конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00713] *In vivo* фармакокинетику конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов. Фармакокинетику оценивают для разных видов, при этом предпочтительными являются мыши, крысы, яванские макаки и собаки, так как именно их обычно используют для прогнозирования фармакокинетики человека. Составы конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество готовят в водных буферах, совместимых с in vivo введением (например: фосфатно-солевой буфер, Трис-солевой буфер или Гэпэс-солевой буфер). Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно – внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 часов и

перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS. Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество, например, комбинации XTEN/LHRH, XTEN/лекарственное вещество, LHRH/лекарственное вещество и/или XTEN/XTEN. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество, покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки собранные в различные временные точки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу) либо вторичную антитело-пероксидазу хрена (комплементарную небиотинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для LHRH-XTEN-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и

обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление XTEN к LHRH и лекарственному веществу, соответствующее приготовлению конъюгата, сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства по сравнению с нацеленными пептидами и лекарственными веществами, не связанными с XTEN. Это, в свою очередь, приведет к менее частым и более удобным схемам дозирования для таких конъюгатов.

[00714] Пример 74: Анализ фармакокинетики конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00715] *In vivo* фармакокинетику конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество оценивают, используя стандартные методы для белковых составов. Фармакокинетику оценивают для разных видов, при этом предпочтительными являются мыши, крысы, яванские макаки и собаки, так как именно их обычно используют для прогнозирования фармакокинетики человека. Так как в нормальном питании содержатся высокие концентрации фолиевой кислоты (приблиз. 6 мг/кг мышиного корма), животных, принимающих участие в фармакокинетических исследованиях фолатных конъюгатов, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Составы конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество обычно готовят в водных буферах, совместимых с in vivo введением (например: фосфатно-солевой буфер, Трис-солевой буфер или Гэпэс-солевой буфер). Составы вводят в соответствующих дозах и разными способами: наиболее предпочтительно – внутривенным или подкожным способами. Образцы крови берут в соответствующие временные точки в диапазоне от 0,08 до 504 часов и перерабатывают в плазму. Образцы плазмы анализируют в отношении концентрации конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество одним из множества способов, включая ELISA, HPLC и/или LC-MS/MS. Анализ ELISA проводят, применяя сэндвич-формат для ELISA, в котором распознаются 2 компонента конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество, например, комбинации XTEN/фолат, XTEN/лекарственное вещество, фолат/лекарственное вещество и/или XTEN/XTEN. Как правило, антителами, распознающими один из компонентов конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество, покрывают лунки 96-луночного микротитровального планшета. Лунки блокируют, отмывают и добавляют в лунки собранные в различные временные точки образцы плазмы, которые имеют разную степень разведения, чтобы обеспечить захват конъюгата иммобилизованным антителом. Затем лунки интенсивно отмывают, а связанный белок детектируют, применяя как биотинилированное антитело, так и подходящее вторичное антитело ко второму компоненту конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество. Затем лунки снова отмывают и добавляют либо стрептавидин-пероксидазу хрена (комплементарную биотинилированному детекторному антителу) либо вторичную антитело-пероксидазу хрена

(комплементарную небиотинилированному детекторному антителу). После истечения необходимого времени инкубации и конечного этапа отмывки добавляют субстрат из тетраметилбензидина (ТМБ) и считывают планшет при 450 нм. Затем для каждой временной точки рассчитывают концентрации конъюгата путем сравнения колориметрического ответа с калибровочной кривой, построенной для фолат-XTEN-лекарственное вещество. Затем, используя программный пакет WinNonLin, рассчитывают фармакокинетические параметры. Для RP-HPLC анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества детектируют по УФ-поглощению на длинах волн, соответствующих конкретному лекарственному веществу. Например, доксорубицин поглощает на 480 нм. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Для LC-MS/MS анализа образцы плазмы обрабатывают органическими растворителями, такими как ацетонитрил или ацетон для преципитации белков. Растворимые фракции выпаривают в вакууме, перерастворяют в загрузочных растворах и анализируют при помощи RP-HPLC. Исследуемые вещества линейно детектируют и количественно оценивают при помощи тройной квадрупольной тандемной масс-спектроскопии. Пары родительский ион-дочерний ион определяют экспериментально для каждого лекарственного вещества. Калибровочные стандарты готовят, добавляя известные количества свободного лекарственного вещества в соответствующий тип плазмы, и обрабатывают в параллели с экспериментальными образцами. Ожидается, что результаты подтвердят то, что добавление XTEN к фолату и лекарственному веществу, соответствующее приготовлению конъюгата, сильно увеличит конечный период полувыведения и усилит фармакокинетические свойства по сравнению с нацеленными пептидами и лекарственными веществами, не связанными с XTEN. Это, в свою очередь, приведет к менее частым и более удобным схемам дозирования для таких конъюгатов.

[00716] Пример 75: In vivo анализ эффективности и токсичности конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00717] Конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество предназначен для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к рецепторам LHRH опухолевым клеткам. Поэтому *in vivo* фармакологическую активность конструкций LHRH-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие рецепторы LHRH, трансплантированные бестимусным мышам. Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений LHRH-

XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Вкратце, эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирований определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на LHRH веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (смотрите раздел выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съеживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение отслеживают ежедневно. Наибольшая доза соединения LHRH-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД. Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом LHRH-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД; другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В Примере 69 описаны примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Таким образом, подходящее количество позитивных к рецепторам LHRH клеток из соответствующей человеческой опухолевой линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как 0,5 x L x W^2, где L = значение для большей оси в миллиметрах, а W = значение для оси, перпендикулярной L, в миллиметрах. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, свободное контрольное лекарственное вещество и конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и проводят клинические исследования патологии и гистопатологии основных органов. Применение нацеленных цитотоксинов является одной из наиболее перспективных стратегий избирательного уничтожения опухолевых клеток. Предполагается, что результаты подтвердят то, что конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество будет иметь хороший терапевтический индекс, что демонстрирует высокая эффективность, и низкую общую токсичность. В противоположность этому, ожидается, что

ненацеленное на LHRH свободное лекарственное вещество при одинаковых дозах будет не только менее эффективно, но и намного более токсично. Ожидается, что контрольный растворитель приведет к неконтролируемому росту опухоли и будет высокотоксичным.

[00718] Пример 76: In vivo анализ эффективности и токсичности конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00719] Конъюгаты фолат-XTEN-лекарственное вещество предназначены для нацеленной доставки высокоэффективного токсина к позитивным к фолатным рецепторам опухолевым клеткам. *In vivo* фармакологическую активность конструкций фолат-XTEN-лекарственное вещество можно оценить, используя человеческие опухолевые клетки, экспрессирующие фолатные рецепторы, трансплантированные бестимусным мышам. Перед началом исследования эффективности для бестимусных мышей проводят начальную оценку, чтобы установить максимальную переносимую дозу (МПД) кандидатных соединений фолат-XTEN-лекарственное вещество. МПД, наибольшая доза, которая переносится животным в продолжение исследования, затем используется для расчета диапазона дозировок для исследования эффективности и токсичности на стандартной ксенографтной модели. Так как в нормальном корме для грызунов содержится высокая концентрация фолиевой кислоты (6 мг/кг корма), мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до начала исследования и на протяжении исследования. Эксперимент по МПД проводят на 5 мышах на группу, оценивая внутривенное введение конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество при различных уровнях дозирования, интервалах и длительности. Стартовую МПД дозу и количество необходимых дозирований определяют на основании научной литературы, знаний о нацеленном на фолат веществе, природе конъюгированного лекарственного вещества, токсикологических свойствах близкородственных соединений и данных по первичным фармакокинетическим исследованиям (смотрите раздел выше). Стандартные параметры МПД, такие как снижение массы тела, употребления пищи и воды и признаки пилоэрекции, съеживание, характер поведения, характер дыхания, дрожь, конвульсии, слабость и самоповреждение тщательно отслеживают ежедневно. Наибольшая доза соединения фолат-XTEN-лекарственное вещество, которая не приводит к неприемлемой токсичности, является МПД. Исследование ксенографтной опухоли включает от 3 до 4 уровней дозирования конъюгатом фолат-XTEN-лекарственное вещество и зависит от результатов исследования МПД, другие параметры зависят от выбранной опухолевой клеточной линии. В Примере 69 описаны примеры опухолевых линий, которые можно использовать в ксенографтном исследовании. Для снижения содержания фолата позитивные к фолатным рецепторам опухолевые клетки для трансплантации мышам выращивают в бесфолатной культуральной клеточной среде, содержащей 5-10% инактивированной теплом ФТС, без

антибиотиков. Аналогично, чтобы снизить концентрацию фолата в сыворотке, мышей, принимающих участие в этих исследованиях, держат на бесфолатной диете за 2 недели до имплантации опухоли и на протяжении исследования. Таким образом, подходящее количество позитивных к фолатным рецепторам клеток из соответствующей линии вводят подкожно и обеспечивают возможность образования опухолей, размер которых измеряют при помощи калиперов, а объем рассчитывают как 0,5 x L x W^2, где L = значение для большей оси в миллиметрах, а W = значение для оси, перпендикулярной L, в миллиметрах. После распределения мышей, имеющих опухоли, объем которых находится в необходимом диапазоне размеров, по группам по 8-10 животных, контрольный растворитель, контрольное лекарственное вещество и конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество вводят внутривенно в выбранных дозах и интервалах. Прекращение или замедление роста опухоли определяют путем измерения размера и объема опухоли при помощи калиперов в выбранные временные точки. Массу тела и употребление пищи оценивают каждые 1-2 дня для того, чтобы определить избыточную токсичность. Выживание животных отслеживают ежедневно. В конце исследования всех животных умерщвляют и проводят клинические исследования патологии и гистопатологии основных органов. Применение нацеленных цитотоксинов является одной из наиболее перспективных стратегий избирательного уничтожения опухолевых клеток. Предполагается, нацеленный химиотерапевтический конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество будет более эффективным и менее токсичным, чем одно свободное цитотоксичное лекарственное вещество, для позитивных к фолатным рецепторам опухолей.

[00720] Пример 76: Клинические применения конъюгатов LHRH-XTEN-лекарственное вещество

[00721] Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. Брентуксимаб ведотин (Адцентрис), одобренный для применения при лимфоме Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфоме, является ведущим примером эффективной токсин-нацеленной терапии. LHRH представляет собой пептид, который функционирует в репродуктивных органах. Так как его рецепторы сконцентрированы преимущественно на определенных опухолях и не экспрессируются в большинстве нормальных тканей, рецептор LHRH является идеальной мишенью для избирательного разрушения злокачественных опухолей. Действительно, ~52% образцов рака молочной железы, ~80% образцов рака яичников и эндометрия и ~85% образцов рака простаты являются мишенями вследствие наличия рецепторов LHRH. Следует отметить, что LHRH-зависимая терапия была бы в особенности целесообразной для тройных негативных опухолей молочной железы, которые не характеризуются сверхэкспрессией рецепторов эстрогена или прогестерона

или HER2 и, следовательно, не подходят для лечения многими доступными нацеленными лекарственными веществами. У пациентов с поздними стадиями рака эндометрия, яичников или простаты часто наблюдается исключительно неблагоприятный сход, так как данные опухоли могут иметь тенденцию к повторному появлению и/или быть устойчивыми к современным способам лечения. В подтверждение этого клинические исследования с AEZS-108, нацеленным доксорубициновым аналогом LHRH, показали, что каждый из указанных типов рака восприимчив в LHRH-основанной терапии. Слияние XTEN, несущего ≥1 копии LHRH, с XTEN, несущим ≥ 3 молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенные терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях ниже МПД, уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

[00722] Клиническую оценку композиции LHRH-XTEN-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от распространенных раков молочной железы, эндометрия, яичников и простаты или мочевого пузыря. Клинические исследования разработаны так, чтобы подтвердить эффективность и преимущества конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество для человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в Фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетике, чтобы определить максимальную переносимую дозу (МПД) и охарактеризовать ограничивающие дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах с метастатическими или неоперабельными раками и пациентах, для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся. Для увеличения эффективности лечения критерием отбора является позитивный статус в отношении рецепторов LHRH; определяемый при помощи иммуногистохимии образцов первичных опухолей или метастазов и/или при помощи LHRH-нацеленного молекулярного визуализирующего вещества. Схемой исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров. Это позволит определить МПД, а также пороговую и максимальную концентрации для дозировок и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в Фазе II и Фазе III. Также это определит потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях.

[00723] Клинические исследования на людях в Фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (стадия 3 или 4) или повторным раком

молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря. В данном исследовании оценивают эффективность и безопасность конъюгата LHRH-XTEN-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно вводят клинический кандидатный конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество в дозировке и согласно лечебной схеме, предопределенными в Фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость.

[00724] Исследования эффективности и безопасности в фазе III построены таким образом, чтобы повторить или модифицировать исследования фазы II для пациентов с позитивным к рецепторам LHRH распространенным (устойчивым, повторным) раком молочной железы, эндометрия, яичников и простаты либо мочевого пузыря в зависимости от клинических наблюдений во время фазы II. Дополнительно могут быть внесены изменения, состоящие в оптимизации критериев отбора для пациентов, дополнительной стратификации пациентов (например, в зависимости от уровня экспрессии рецепторов LHRH), изменении дозировки, схемы лечения, статуса стандартных химиотерапевтических веществ и т.д. Первичной конечной точкой является отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST, среди пациентов, позитивных к рецепторам LHRH. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Также учитывают случаи побочных эффектов, серьезных побочных эффектов и смертей.

[00725] Предполагается, что кандидатный конъюгат LHRH-XTEN-лекарственное вещество продемонстрирует противораковую активность без кардиотоксичности даже в случае групп пациентов, прошедших предварительное интенсивное лечение.

[00726] Пример 76: Клинические применения конъюгатов фолат-XTEN-лекарственное вещество

[00727] Нацеленная химиотерапия является современным подходом, целью которого является увеличение эффективности системной химиотерапии и снижение побочных эффектов. Брентуксимаб ведотин (Адцентрис), одобренный для применения при лимфоме Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфоме, является ведущим примером эффективной токсин-нацеленной терапии. Фолат, также известный как фолиевая кислота, витамин B_9, является жизненно важным питательным веществом, необходимым для всех

живых клеток для нуклеотидного биосинтеза, и функционирует как кофактор в некоторых биологических процессах. Особенно важным он является в содействии быстрому клеточному делению и росту. Таким образом, фолатный рецептор является точкой фокусировки для разработки терапии для лечения быстро развивающихся злокачественных опухолей; в частности, рака яичников и немелкоклеточной карциномы легких. Для некоторых опухолей яичников существует большая вероятность повторения после первичного успешного хирургического вмешательства или химиотерапии препаратами платины, при этом повторная опухоль может быть устойчивой к доступным видам терапии. Хотя экспрессия фолатных рецепторов в нормальных яичниках является весьма незначительной, при ~90% эпителиальных раков яичников наблюдается сверхэкспрессия фолатных рецепторов, то же самое наблюдается для многих аденокарцином легких, тем самым открывая возможность для нацеленной терапии. В подтверждение этого, клинические исследования EC-145, нацеленного алкалоида барвинка, являющегося аналогом фолата, показали, что устойчивый к препаратам платины рак яичников и немелкоклеточная карцинома легких восприимчивы к фолат-основанной терапии. Слияние XTEN, несущего ≥1 копии фолата, с XTEN, несущим ≥ 3 молекул лекарственного вещества, для создания нацеленного конъюгата пептид-лекарственное вещество, как ожидается, должно иметь значительно улучшенные терапевтический индекс и период полувыведения, что даст возможность дозирования на уровнях значительно ниже максимальной переносимой дозы (МПД), уменьшения частоты дозирования и стоимости (уменьшенное количество лекарственного вещества, приходящегося на дозу).

[00728] Клиническую оценку композиции фолат-XTEN-лекарственное вещество проводят для пациентов, страдающих от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей, или для пациентов, страдающих от рака яичников, устойчивого к лечению препаратами платины, или немелкоклеточной карциномы легких, которым не помогло применение другой химиотерапии. Клинические исследования, разработаны так, чтобы можно было подтвердить эффективность и преимущества конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество для человека. Такие исследования на пациентах включают три фазы. Во-первых, в Фазе I проводят исследования по безопасности и фармакокинетике, чтобы определить МПД и охарактеризовать ограничивающие дозу токсичность, фармакокинетику и предварительную фармакодинамику для человека. Эти первичные исследования можно проводить на пациентах, которые имеют повторные или не поддающиеся лечению распространенные опухоли, и для которых не применимы стандартные лечебные или облегчающие меры, либо они уже не являются эффективными или не переносятся. Для увеличения эффективности лечения критерием отбора является позитивный статус в отношении фолатных рецепторов, определяемый при помощи иммуногистохимии образцов первичных опухолей или метастазов

и/или при помощи фолат-нацеленного молекулярного визуализирующего вещества. Схемой исследований в фазе I является применение единичных возрастающих доз конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество и определение биохимических, ФК и клинических параметров. Это позволит определить МПД, а также установить пороговую и максимальную концентрации для дозировок и для циркулирующего лекарственного вещества, которые составляют терапевтическое окно для применения в последующих исследованиях в Фазе II и Фазе III. Также это определит потенциальные токсичности и побочные эффекты, с которыми можно столкнуться в будущих исследованиях.

[00729] Клинические исследования на людях в Фазе II проводят независимо на пациентах с позитивным к фолатным рецепторам раком яичников, устойчивым к лечению препаратами платины; пациентах с немелкоклеточной карциномой легких, которым не помогли многочисленные химиотерапии; и пациентах, страдающих от повторных или не поддающихся лечению распространенных опухолей. В данном исследовании оценивают эффективность и безопасность конъюгата фолат-XTEN-лекарственное вещество как одного, так и в комбинации с современной химиотерапией, применяемой при особых показаниях. Пациентам внутривенно вводят конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество в дозировке и согласно лечебной схеме, определенным в Фазе I, с или без стандартного химиотерапевтического вещества. Также включают контрольную группу, содержащую химиотерапевтическое вещество плюс плацебо. Первичной конечной точкой является скорость ответа согласно определению критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST). Вторичные конечные точки включают безопасность и переносимость, отсутствие прогрессирования со временем и общую выживаемость.

[00730] Исследования эффективности и безопасности в фазе III построены таким образом, чтобы повторить или модифицировать исследования фазы II для пациентов с позитивным к фолатным рецепторам раком яичников, устойчивым к лечению препаратами платины; пациентов с немелкоклеточной карциномой легких; и пациентов с повторными или не поддающимися лечению распространенными раками в зависимости от клинических наблюдений во время фазы II. Дополнительно могут быть внесены изменения, состоящие в оптимизации критериев отбора для пациентов, дополнительной стратификации пациентов (например, в зависимости от уровня экспрессии фолатных рецепторов), изменении дозировки, схемы лечения, статуса стандартных химиотерапевтических веществ и т.д. Первичной конечной точкой является отсутствие прогрессирования и выживание, оцененные согласно RECIST, среди пациентов, позитивных к фолатным рецепторам. Исследование будет статистически верным в отношении общей выживаемости в качестве вторичной конечной точки с предполагаемой численностью, составляющей более 400 пациентов. Также учитывают случаи побочных эффектов, серьезных побочных эффектов и смертей.

[00731] Предполагается, что кандидатный конъюгат фолат-XTEN-лекарственное вещество продемонстрирует противораковую активность без сильной токсичности даже в случае групп пациентов, прошедших предварительное интенсивное лечение.

Таблица 52: Полипептидные последовательности XTEN-расщепляемая последовательность-аффинный маркер

Конструкция	Аминокислотная последовательность
AC710	APTTAGAGRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPGRGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GRHHHHHHHH
AC698	ANTPVSGNLKVEFYNSNPSDTTNSINPQFKVTNTGSSAIDLSKLTLRYYYTVDGQKD QTFWADHAAIIGSNGSYNGITSNVKGTFVKMSSSTNNADTYLEISFTGGTLEPGAHV QIQGRFAKNDWSNYTQSNDYSFKSASQFVEWDQVTAYLNGVLVWGKEPGGSVVGS GSGSGRGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPTAEAAGKPGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGKATHHHHHHHH
AC815	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTAEAAGCGTA EAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE

Конструкция	Аминокислотная последовательность
	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASRSAHHHHHHHHH
AC816	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTAEAAGCGTA EAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAASASRSAH HHHHHHH
AC763	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTAEAAGCGTA EAAGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAASASRSAH HHHHHHH
AC767	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPSASRSAHHHHHHHHH
AC769	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTAEAAGCGTA EAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTAEAAGCGTAEAASTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGCGTAEAASPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEAAGCGTAEAASETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTTAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGTAEAA GCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAE AASASRSAHHHHHHHHH
AC771	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP TAEAAGCGTAEAAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTAEAAGC GTAEAASTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPATAEAAGCGTAEAASP

Конструкция	Аминокислотная последовательность
	TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATTAEAAGCGTAEAASETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTTAEAAGCGTAEAAAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGTAEAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTA EAAGCGTAEAASASRSAHHHHHHHH
AC817	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTESASRSAHHHHHHHH
AC818	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTESASRSAHHH HHHHH
AC780	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPSASRSAHHHHHHHH
AC785	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTEGTSTEPSEG SAPGTSESTAEAAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG TAEAAGCGTAEAATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAG CGTAEAASASRSAHHHHHHHH
AC765	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAASASRSAHH HHHHHH
AC766	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPTAEAAGCGTAEAAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESTAE AAGCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAASASRS AHHHHHHHH
AC768	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES

Конструкция	Аминокислотная последовательность
	GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESTAEAA GCGTAEAATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGTAEAAGCGTAEA ATEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPTAEAAGCGTAEAASASRSA HHHHHHHH
AC786	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTESASRSAHHHHHHHHH
AC792	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSTSSTAESPG PGSTSSTAESPGPGCTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP GSTSCSPSGEAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPETSPSGESCTAPG STSASRSAHHHHHHHH
AC793	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGCAGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTCSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTACSS PGSSSASRSAHHHHHHHH
AC798	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTESASKSAHHHHHHHH
AC809	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTACSEGSAPSASRSAHHHHHHHH
AC810	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS

Конструкция	Аминокислотная последовательность
	TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSCASASRSAHHHHHHHH
AC831	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSTSSTAESPG PGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPG STSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGST SSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTST PESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTP ESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSES PSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESG SASPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESST APGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTA PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSSASRSAHHH HHHHH
AC832	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGASPGTSSTGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASSASRSAHHHHHHHH
AC819	KKQEQEEKKAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPGSCAGSPTSTE EGTSESACPESGPGTSTEPSEGSCPGSPAGSPTSTEEGTCTEPSEGSAPGTSTEPCSGSA PGTSESATPESCPGSEPATSGSETPGSCPATSGSETPGSPAGSCTSTEEGTSESATPESC PGTESASRSAHHHHHHHH
AC820	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGCGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSCTPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSCGSAPSASRSAHHHHHHHH
AC821	KNPEQAEEQAEEQREETRPRPRPRPRPRPRPRPRPRPSASRSAGSPTGCGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSCTPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPC STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESCTPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSCTPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGCSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETCGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGCAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSCGSAPSASRSAHHHHHHHH

Заявка № 202190427

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

к ответу на уведомление экспертизы от 12.05.2021

1. Композиция, содержащая расширенный рекомбинантный полипептид, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид имеет от 1 до 10 остатков цистеина.

2. Композиция по п. 1, где остаток цистеина указанного расширенного рекомбинантного полипептида конъюгирован с кросс-линкером.

3. Композиция по п. 2, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид присоединен к нагрузочному веществу посредством указанного кросс-линкера.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид содержит N-концевой цистеин.

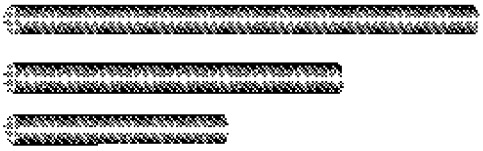
5. Композиция по любому из пп. 1-3, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид состоит из мотивов из от 9 до 14 аминокислотных остатков, где указанные мотивы состоят из 3, 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных их глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутаминовой кислоты (E) и пролина (P), и где последовательность любых двух последовательных аминокислотных остатков в каком-либо мотиве не повторяется более двух раз в мотиве последовательности.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид не имеет альфа-спиралей и бета-слоев, как определено посредством расчета по алгоритму Чоу-Фасмана.

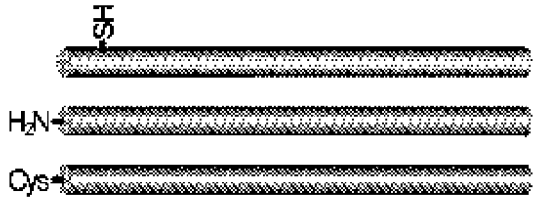
7. Композиция по п. 6, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид содержит аминокислотную последовательность, приблизительно на 95% идентичную последовательности, выбранной из групы последовательностей, изложенных в Таблице 27.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где указанный расширенный рекомбинантный полипептид непосредственно связан с одним аффинным маркером.

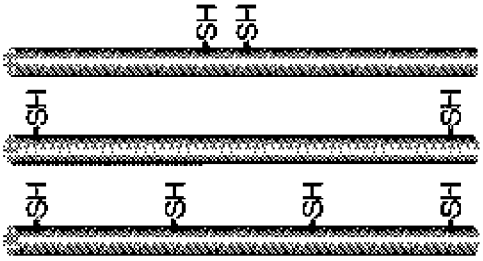
ФИГ. 1A



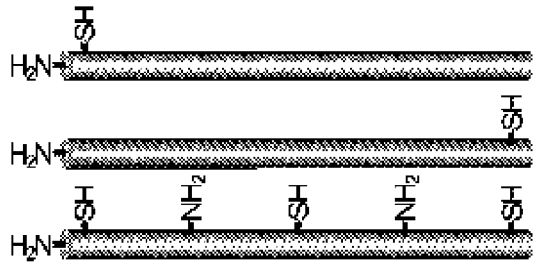
ФИГ. 1B



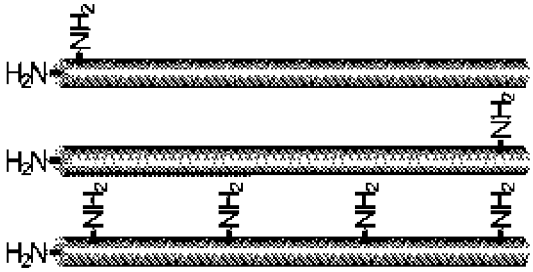
ФИГ. 1C



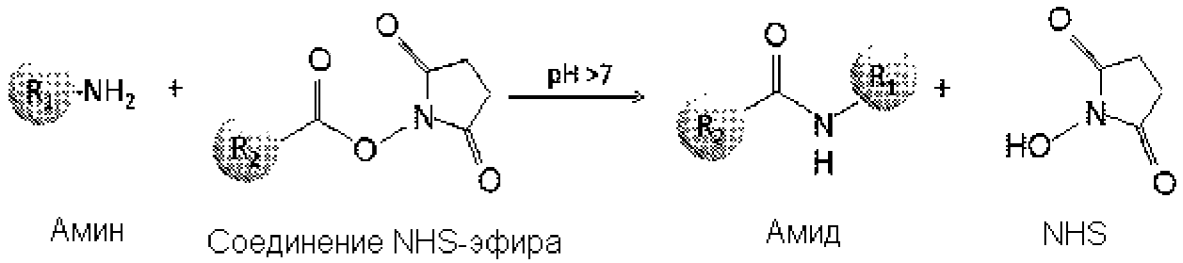
ФИГ. 1D



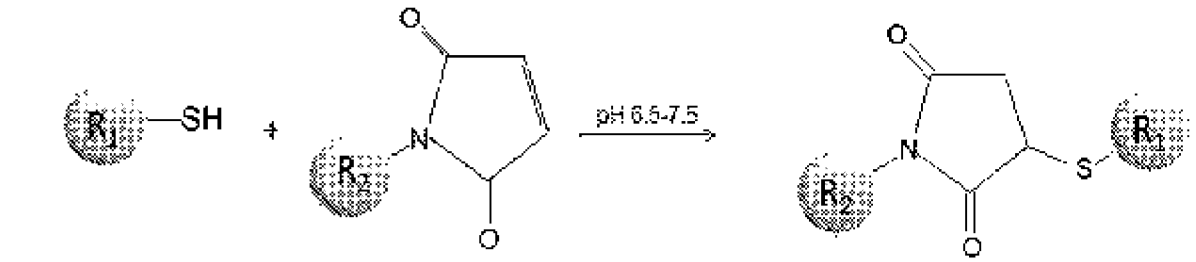
ФИГ. 1E



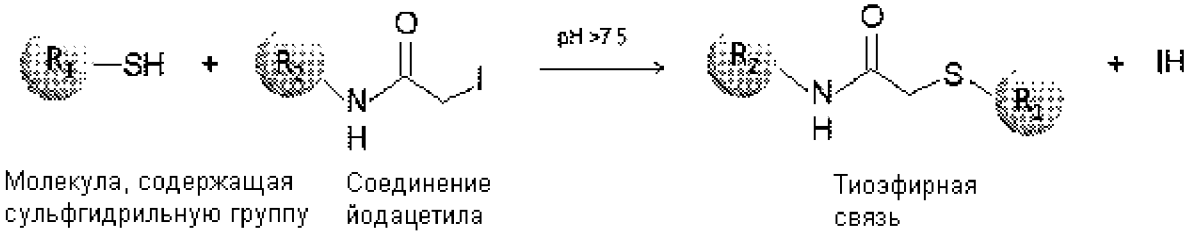
ФИГ. **1**



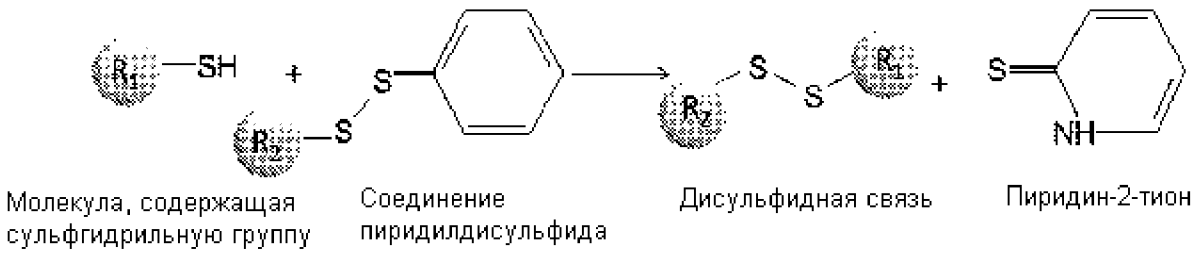
ФИГ. 2


R1—SH
+
O
N
R2
O
pH 6.5-7.5
O
N
S
R1
R2
O
Молекула, содержащая сульфгидрильную группу
Соединение малеинимида
Тиоэфирная связь

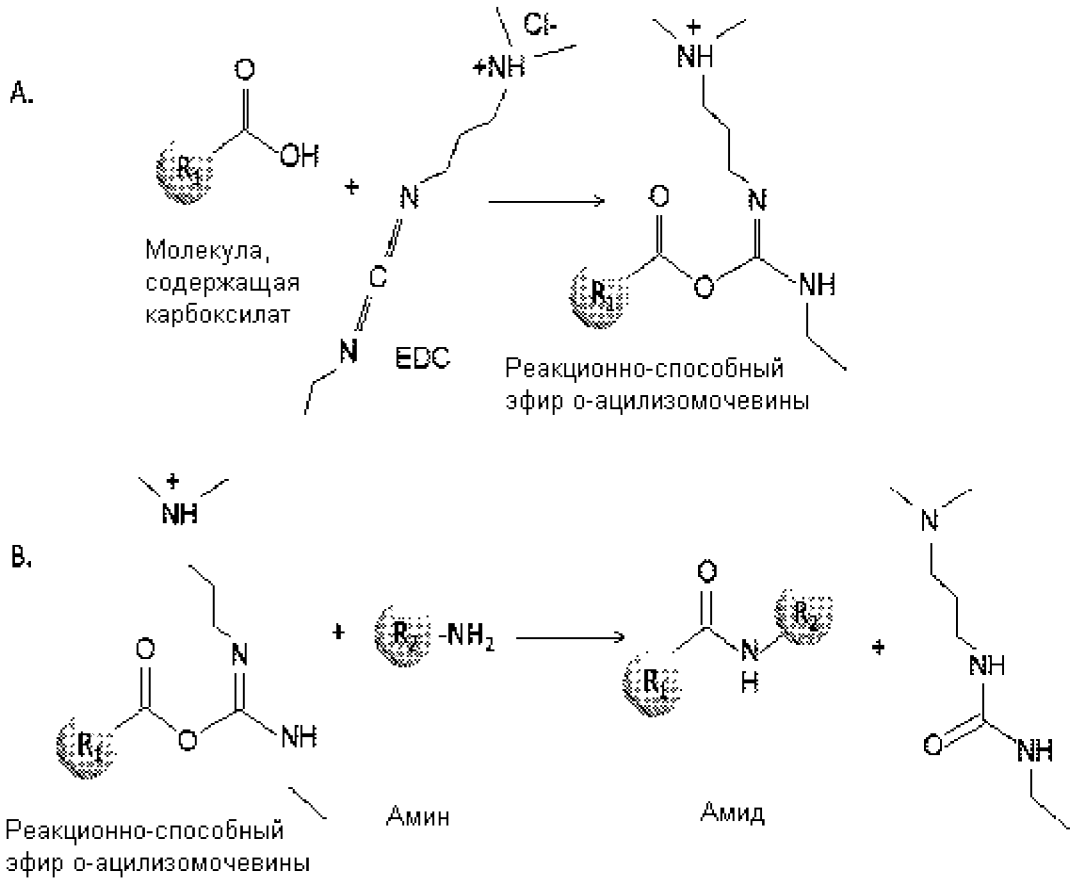
ФИГ. 3


R1—SH
+
R2
O
N
H
I
pH >7.5
R2
O
N
H
S
R1
+ IH
Молекула, содержащая сульфгидрильную группу
Соединение йодацетила
Тиоэфирная связь

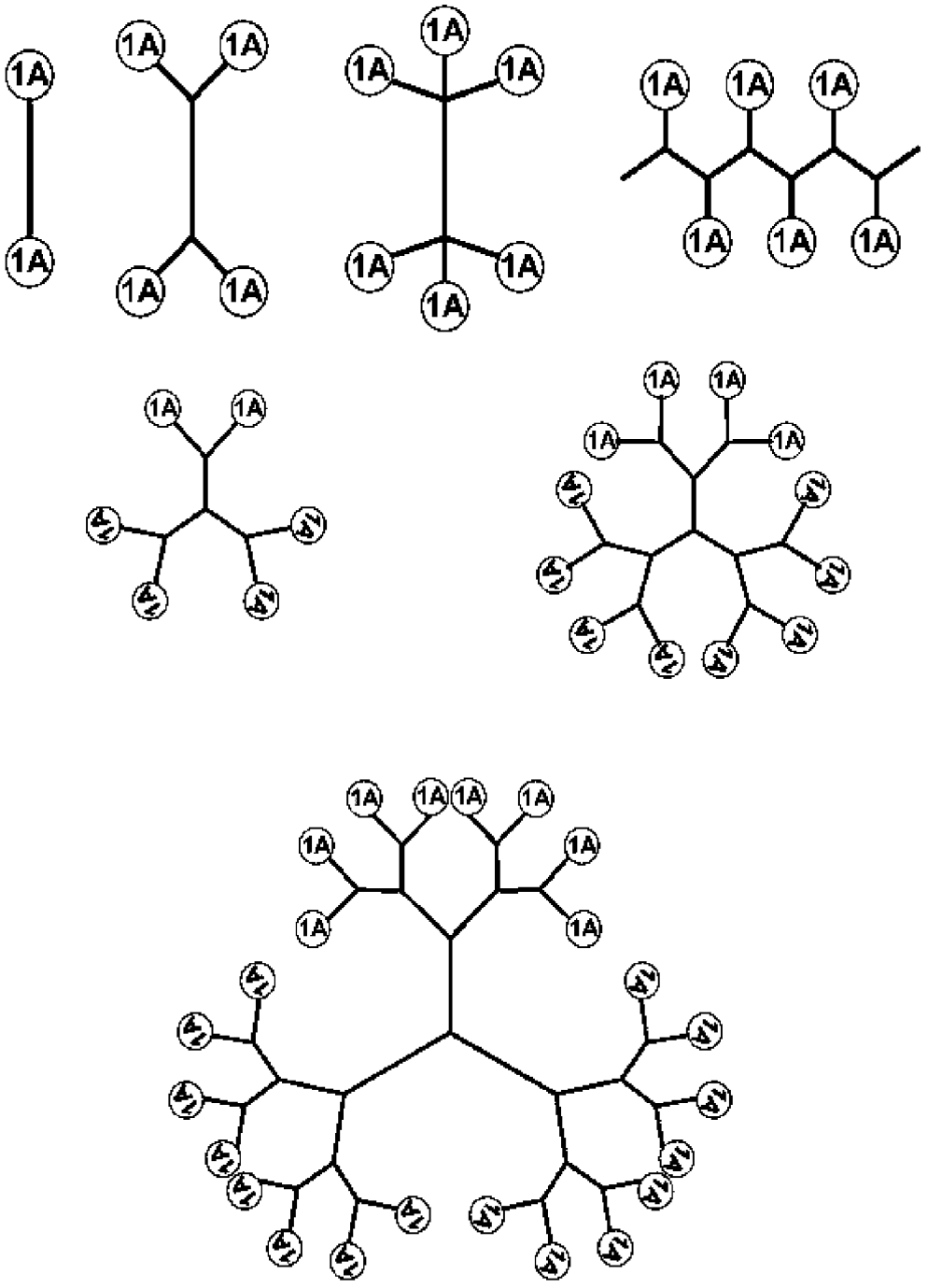
ФИГ. **4**


R1—SH
+
R2—S—S
Молекула, содержащая сульфгидрильную группу
Соединение пиридилдисульфида
R2—S—S—R1
Дисульфидная связь
+
S
NH
Пиридин-2-тион

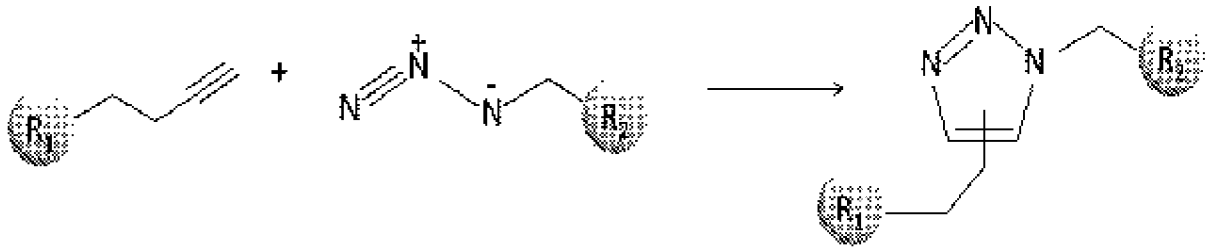
ФИГ. 5


A.
Cl-
+NH
NH
O
OH
N
C
N
EDC
O
N
NH
Молекула, содержащая карбоксилат
Реакционно-способный эфир о-ацилизомочевины
B.
NH
O
N
NH
-NH2
O
N
H
N
NH
O
NH
Реакционно-способный эфир о-ацилизомочевины
Амин
Амид

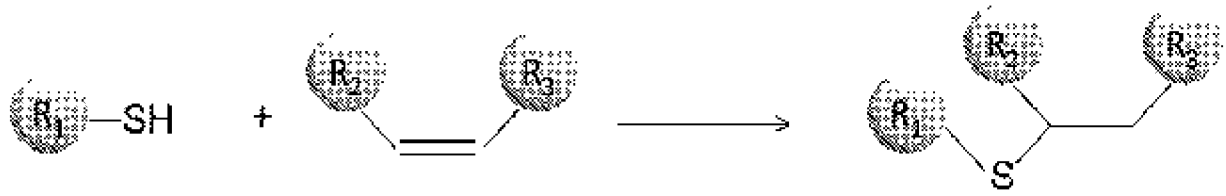
ФИГ. 6



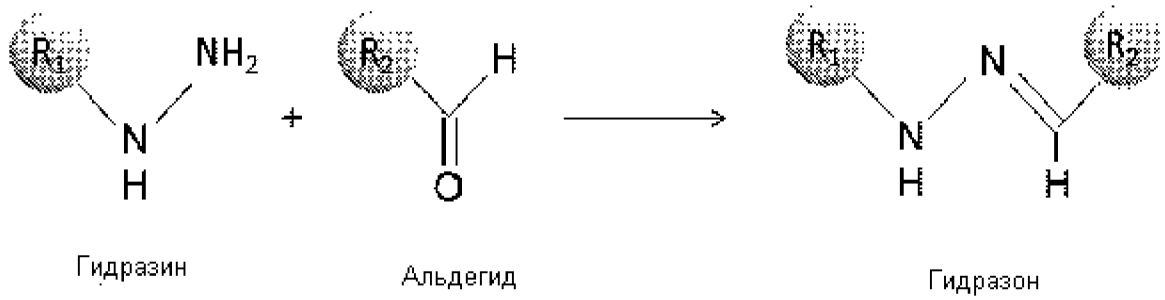
ФИГ. 7



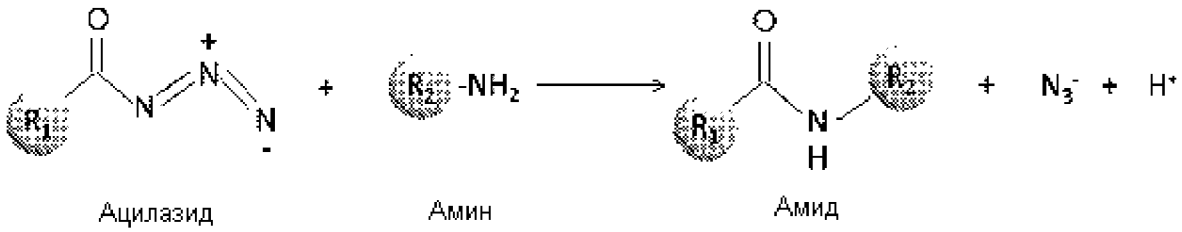
ФИГ.. 8



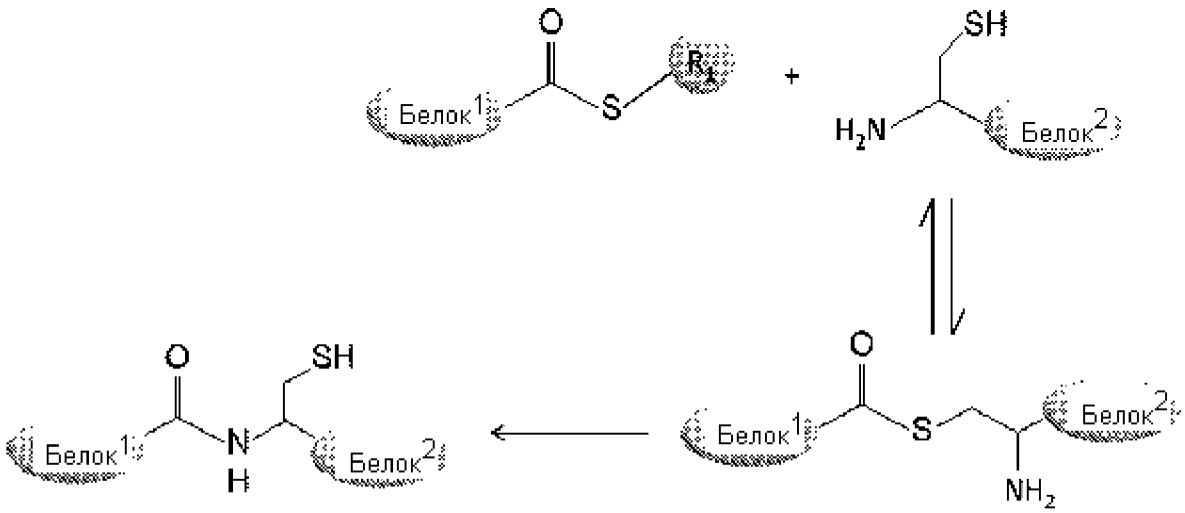
ФИГ. 9



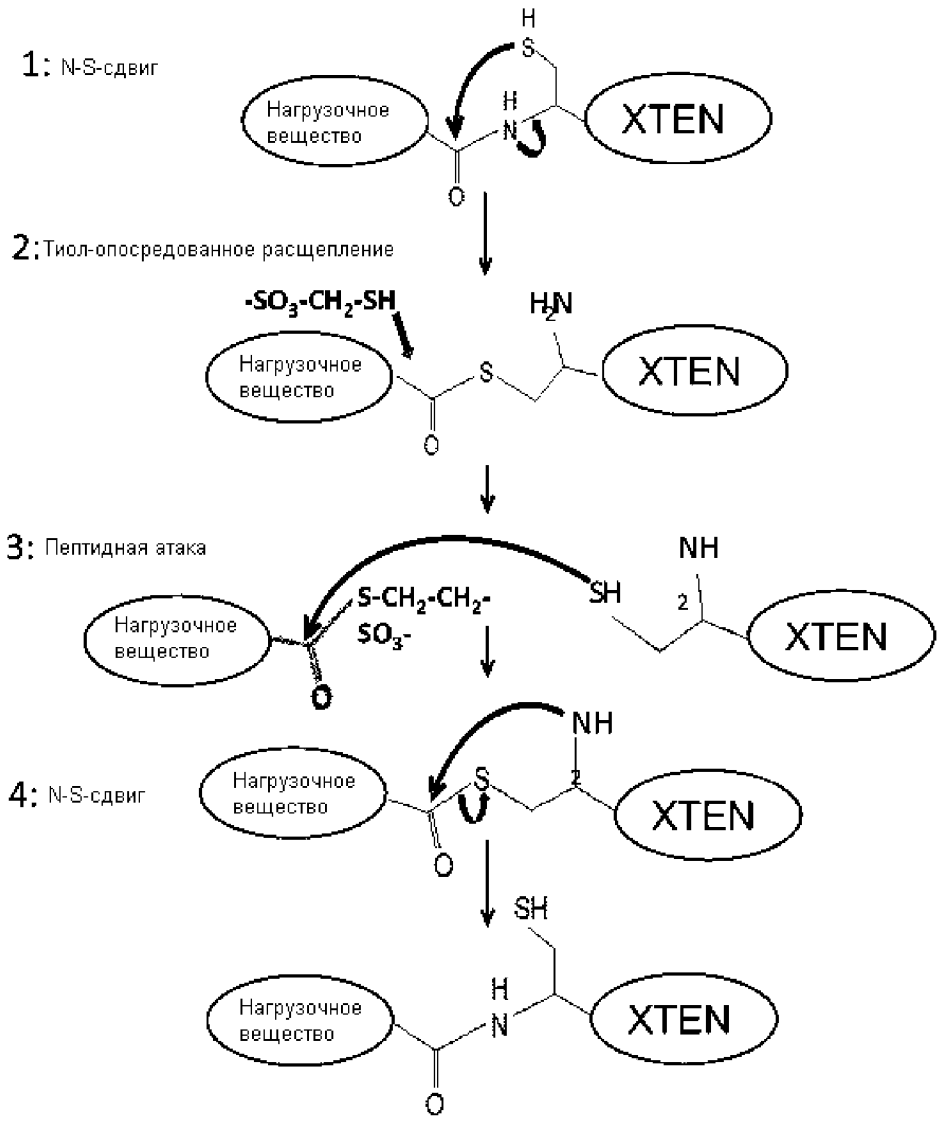
ФИГ. **10**



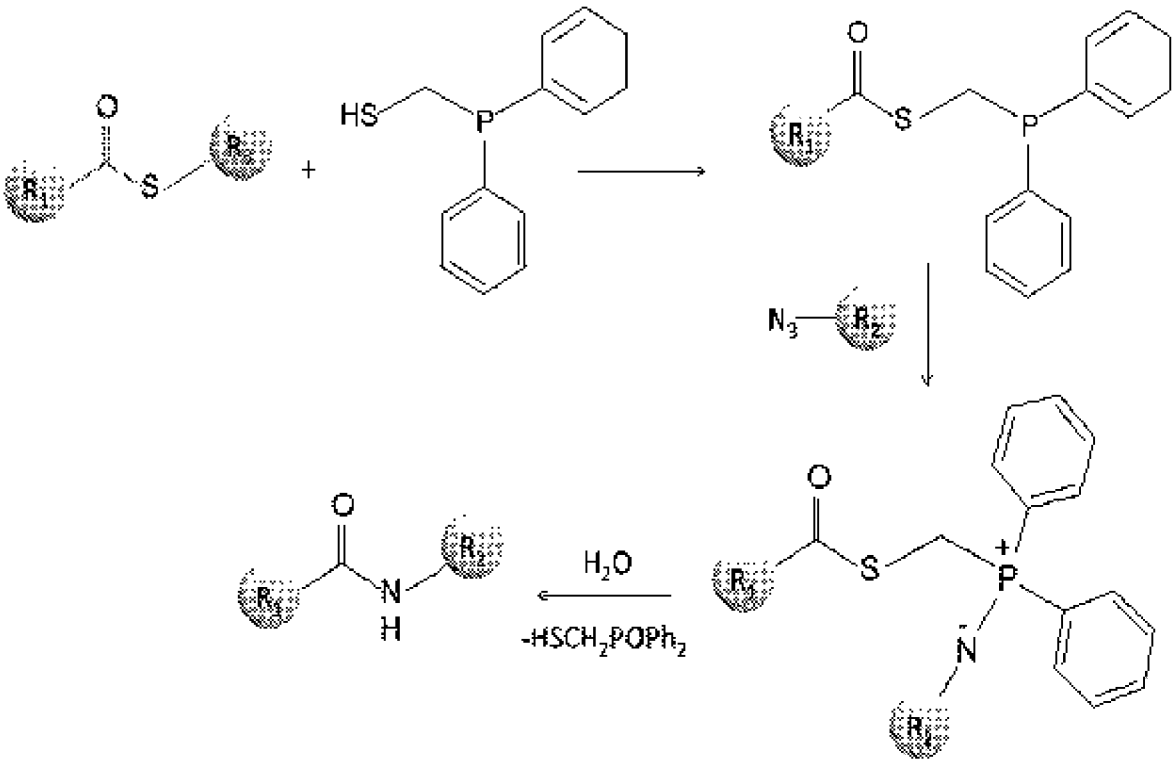
ФИГ. **11**


O
Белок1
S
R1
+
SH
H2N
Белок2
O
SH
Белок1
N
H
Белок2
O
Белок1
S
Белок2
NH2

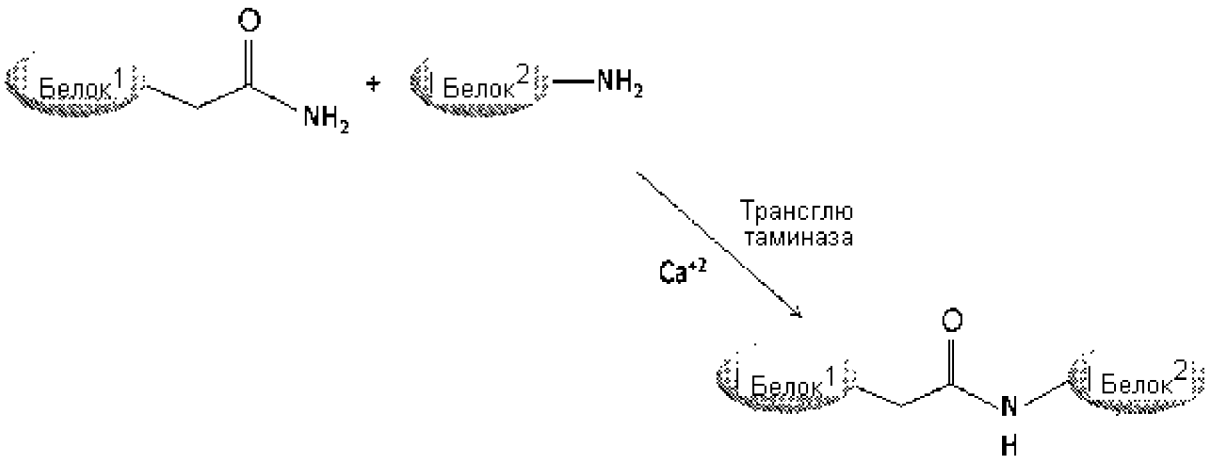
ФИГ. **12**


1: N-S-сдвиг
Нагрузочное вещество
XTEN
2: Тиол-опосредованное расщепление
-SO3-CH2-SH
H2N
3: Пептидная атака
S-CH2-CH2-SO3-
SH
NH2
4: N-S-сдвиг

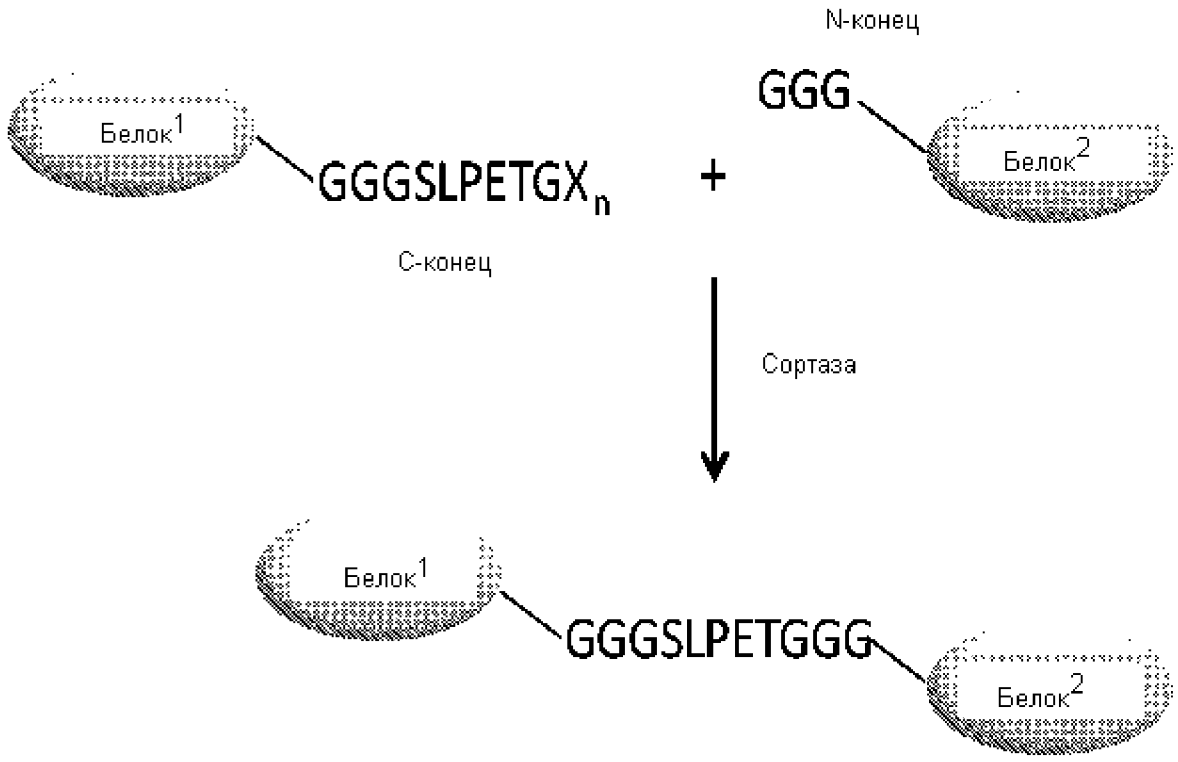
ФИГ. **13**



ФИГ. **14**

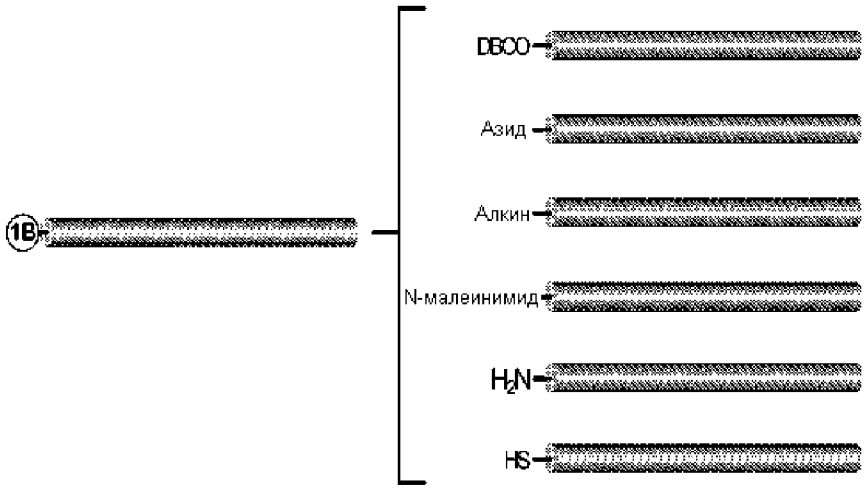

Белок1
O
NH2
+
Белок2
NH2
Трансглю
таминаза
Ca+2
Белок1
O
N
H
Белок2

ФИГ. **15**

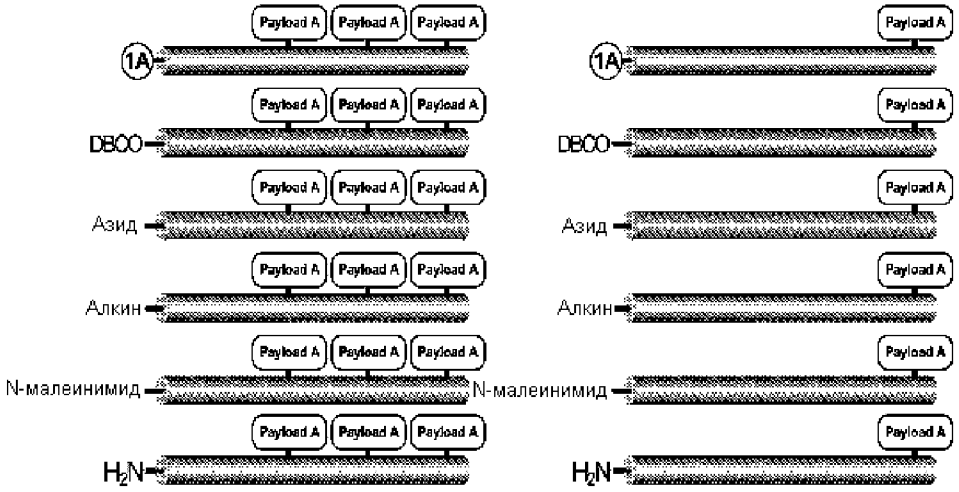

N-конец
GGG
Белок1
GGGSLPETGXn
+
Белок2
C-конец
Сортаза
Белок1
GGGSLPETGGG
Белок2

ФИГ. **16**

A

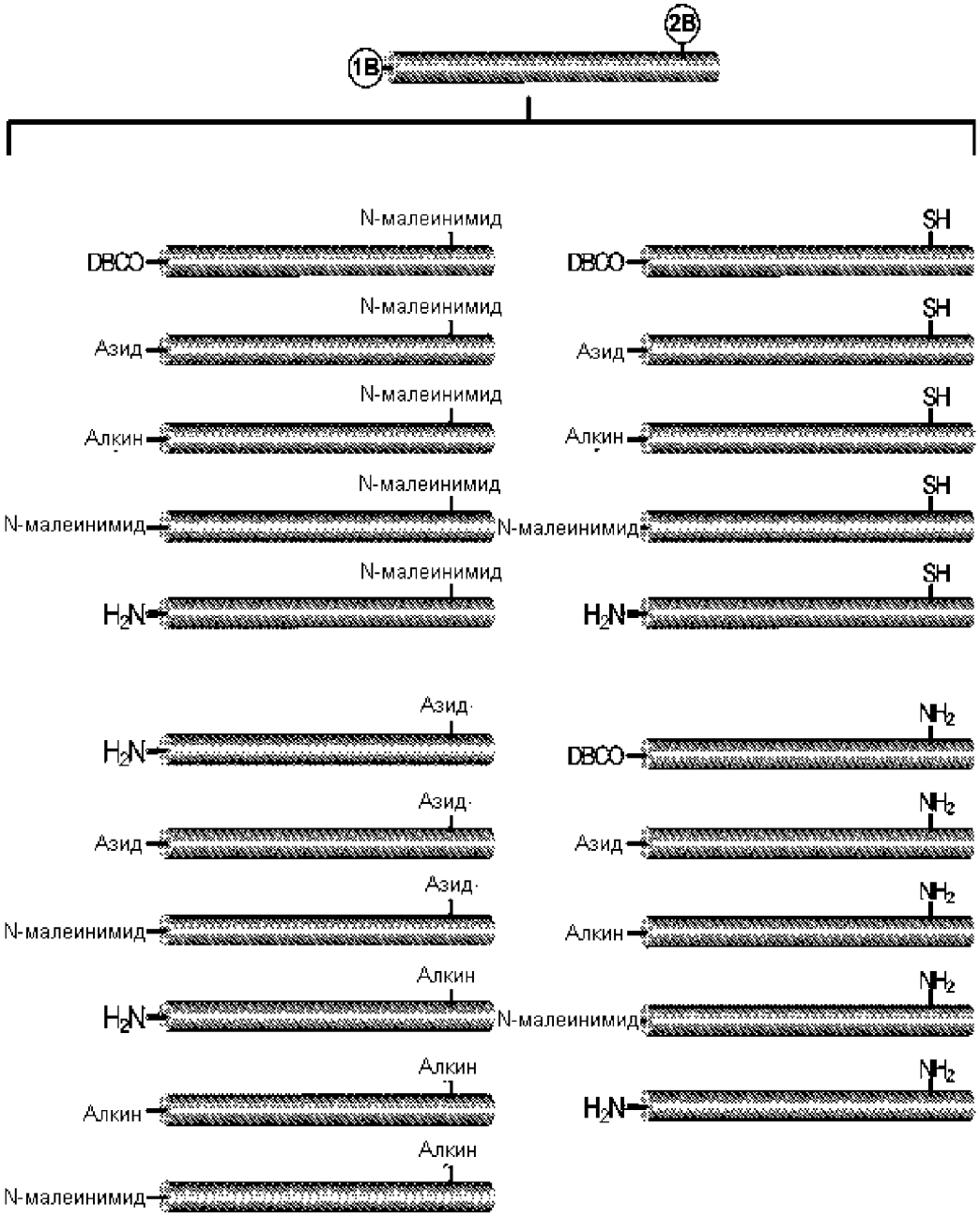


B



*Payload A – Нагрузочное вещество A

ФИГ. **17**


2B
1B
N-малеинимид
DBCO
SH
DBCO
N-малеинимид
Азид
SH
Азид
N-малеинимид
Алкин
SH
Алкин
N-малеинимид
N-малеинимид
SH
N-малеинимид
N-малеинимид
H2N
SH
H2N
Азид
H2N
NH2
DBCO
Азид
Азид
NH2
Азид
Азид
N-малеинимид
NH2
Алкин
Алкин
H2N
NH2
N-малеинимид
Алкин
Алкин
NH2
H2N
Алкин
N-малеинимид

ФИГ. **18**

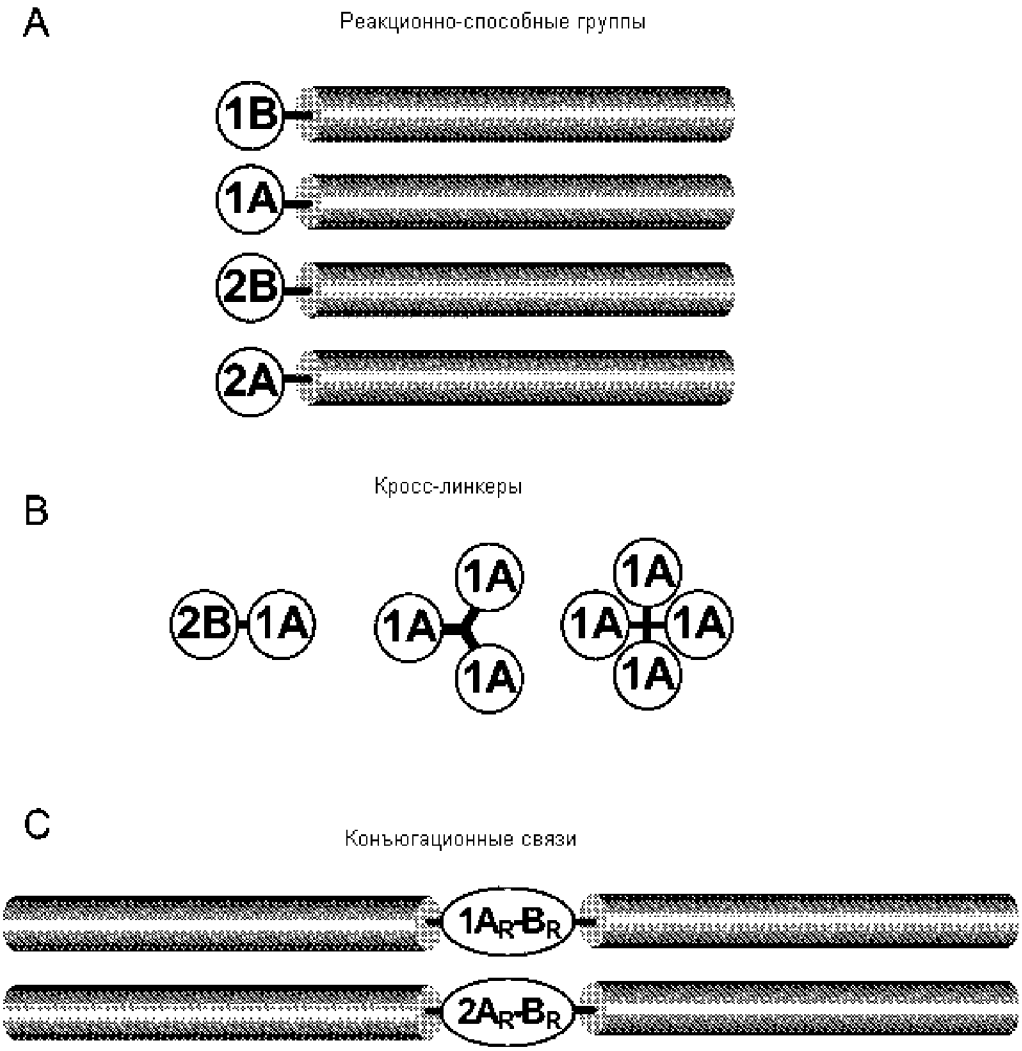
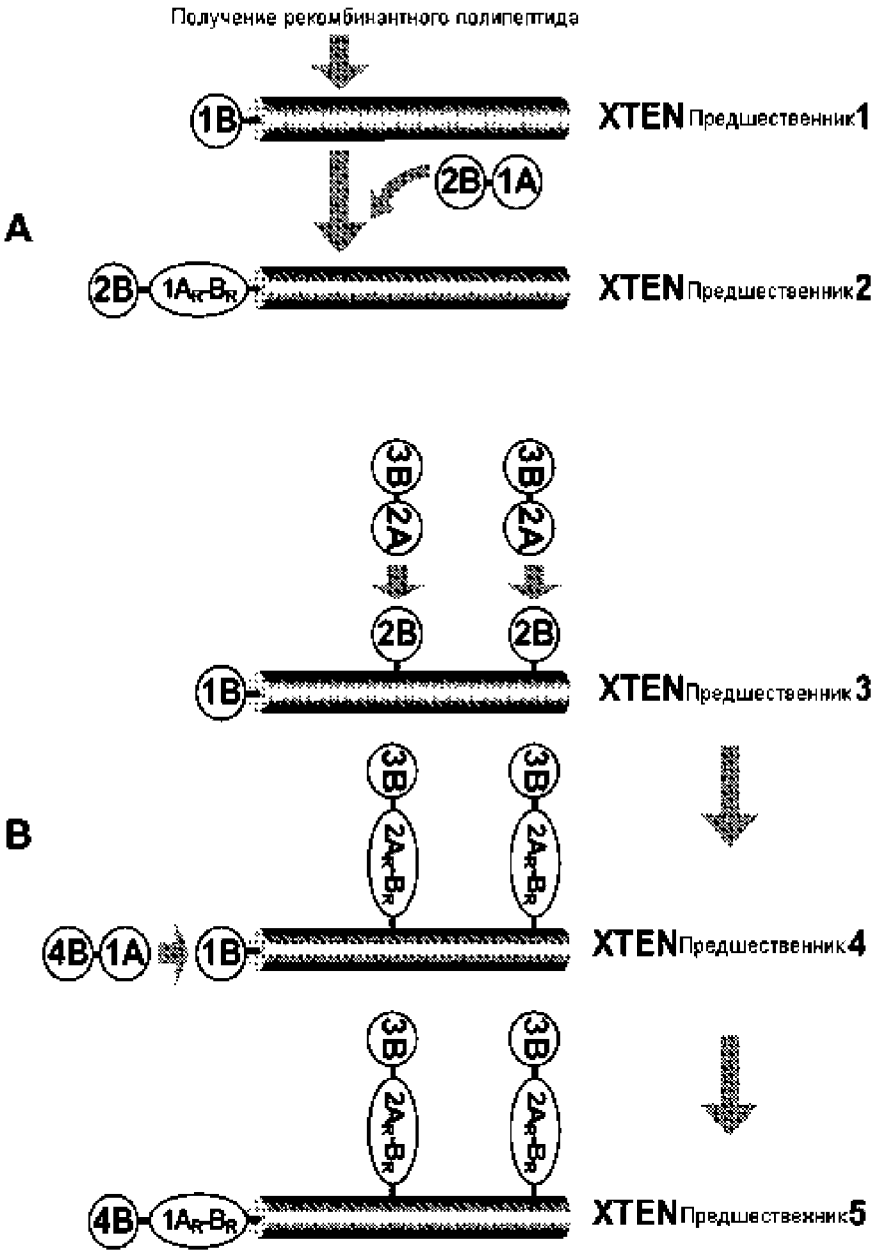
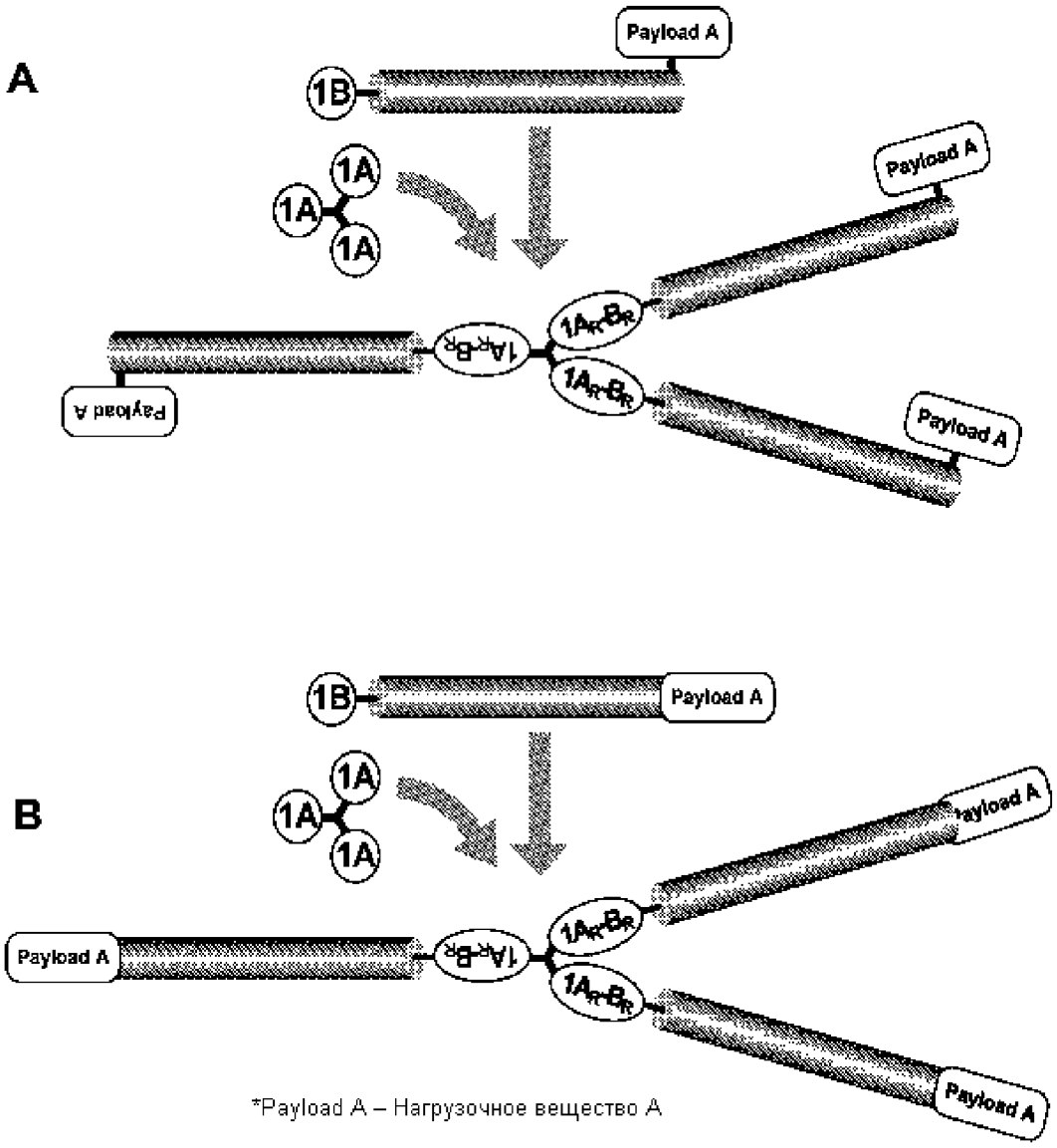

A
Реакционно-способные группы
1B
1A
2B
2A
B
Кросс-линкеры
2B
1A
1A
1A
1A
1A
1A
1A
C
Конъюгационные связи
1A_R-B_R
2A_R-B_R

FIG. 19

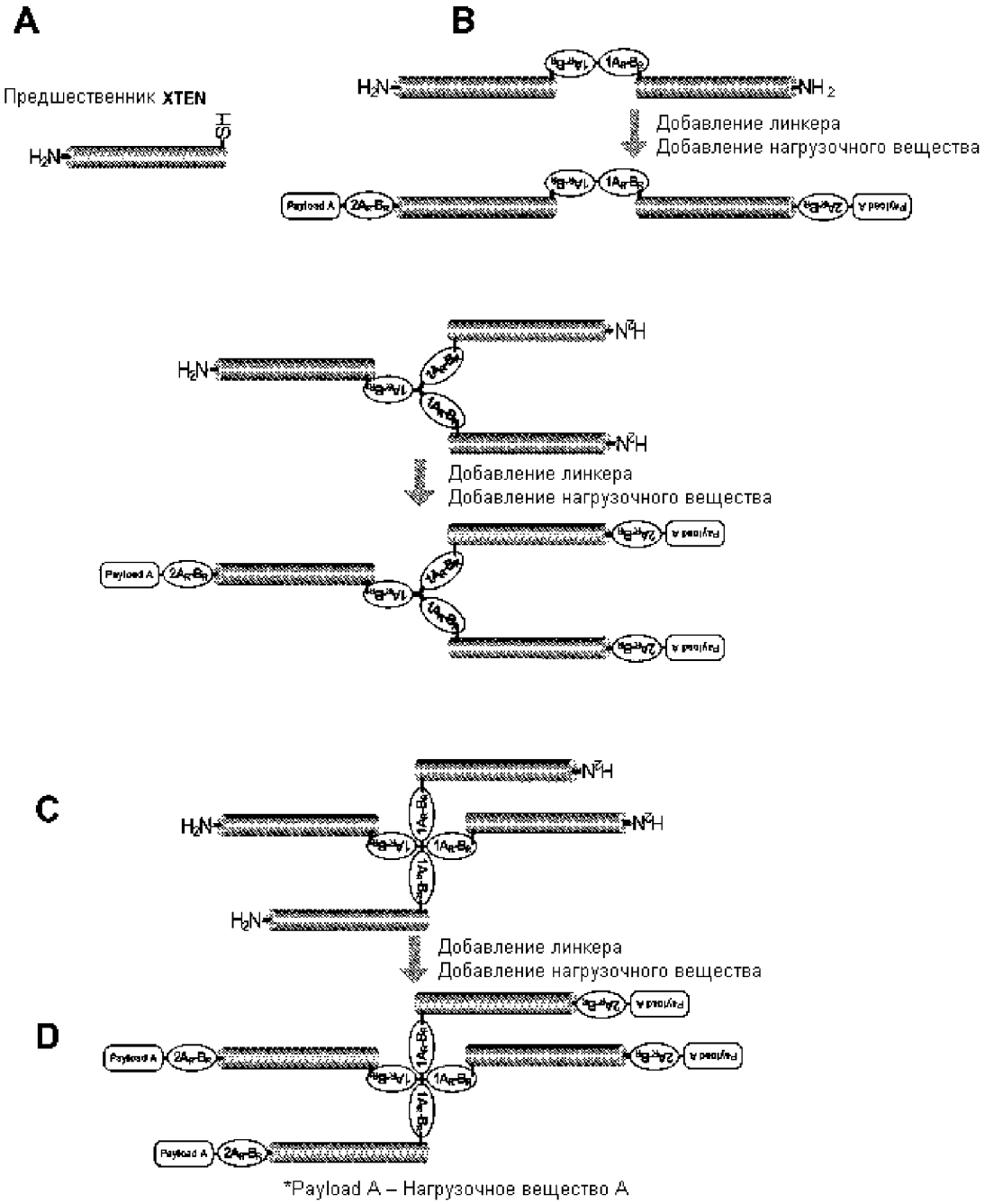

Получение рекомбинантного полипептида
A
1B
XTEN Предшественник 1
2B
1A
2B
1A(R-B)R
XTEN Предшественник 2
B
3B
2A
2B
1B
XTEN Предшественник 3
2A(R-B)R
4B
1A
XTEN Предшественник 4
XTEN Предшественник 5

ФИГ. 20

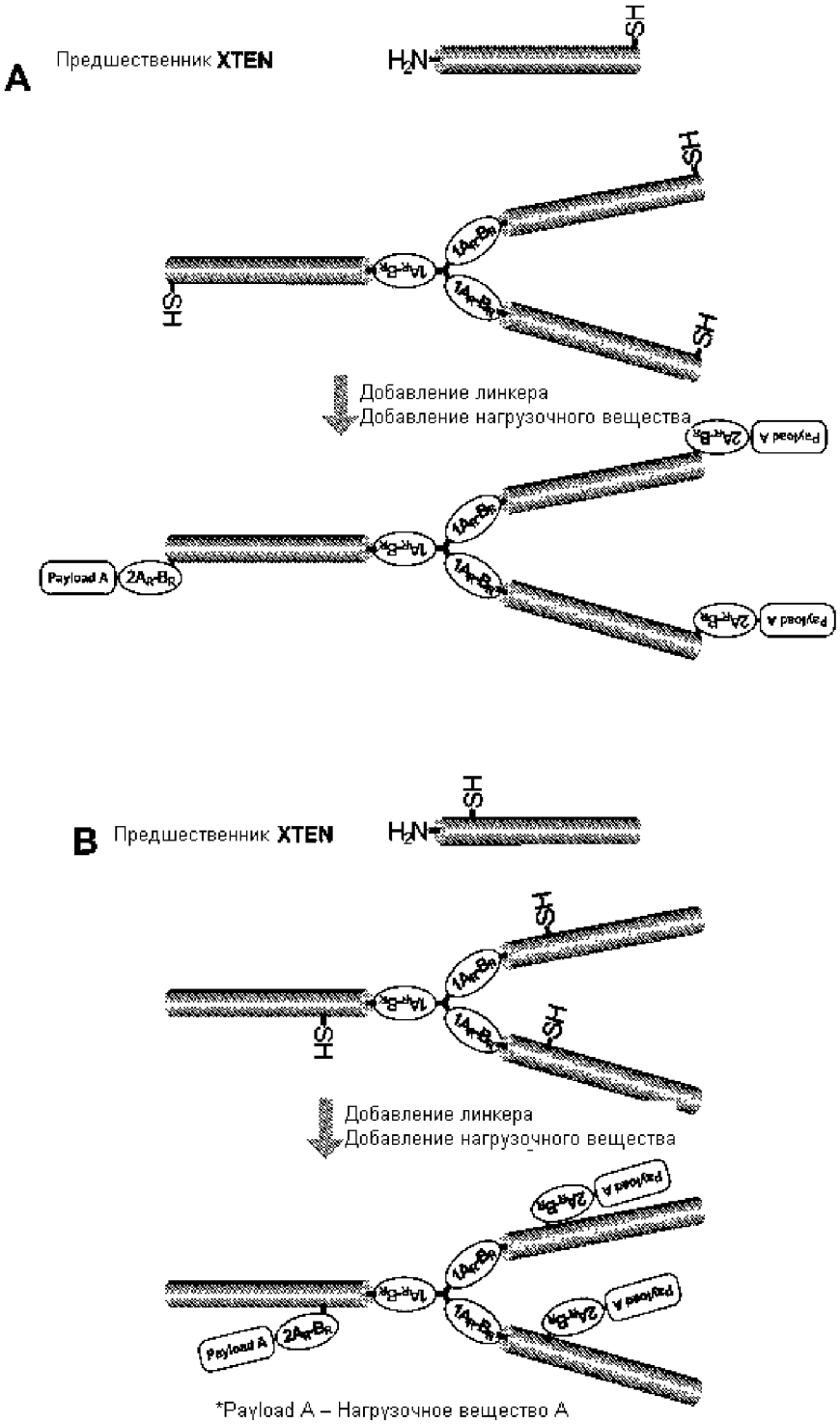


*Payload A – Нагрузочное вещество A

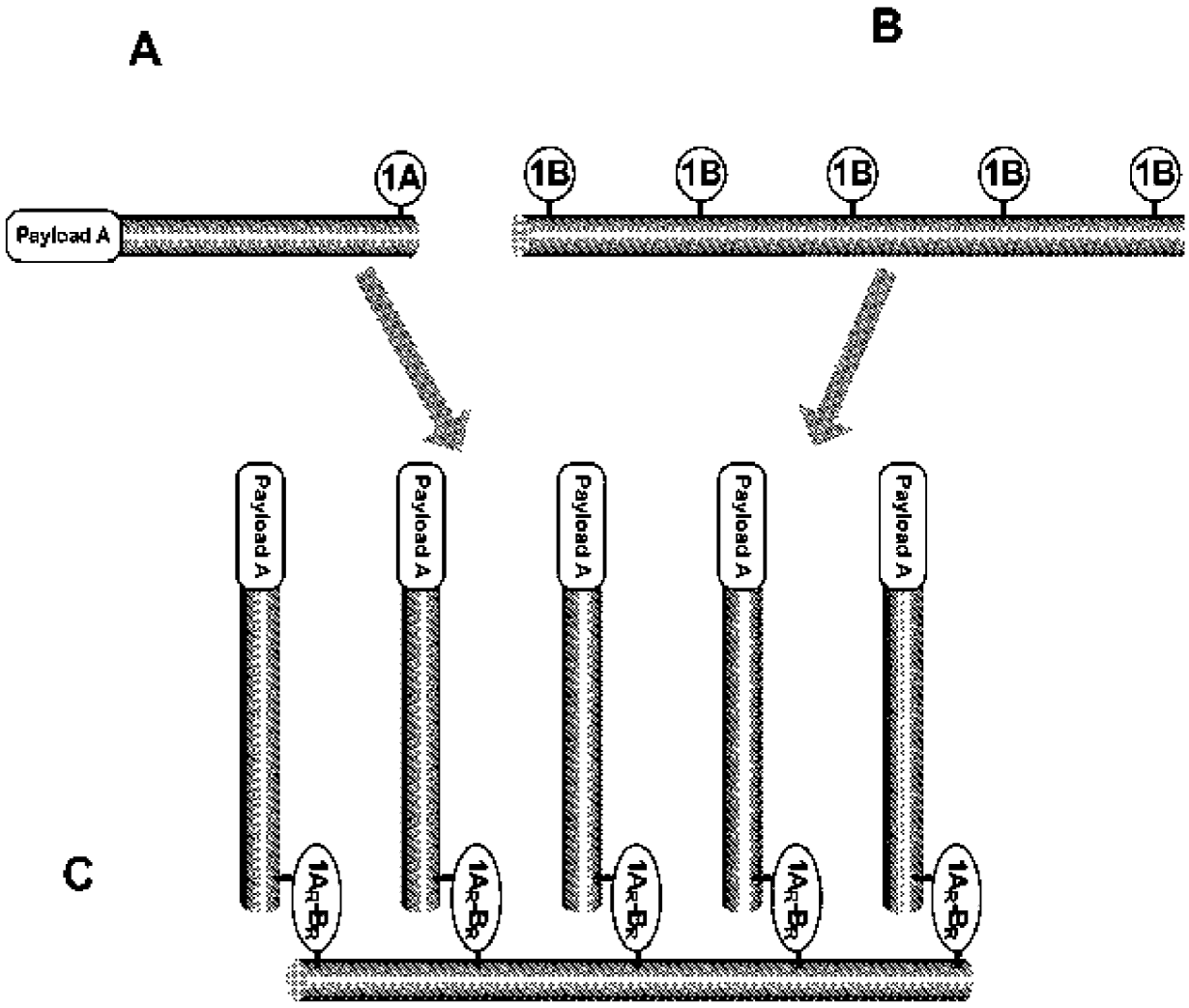
ФИГ. **21**


A
Предшественник XTEN
B
Добавление линкера
Добавление нагрузочного вещества
C
D
Добавление линкера
Добавление нагрузочного вещества
*Payload A – Нагрузочное вещество A

ФИГ. **22**

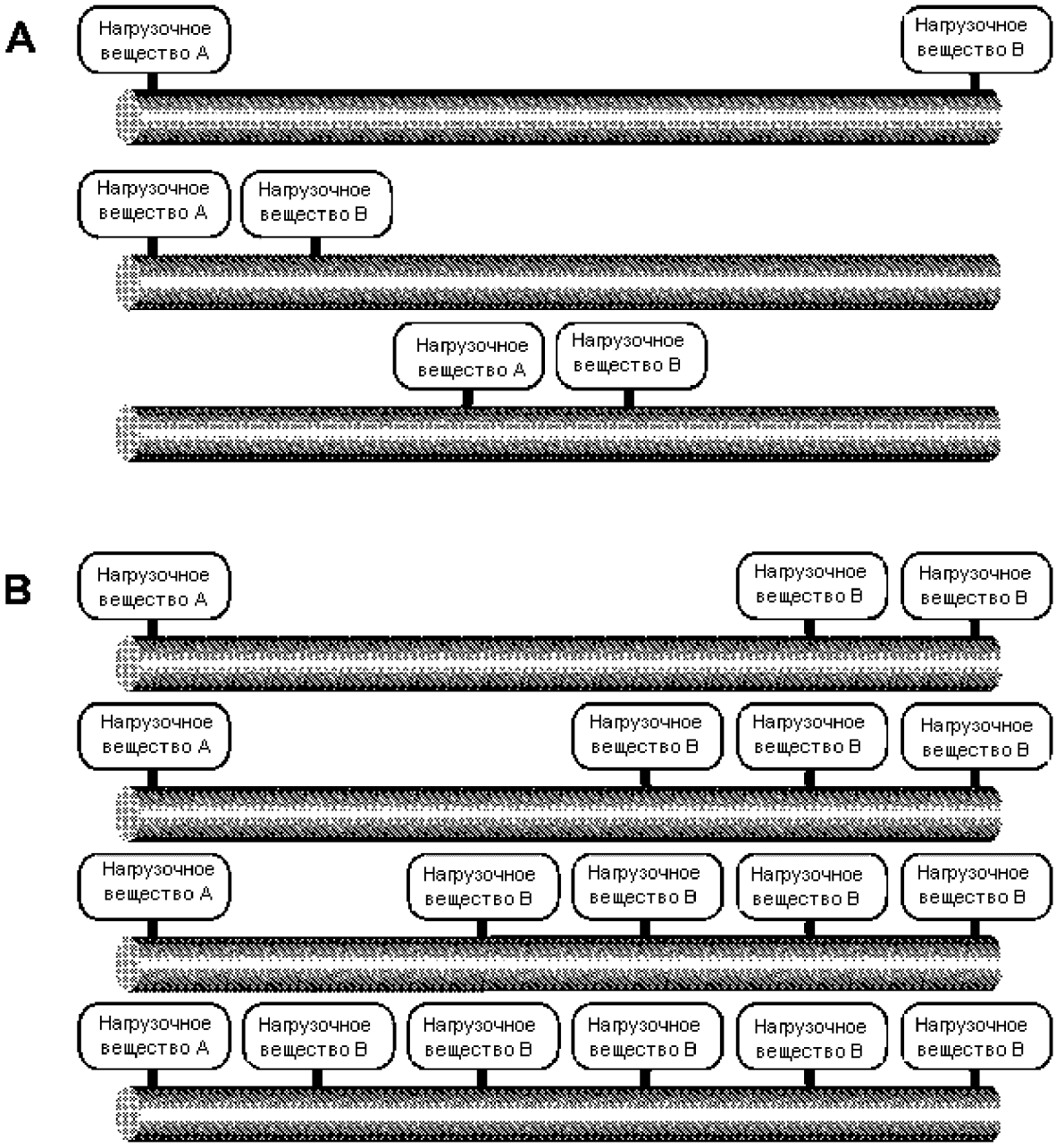

A
Предшественник XTEN
Добавление линкера
Добавление нагрузочного вещества
Payload A
B
Предшественник XTEN
Добавление линкера
Добавление нагрузочного вещества
*Payload A – Нагрузочное вещество A

ФИГ. 23

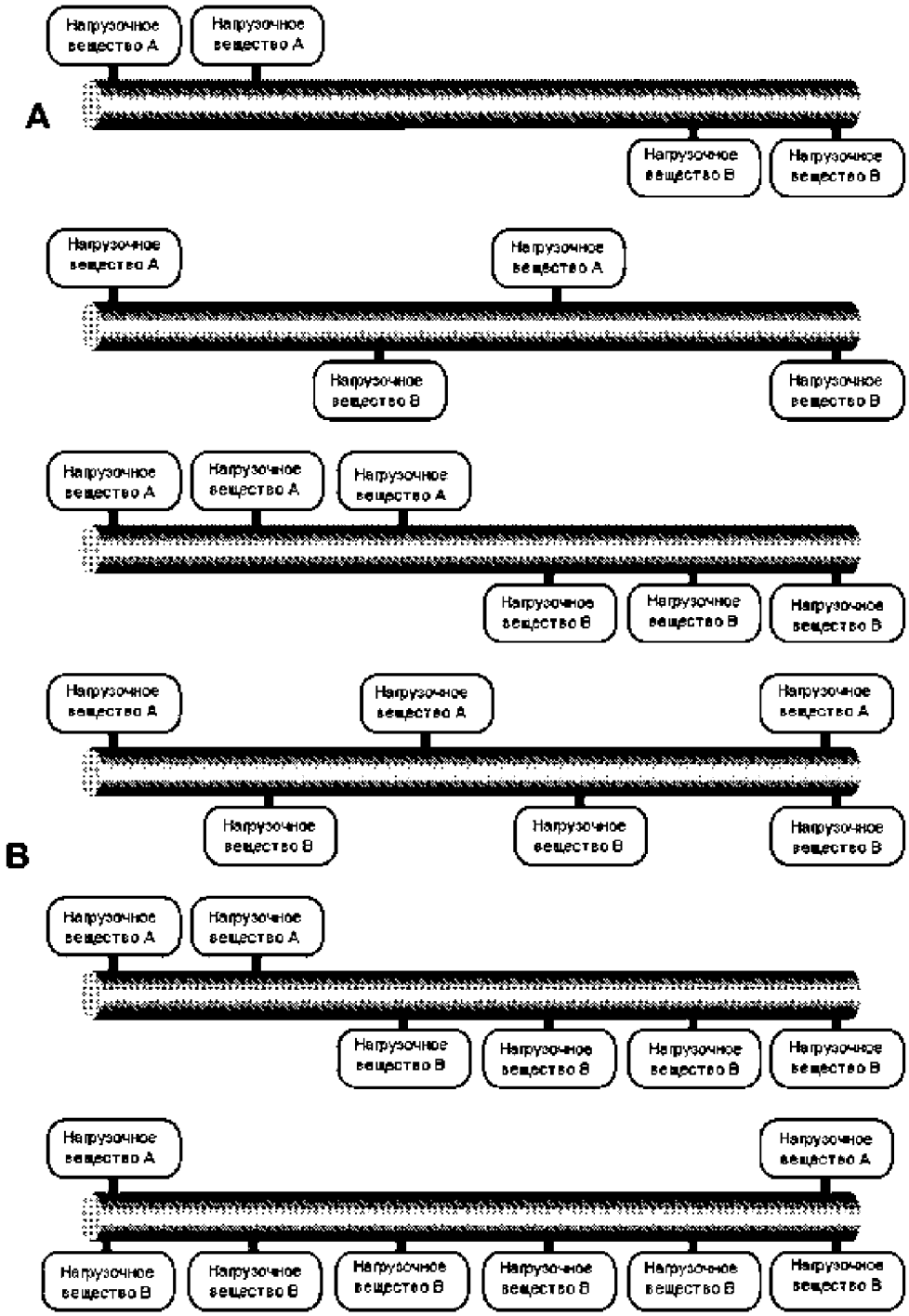


*Payload A – Нагрузочное вещество A

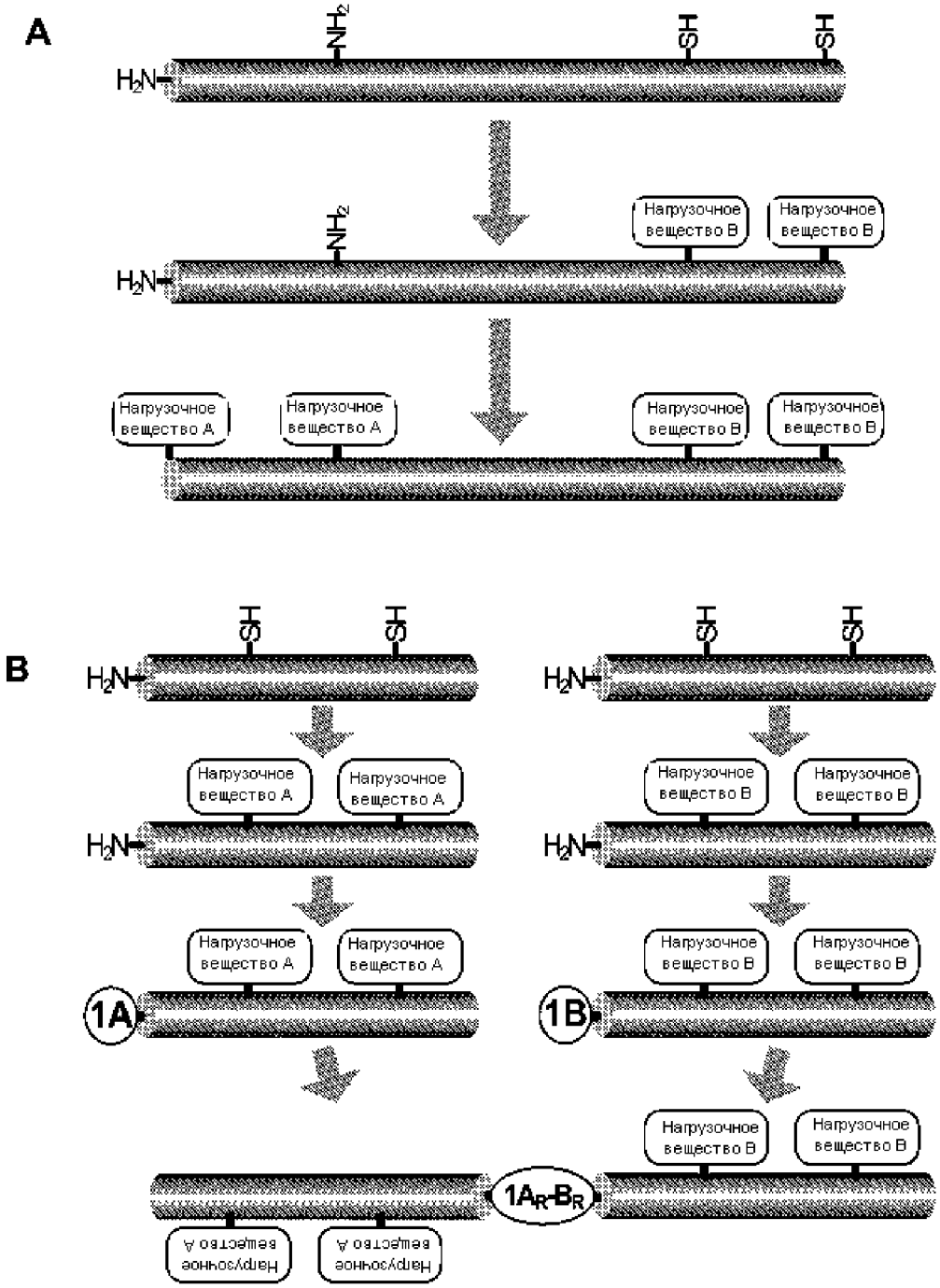
ФИГ. **24**


A
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
B
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В
Нагрузочное вещество В

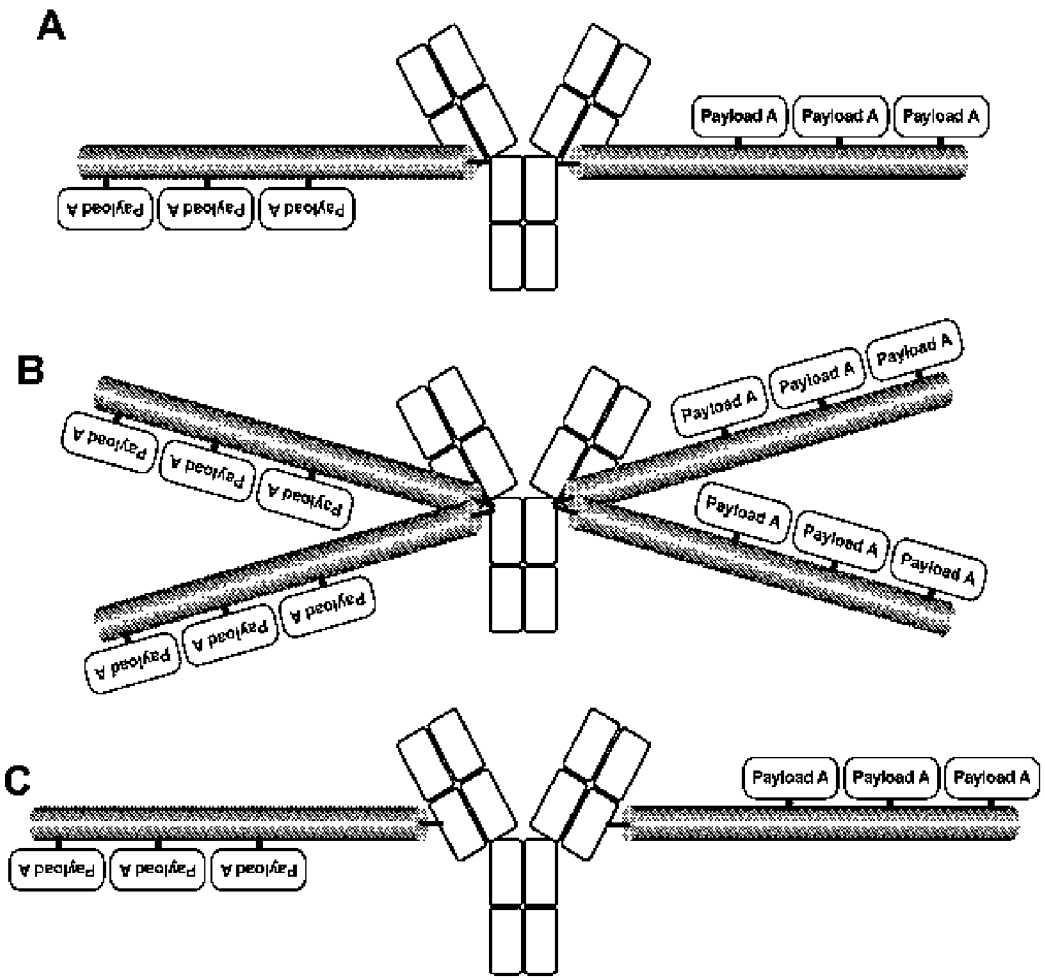
ФИГ. **25**



ФИГ. 26

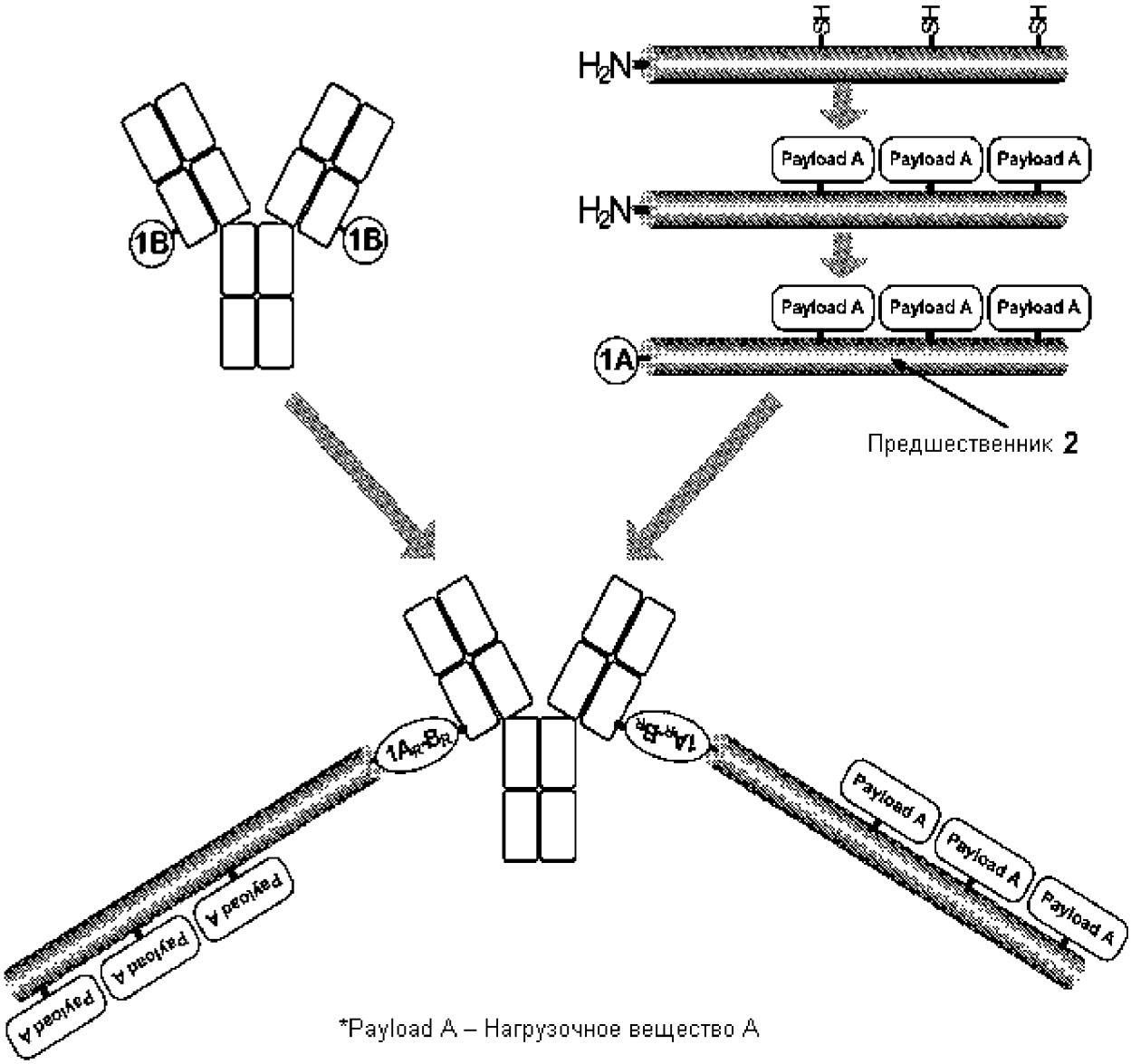

A
H_2N
SH
SH
H_2N
Нагрузочное вещество B
Нагрузочное вещество B
H_2N
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество B
Нагрузочное вещество B
B
SH
SH
H_2N
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
H_2N
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
1A
SH
SH
H_2N
Нагрузочное вещество B
Нагрузочное вещество B
H_2N
Нагрузочное вещество B
Нагрузочное вещество B
1B
Нагрузочное вещество B
Нагрузочное вещество B
$1A_R$-B_R
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A

ФИГ. **27**



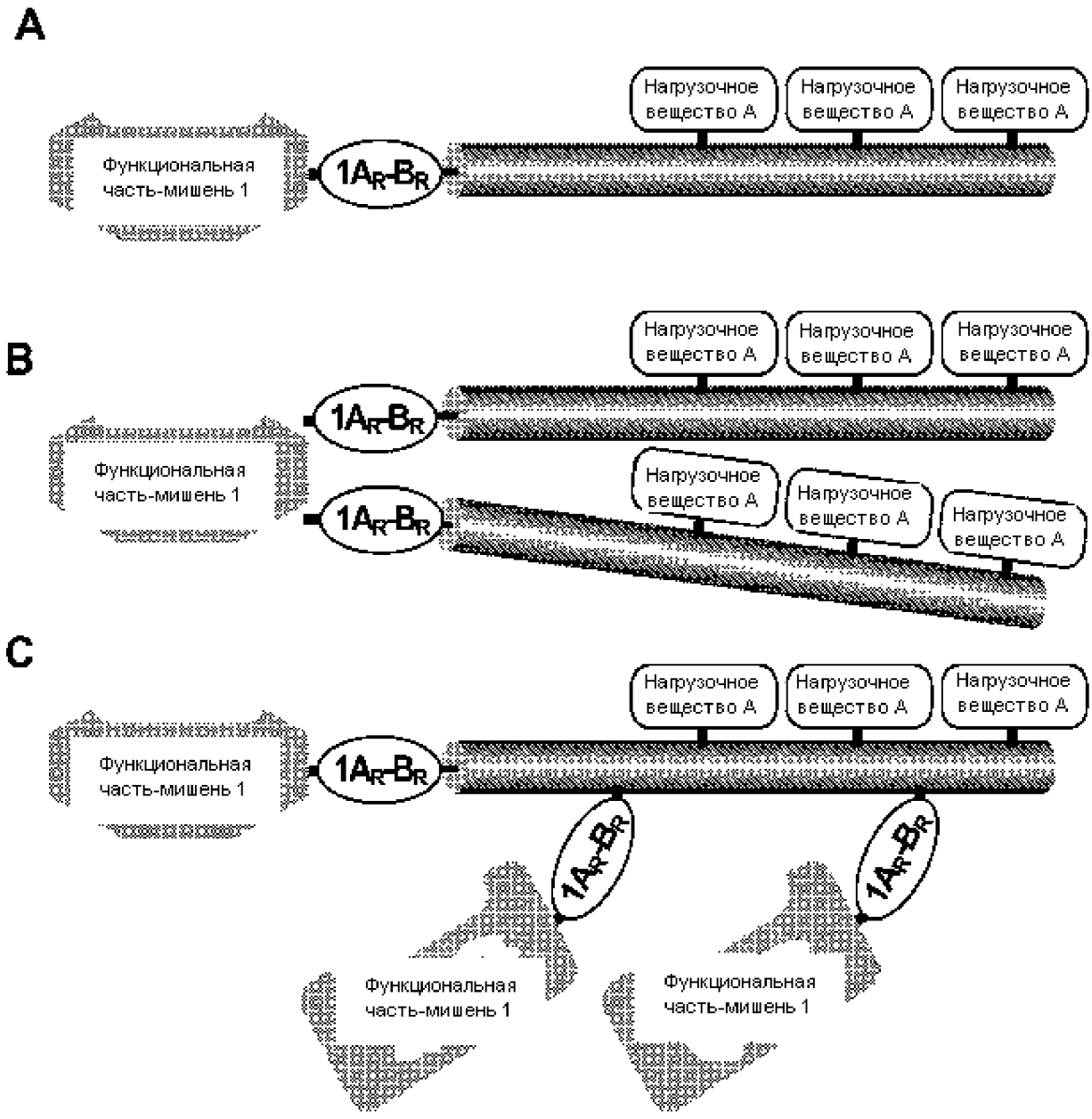
*Payload A – Нагрузочное вещество A

ФИГ. **28**

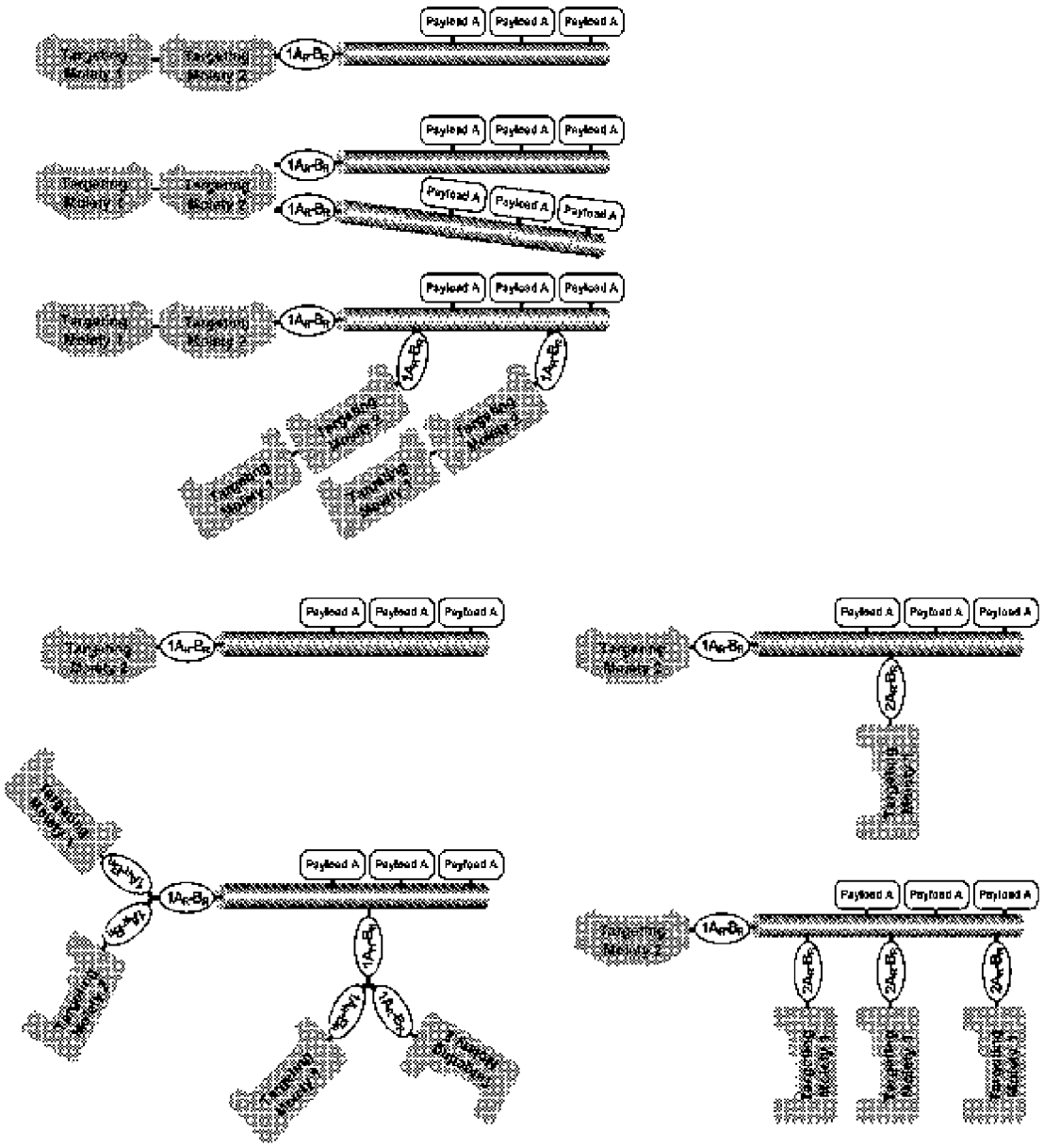


*Payload A – Нагрузочное вещество A

ФИГ. **29**


A
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Функциональная часть-мишень 1
1A$_R$-B$_R$
B
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Функциональная часть-мишень 1
1A$_R$-B$_R$
1A$_R$-B$_R$
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
C
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Нагрузочное вещество A
Функциональная часть-мишень 1
1A$_R$-B$_R$
1A$_R$-B$_R$
1A$_R$-B$_R$
Функциональная часть-мишень 1
Функциональная часть-мишень 1

ФИГ. **30**

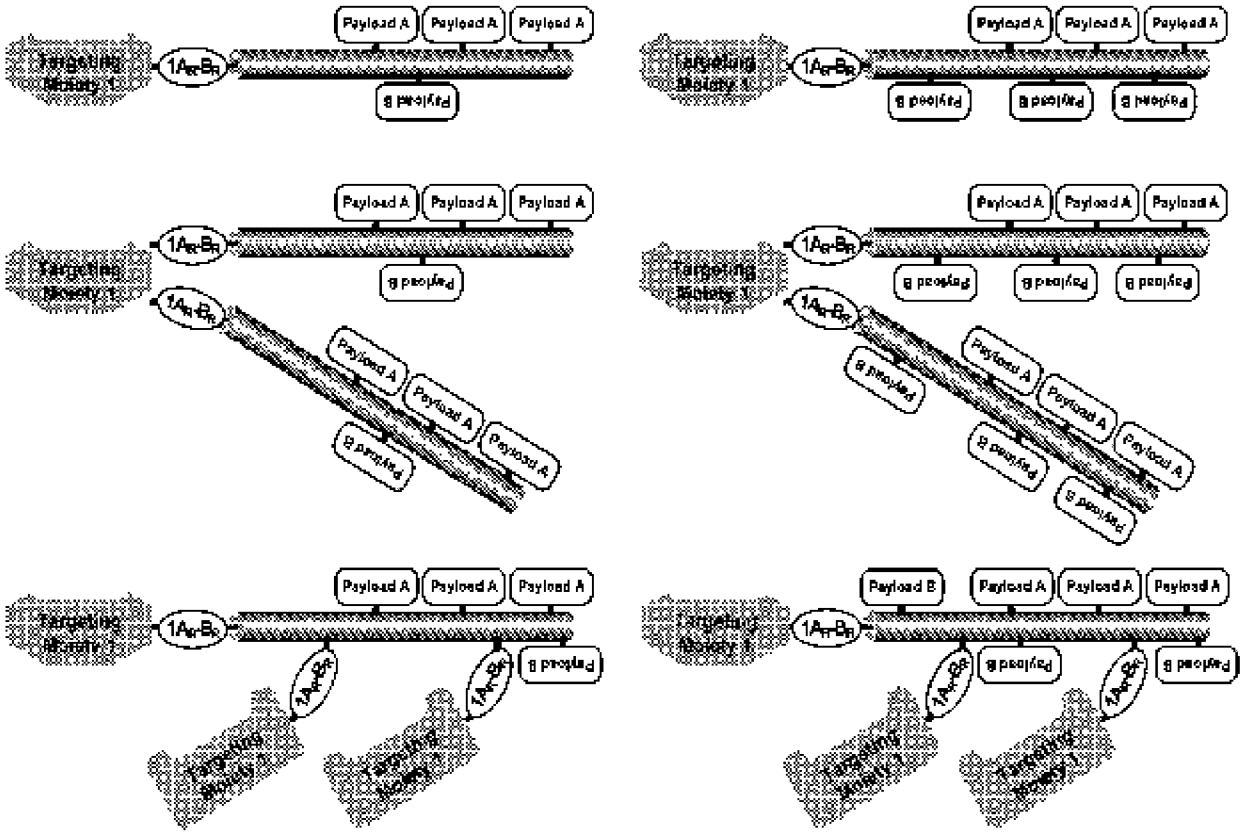


*Targeting moiety 1 – Функциональная часть-мишень 1

**Targeting moiety 2 – Функциональная часть-мишень 2

***Payload A – Нагрузочное вещество

ФИГ. **31**

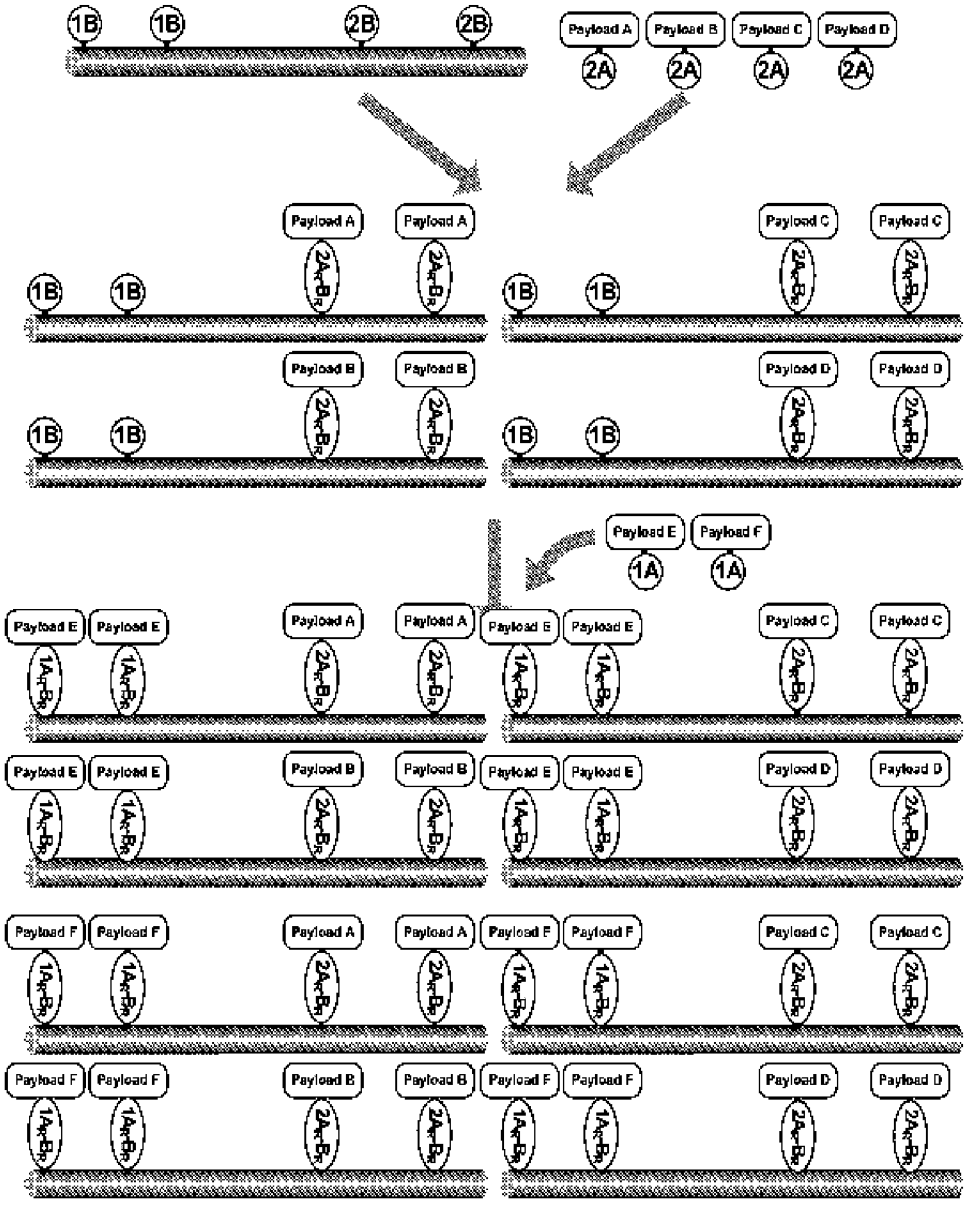


*Targeting moiety 1 – Функциональная часть-мишень 1

**Payload A – Нагрузочное вещество A

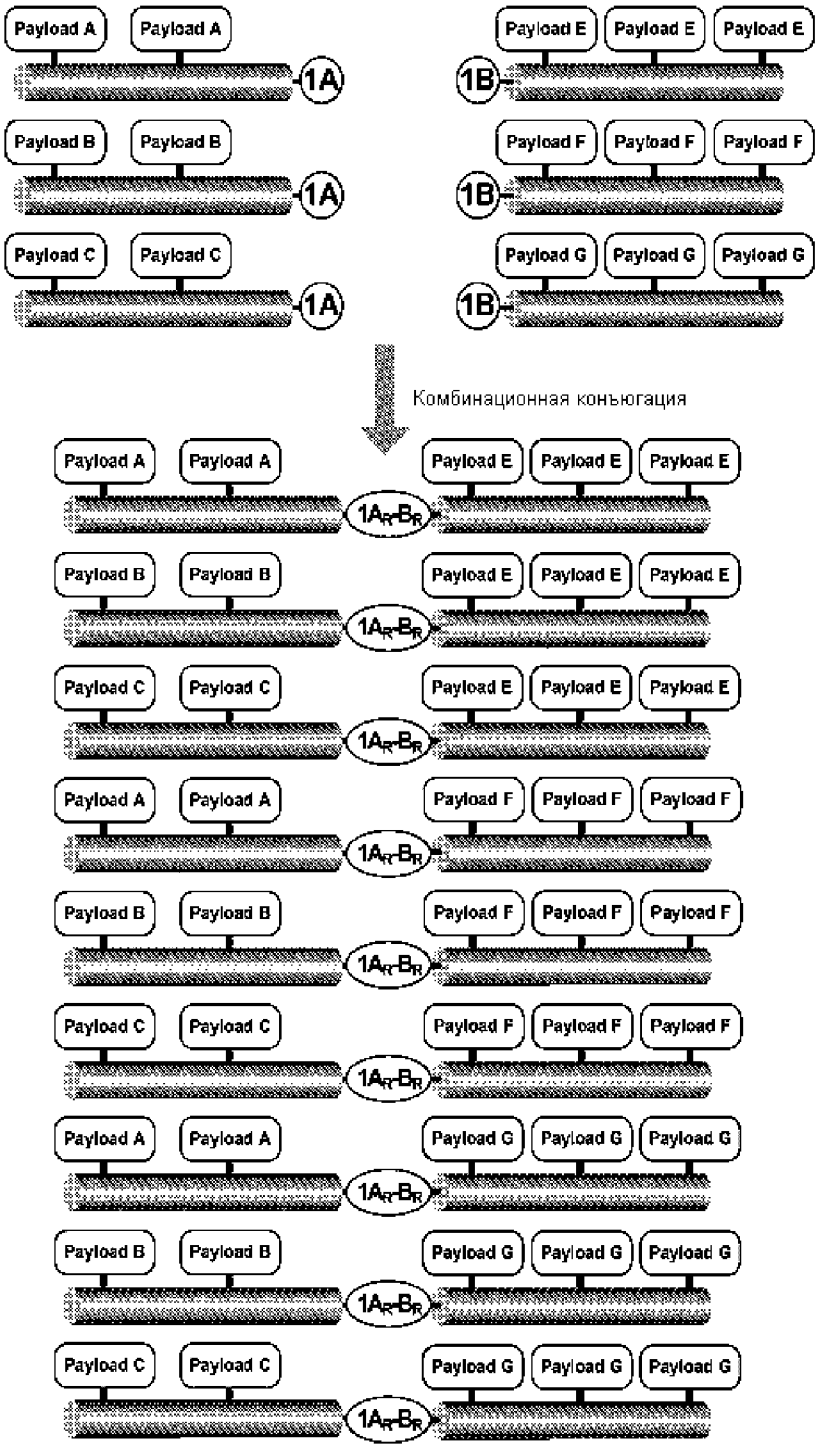
***Payload B – Нагрузочное вещество B

ФИГ. 32



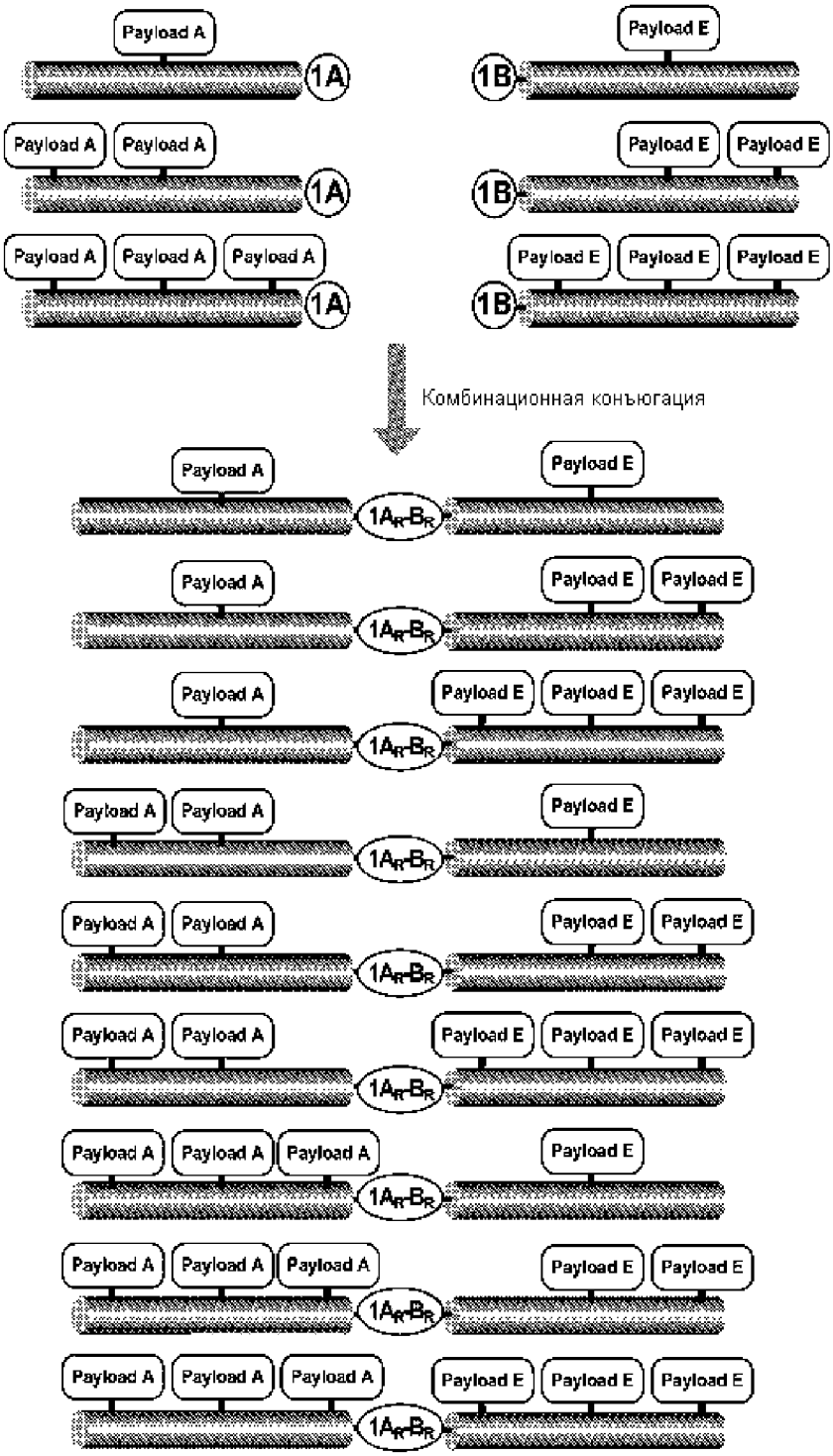
Payload A – Нагрузочное вещество A
Payload B – Нагрузочное вещество B
Payload C – Нагрузочное вещество C
Payload D – Нагрузочное вещество D
Payload E – Нагрузочное вещество E
Payload F – Нагрузочное вещество F

ФИГ. **33**



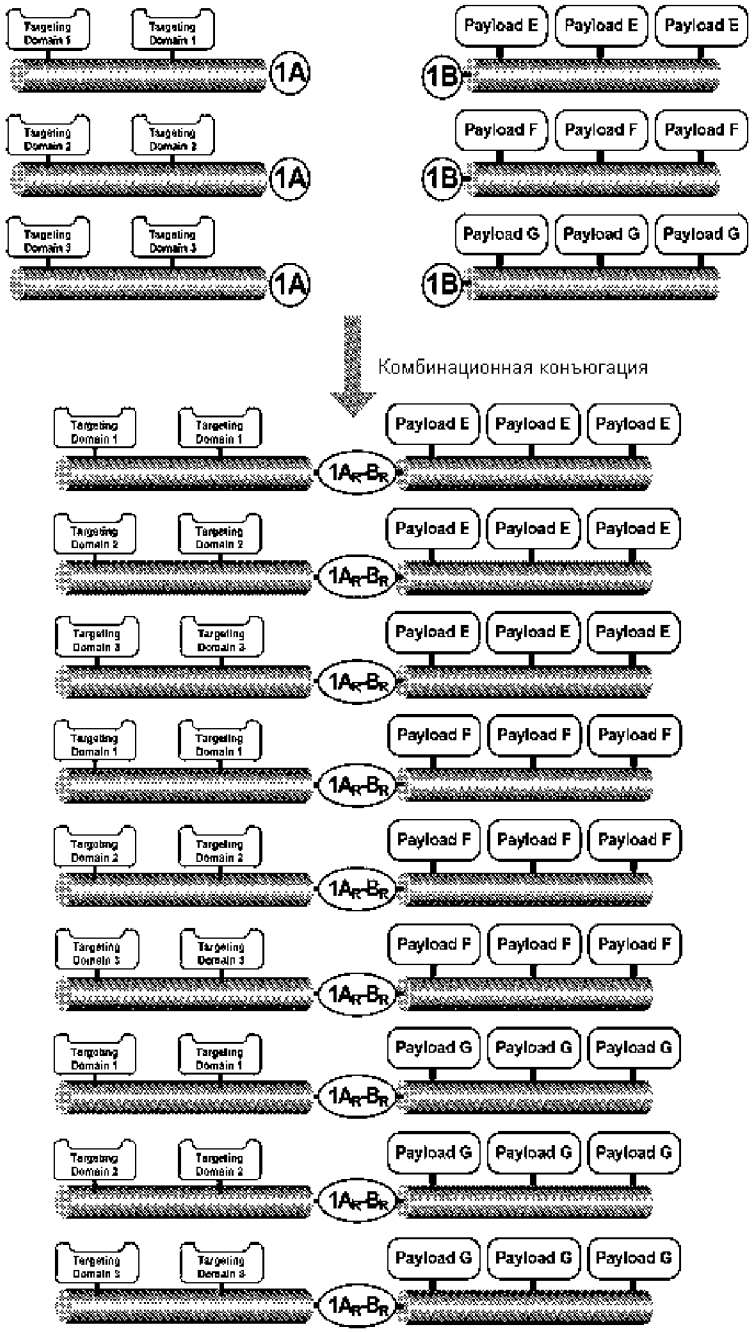
*Payload A, B, C, D, E, F, G – Нагрузочное вещество A, B, C, D, E, F, G

ФИГ. 34



*Payload A, E – Нагрузочное вещество A, E

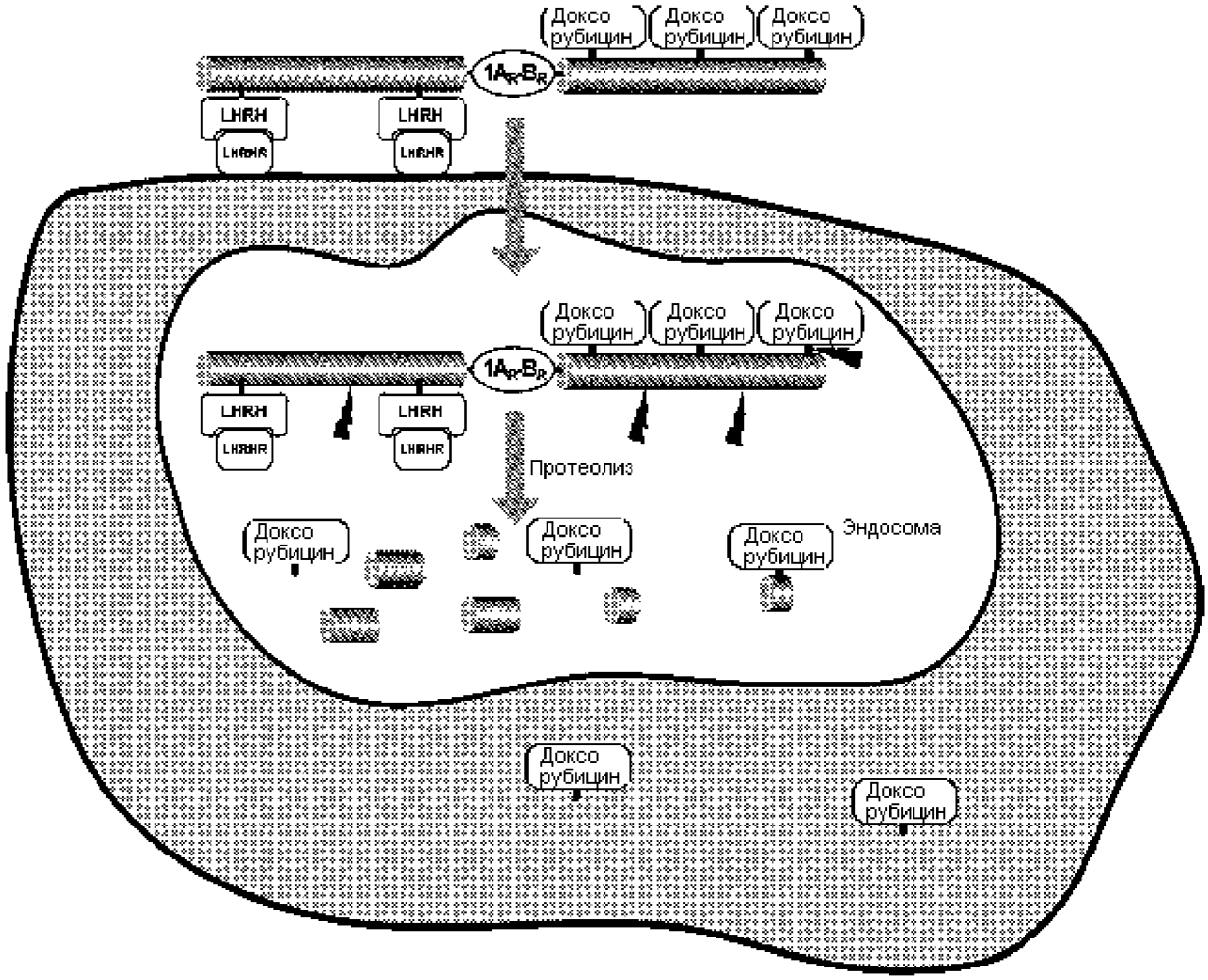
ФИГ. **35**



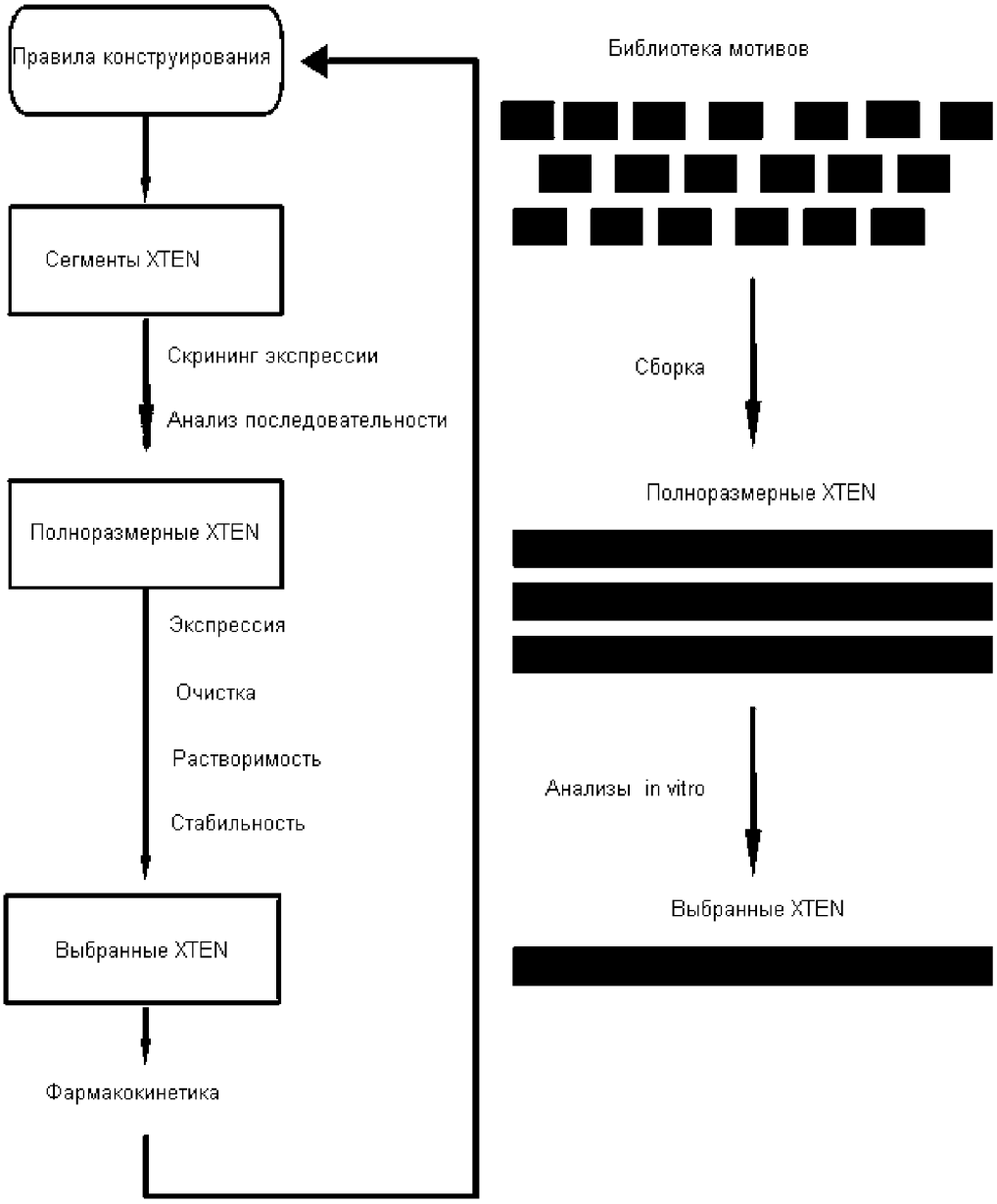
Targeting Domain 1, 2, 3 – Домен мишени 1, 2, 3

Payload E, F, G – Нагрузочное вещество E, F, G

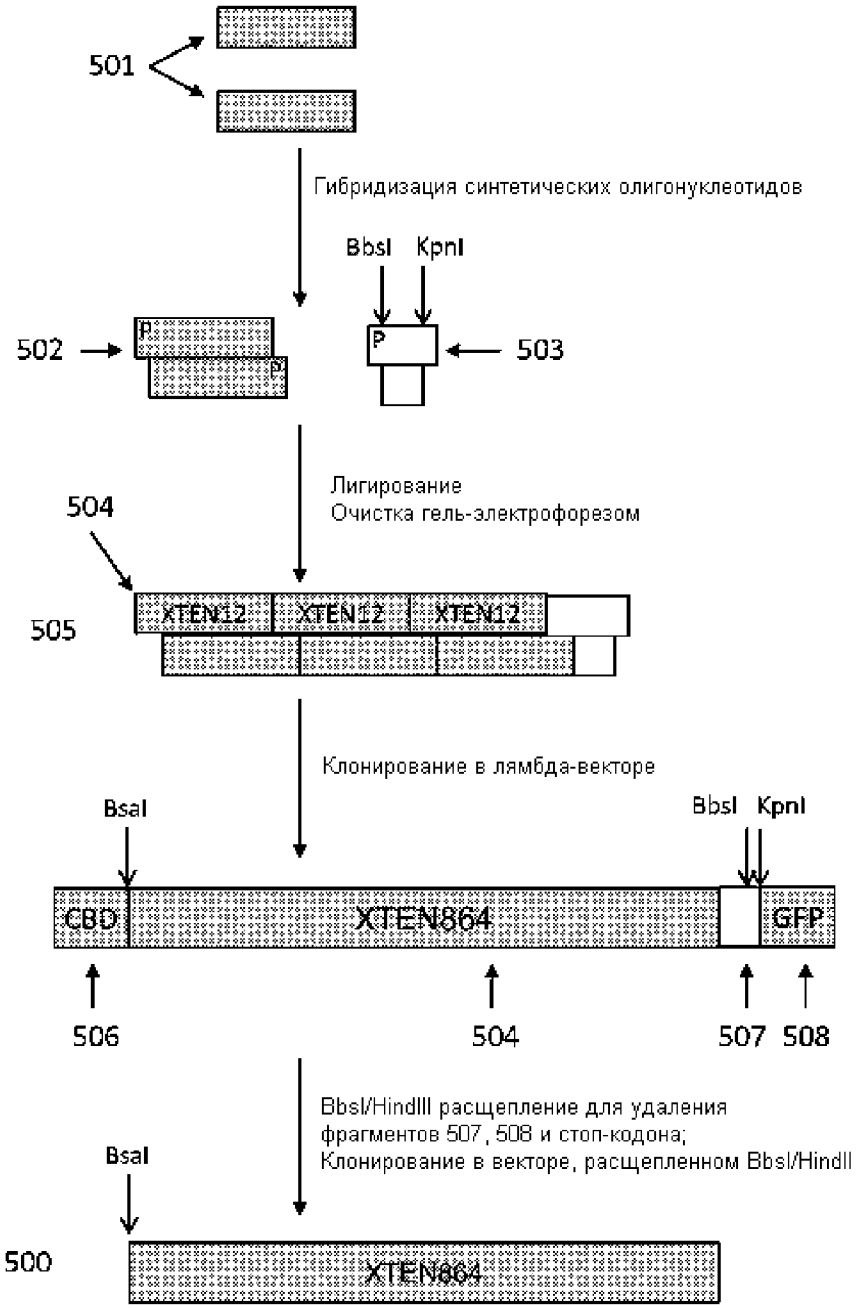
ФИГ. **36**


Доксо рубицин
Доксо рубицин
Доксо рубицин
1A-B
LHRH
LHRHR
LHRH
LHRHR
Доксо рубицин
Доксо рубицин
Доксо рубицин
1A-B
LHRH
LHRHR
LHRH
LHRHR
Протеолиз
Доксо рубицин
Доксо рубицин
Доксо рубицин
Эндосома
Доксо рубицин
Доксо рубицин

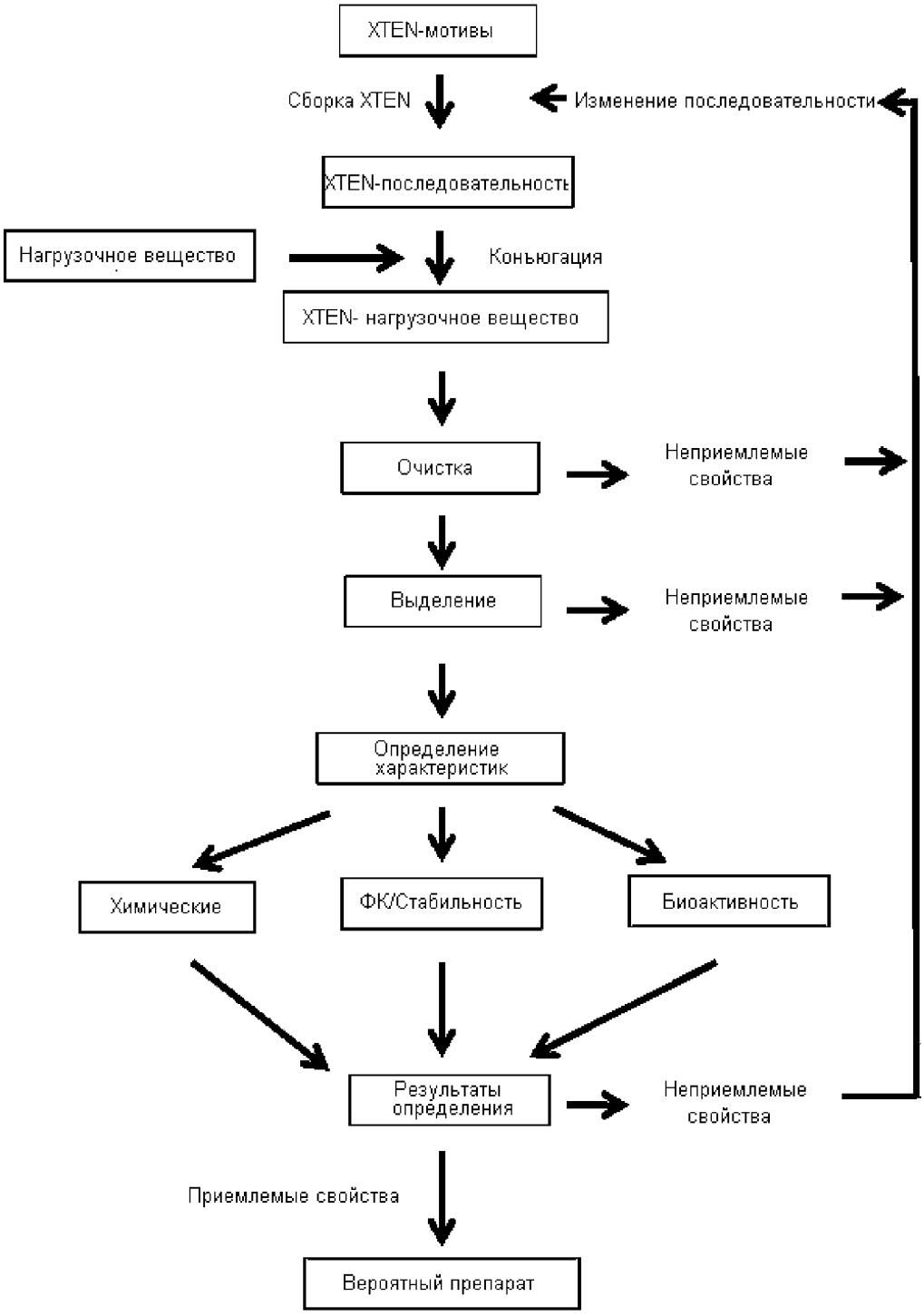
ФИГ. **37**


Правила конструирования
Сегменты XTEN
Скрининг экспрессии
Анализ последовательности
Полноразмерные XTEN
Экспрессия
Очистка
Растворимость
Стабильность
Выбранные XTEN
Фармакокинетика
Библиотека мотивов
Сборка
Полноразмерные XTEN
Анализы in vitro
Выбранные XTEN

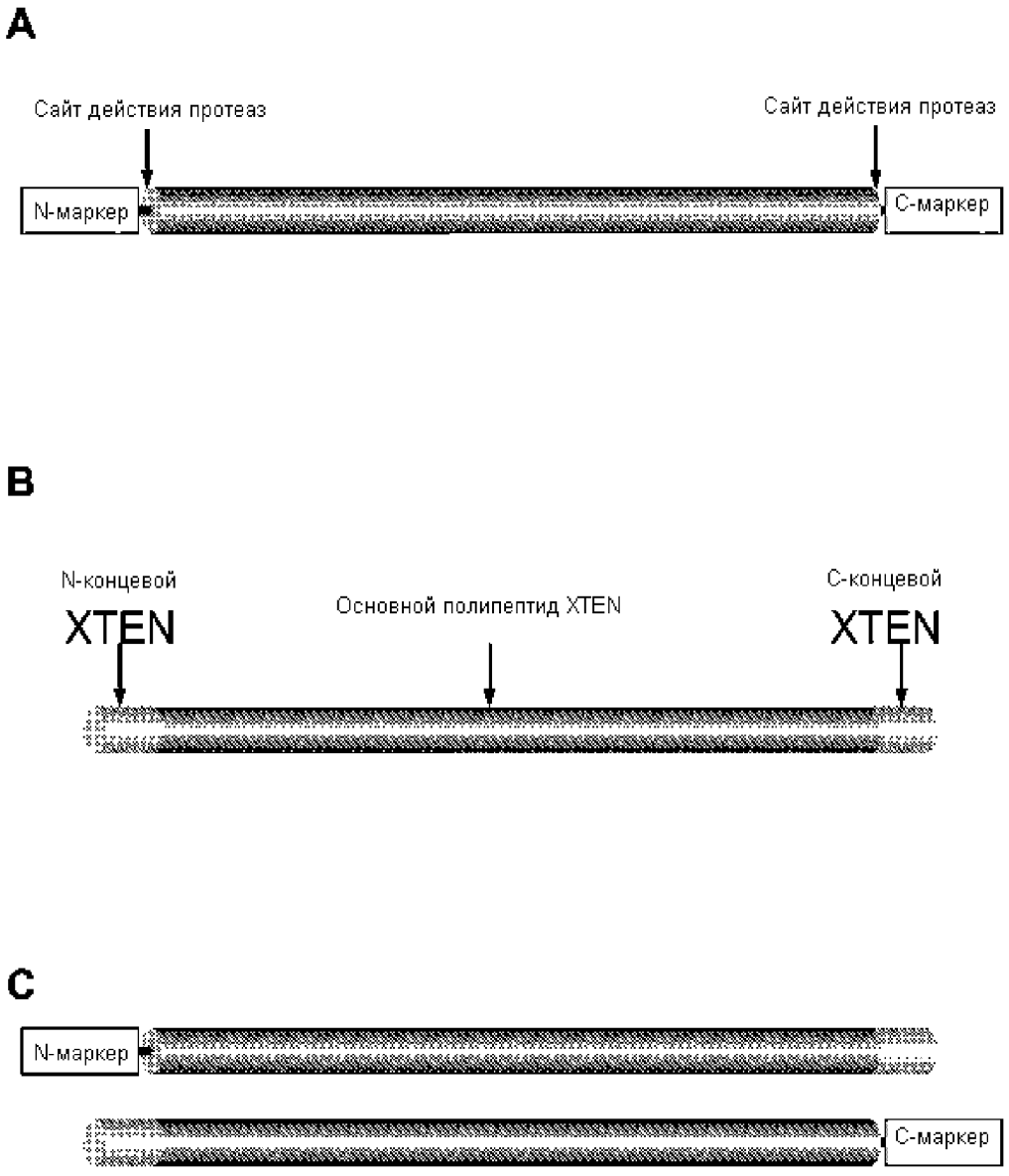
ФИГ. 38


501
Гибридизация синтетических олигонуклеотидов
BbsI KpnI
502
P
P
503
Лигирование
Очистка гель-электрофорезом
504
505
XTEN12
XTEN12
XTEN12
Клонирование в лямбда-векторе
BsaI
BbsI KpnI
CBD
XTEN864
GFP
506
504
507 508
BbsI/HindIII расщепление для удаления
фрагментов 507, 508 и стоп-кодона;
Клонирование в векторе, расщепленном BbsI/HindII
BsaI
500
XTEN864

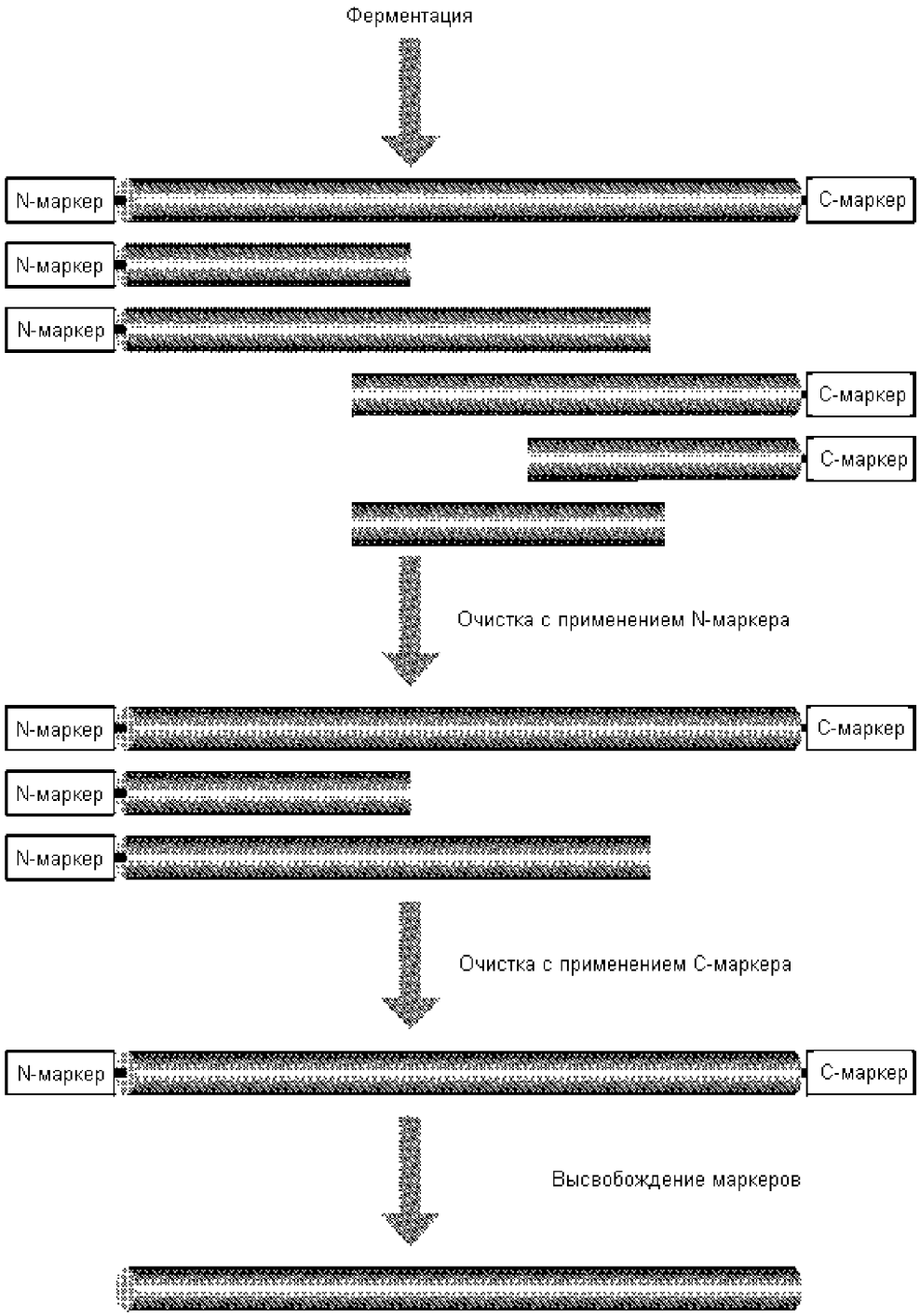
ФИГ. **39**


XTEN-мотивы
Сборка XTEN
Изменение последовательности
XTEN-последовательность
Нагрузочное вещество
Конъюгация
XTEN- нагрузочное вещество
Очистка
Неприемлемые свойства
Выделение
Неприемлемые свойства
Определение характеристик
Химические
ФК/Стабильность
Биоактивность
Результаты определения
Неприемлемые свойства
Приемлемые свойства
Вероятный препарат

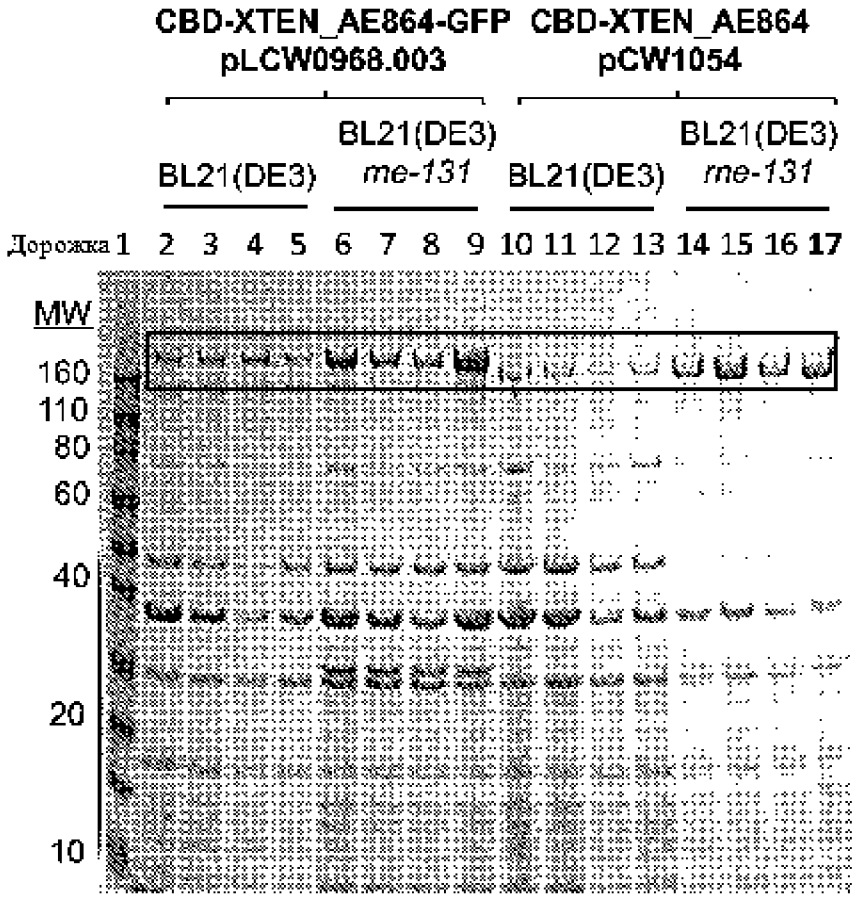
ФИГ. 40


A
Сайт действия протеаз
Сайт действия протеаз
N-маркер
C-маркер
B
N-концевой
XTEN
Основной полипептид XTEN
C-концевой
XTEN
C
N-маркер
C-маркер

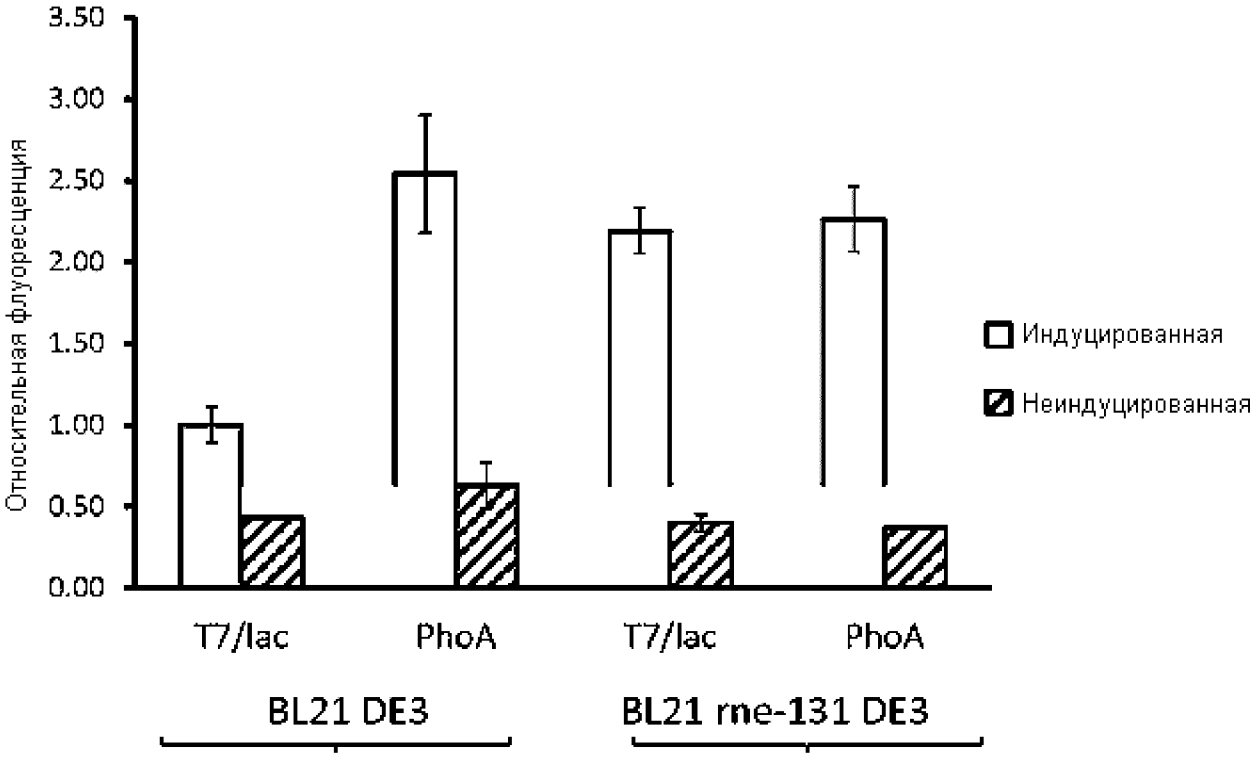
ФИГ. 41


Ферментация
N-маркер
C-маркер
N-маркер
N-маркер
C-маркер
C-маркер
Очистка с применением N-маркера
N-маркер
C-маркер
N-маркер
N-маркер
Очистка с применением C-маркера
N-маркер
C-маркер
Высвобождение маркеров

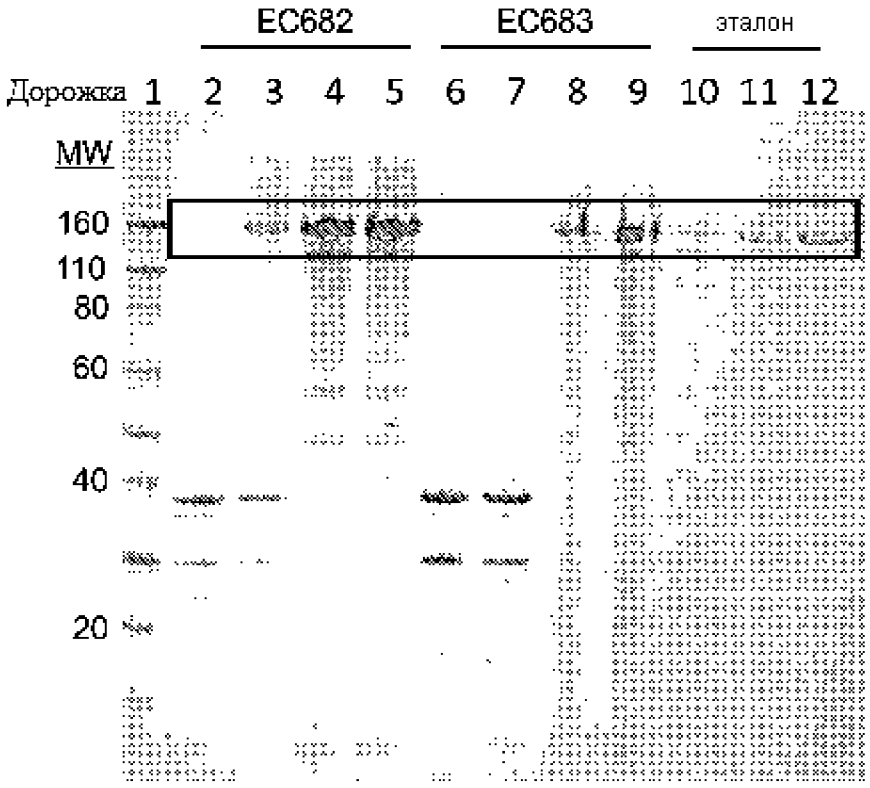
ФИГ. **42**


CBD-XTEN_AE864-GFP
pLCW0968.003
CBD-XTEN_AE864
pCW1054
BL21(DE3)
BL21(DE3)
me-131
BL21(DE3)
BL21(DE3)
me-131
Дорожка 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
MW
160
110
80
60
40
20
10

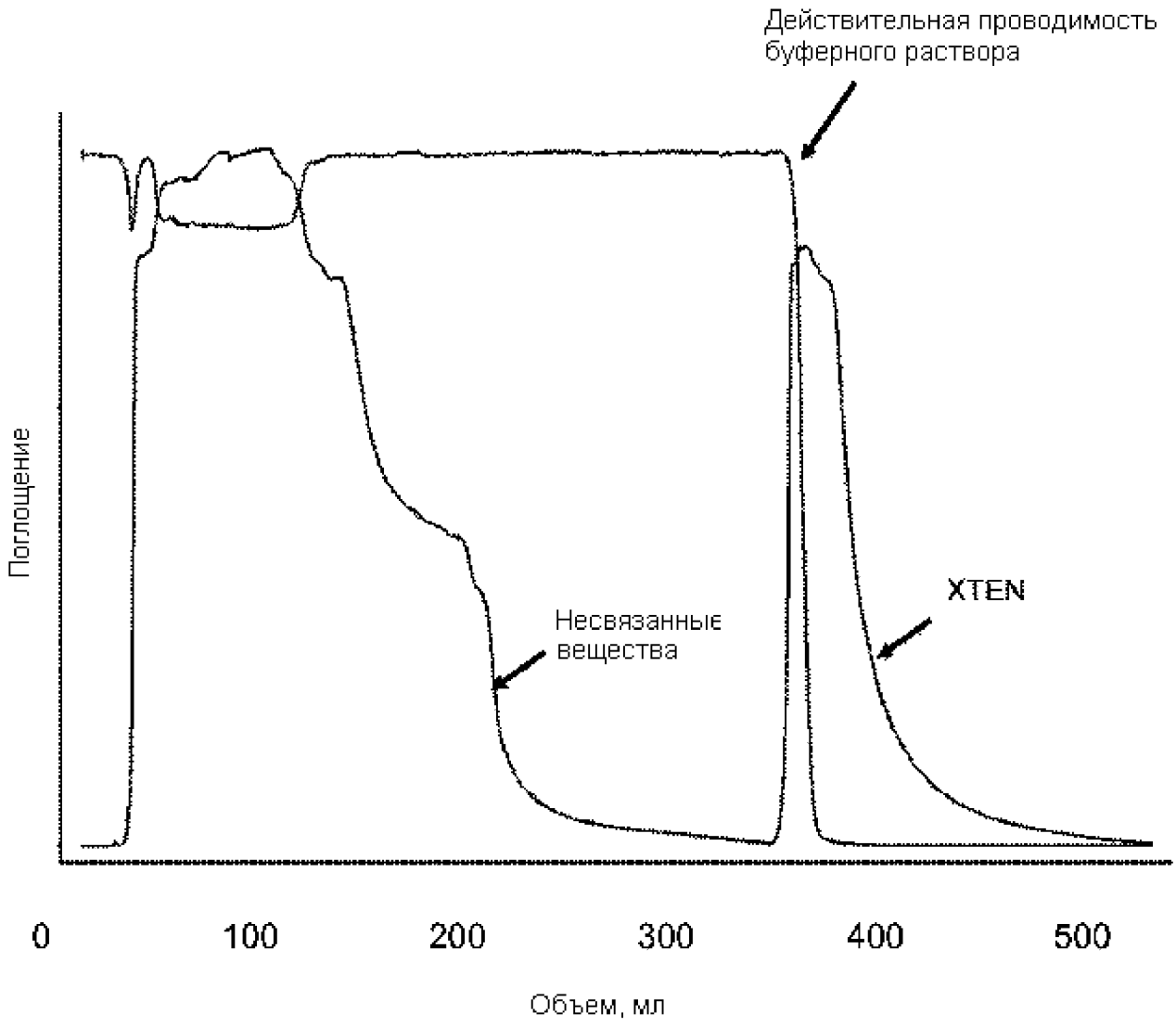
ФИГ. **43**


3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
Относительная флуоресценция
T7/lac
PhoA
T7/lac
PhoA
BL21 DE3
BL21 rne-131 DE3
Индуцированная
Неиндуцированная

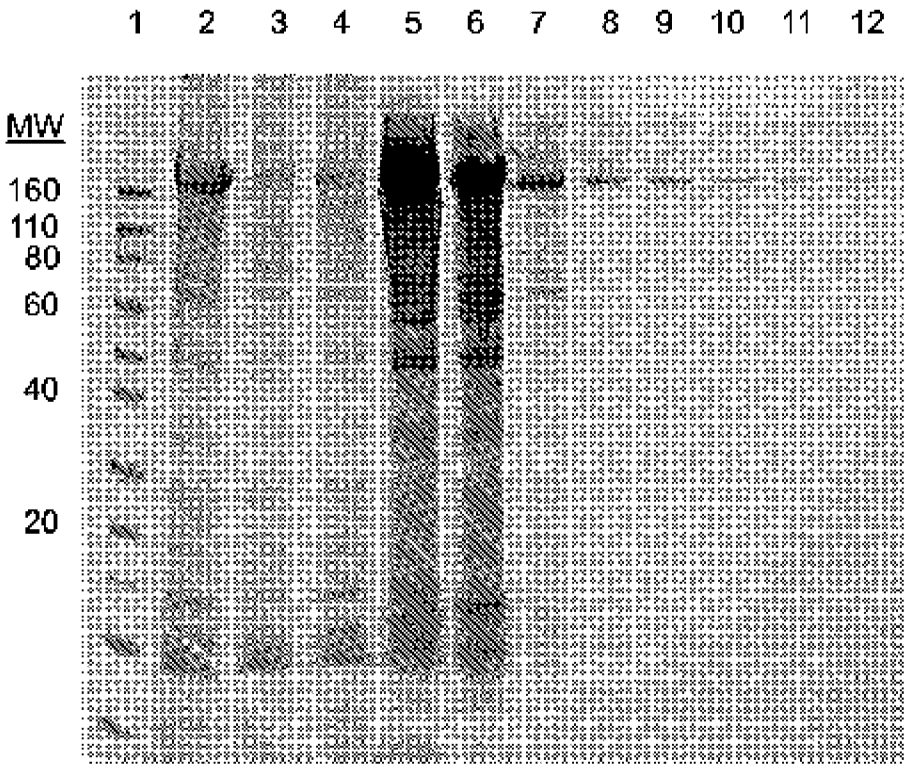
ФИГ. **44**


EC682
EC683
эталон
Дорожка 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
MW
160
110
80
60
40
20

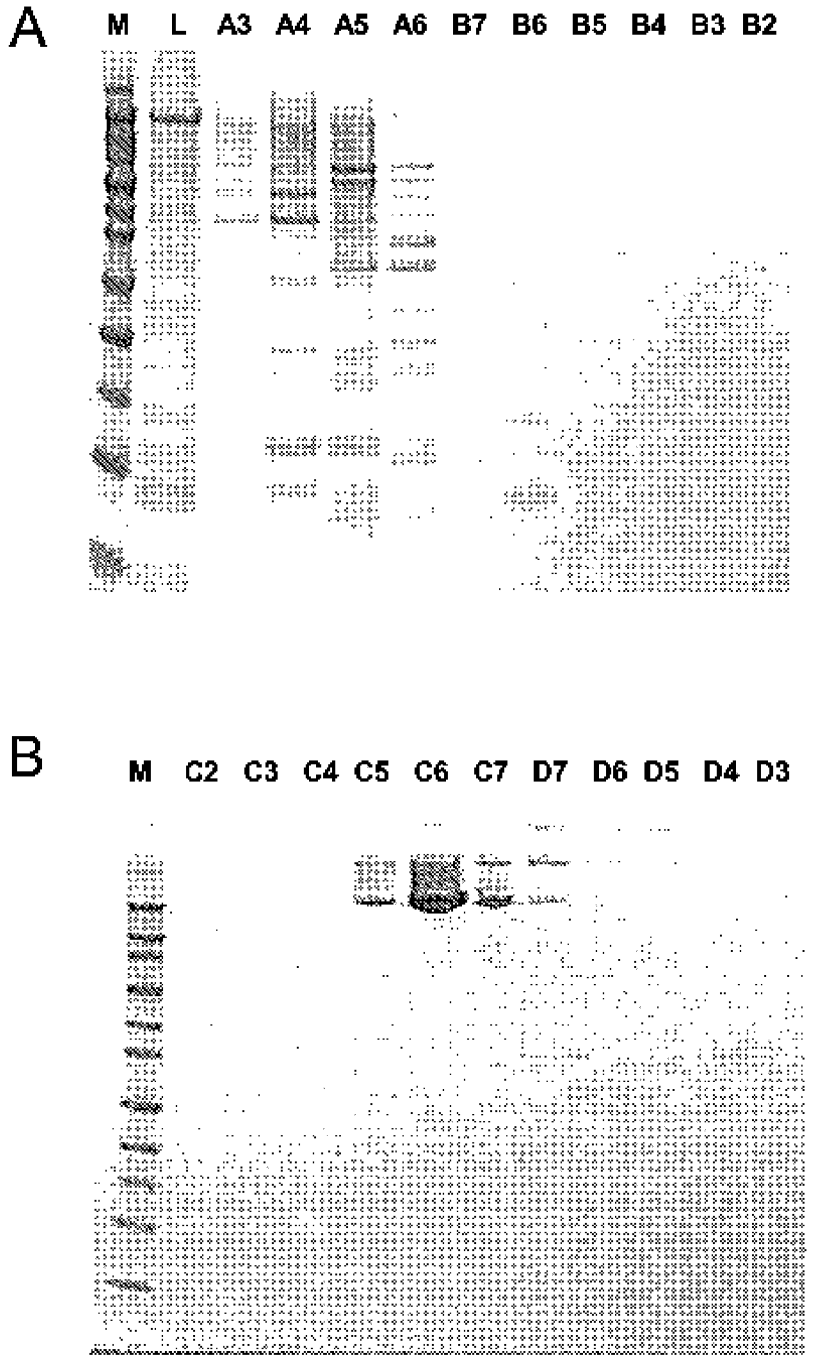
ФИГ. **45**


Действительная проводимость буферного раствора
Поглощение
Несвязанные вещества
XTEN
0
100
200
300
400
500
Объем, мл

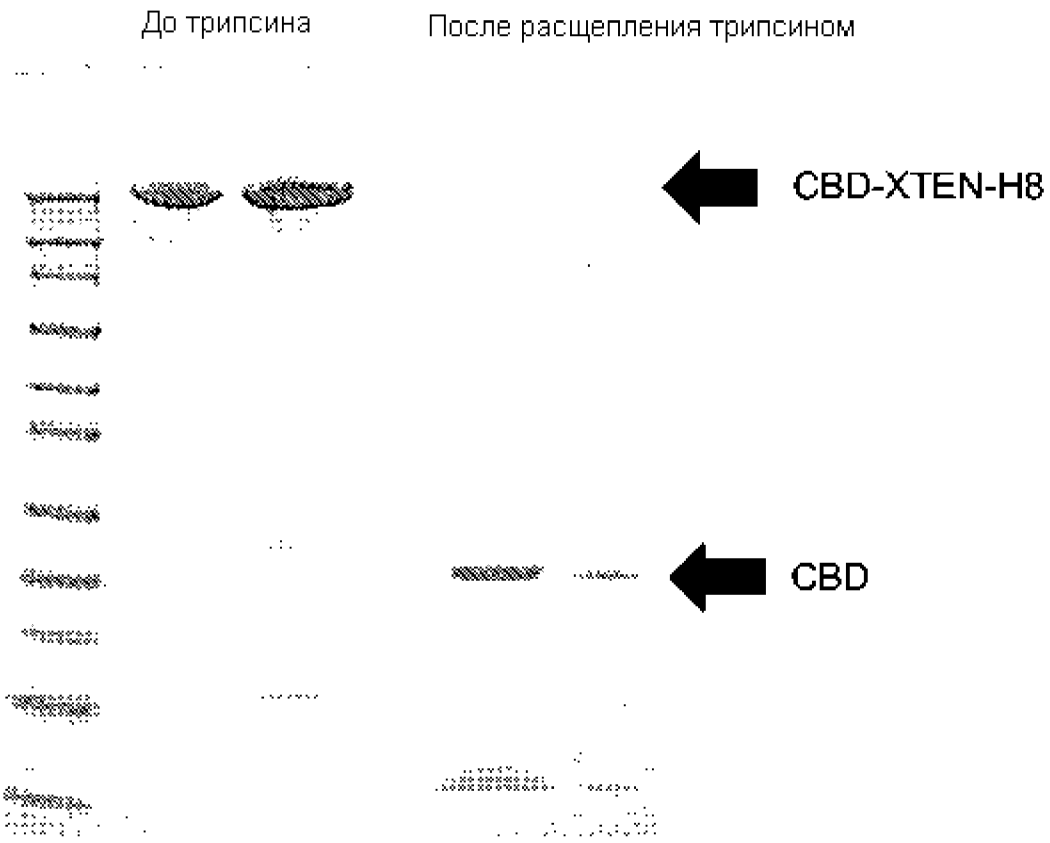
ФИГ. **46**



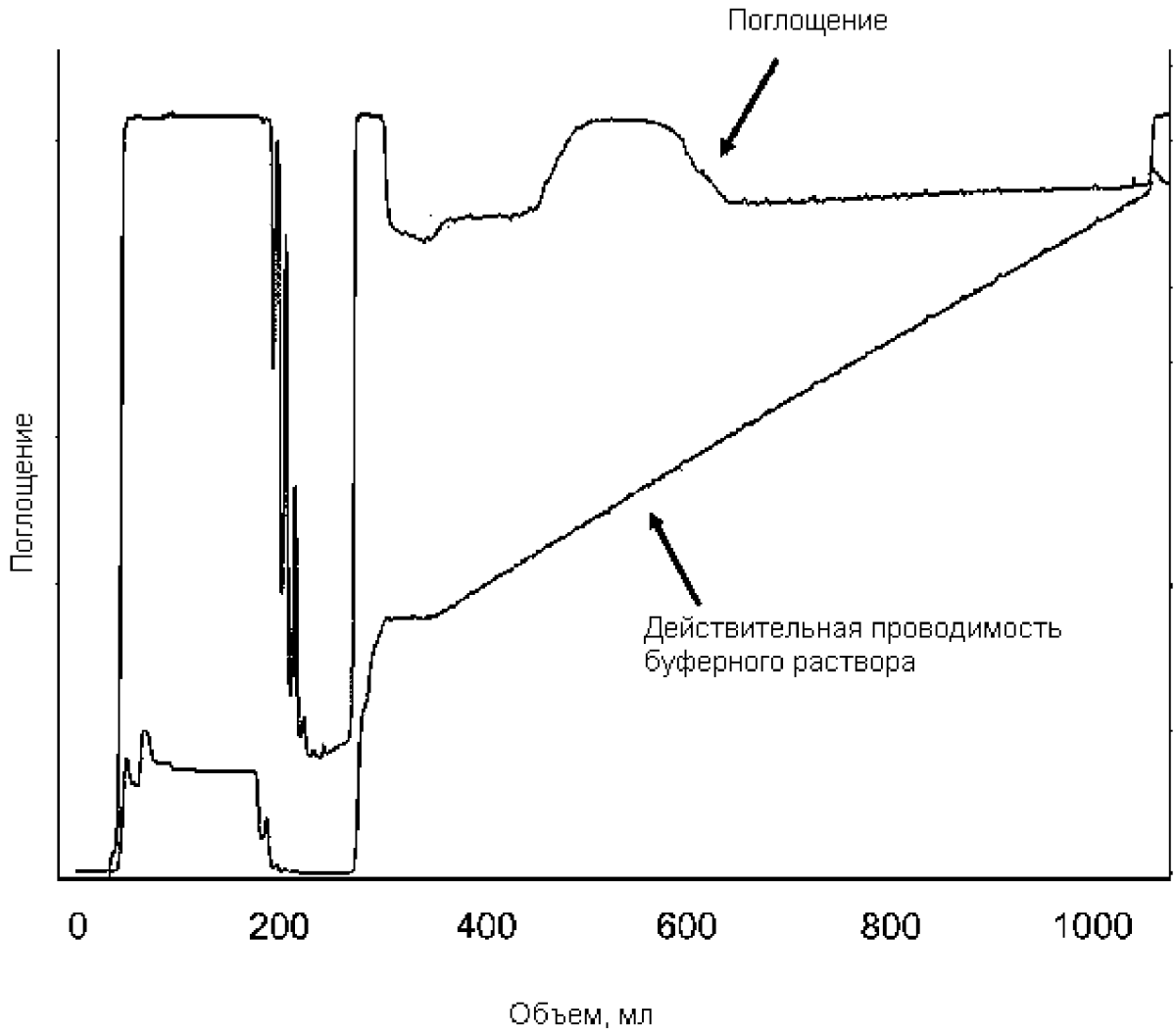
ФИГ. **47**



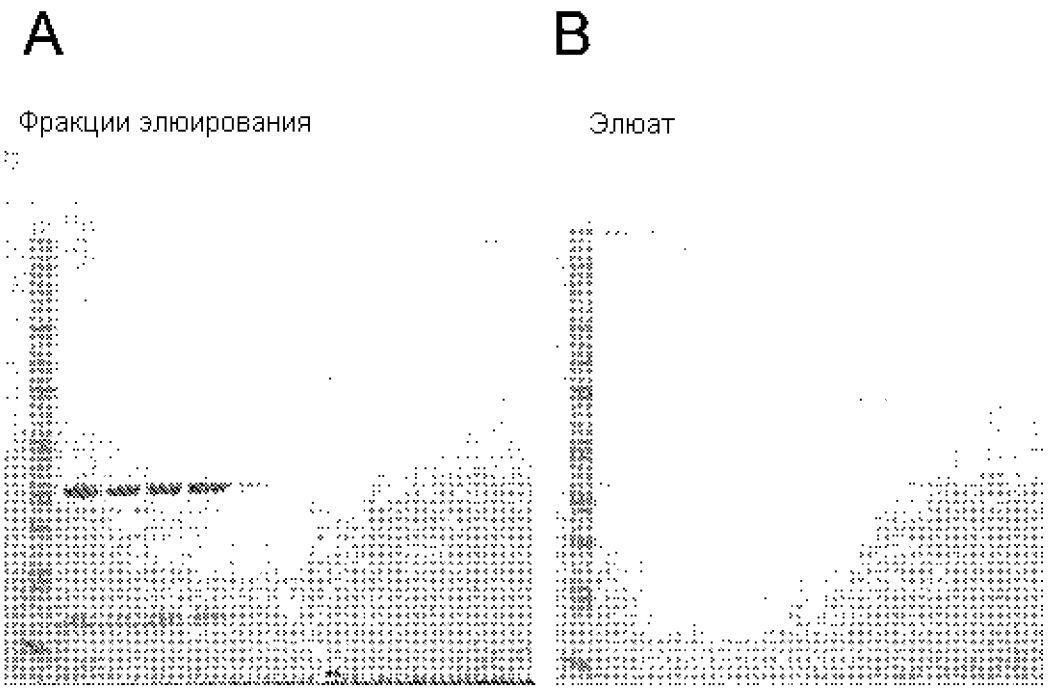
ФИГ. 48

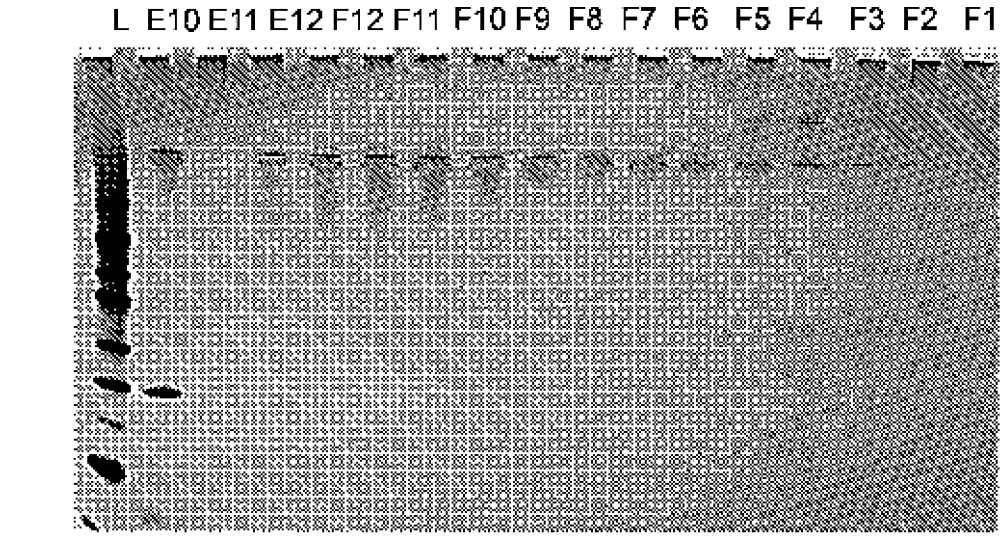


ФИГ. **49**

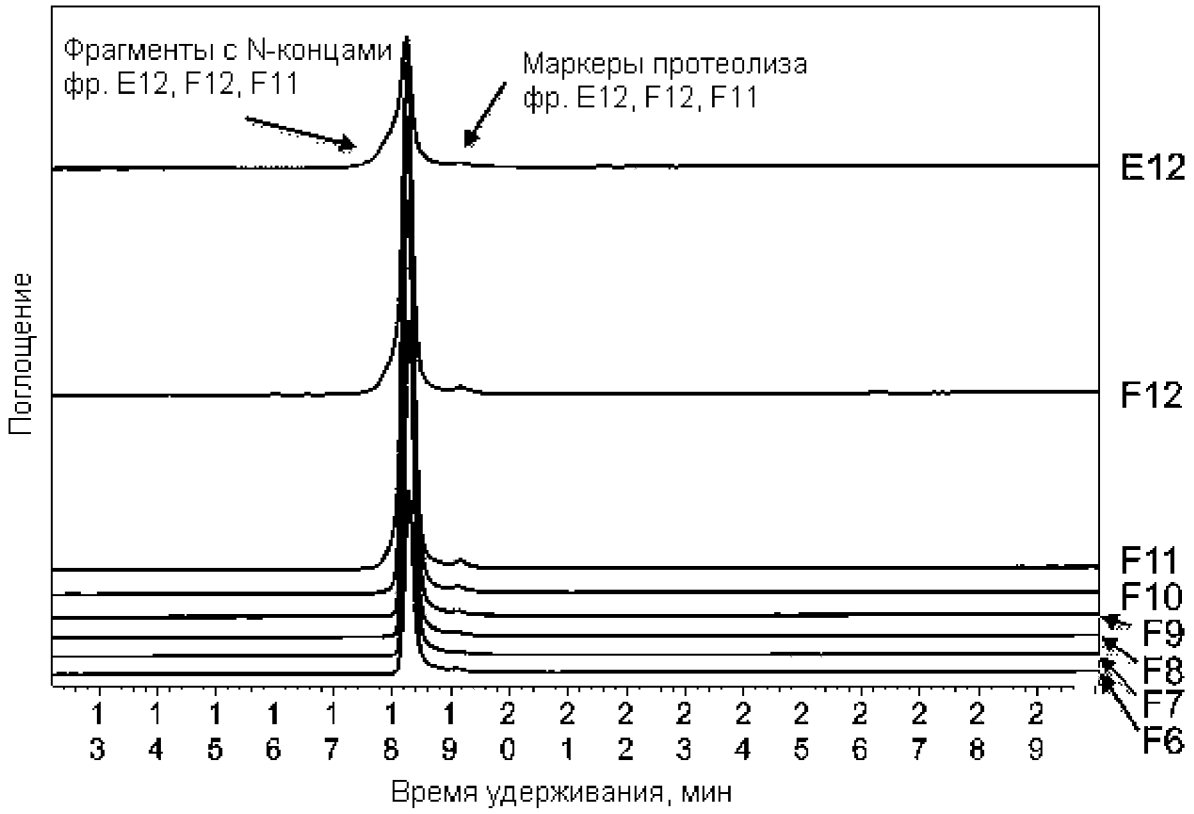

Поглощение
Поглощение
Действительная проводимость буферного раствора
Поглощение
0
200
400
600
800
1000
Объем, мл

ФИГ. **50**

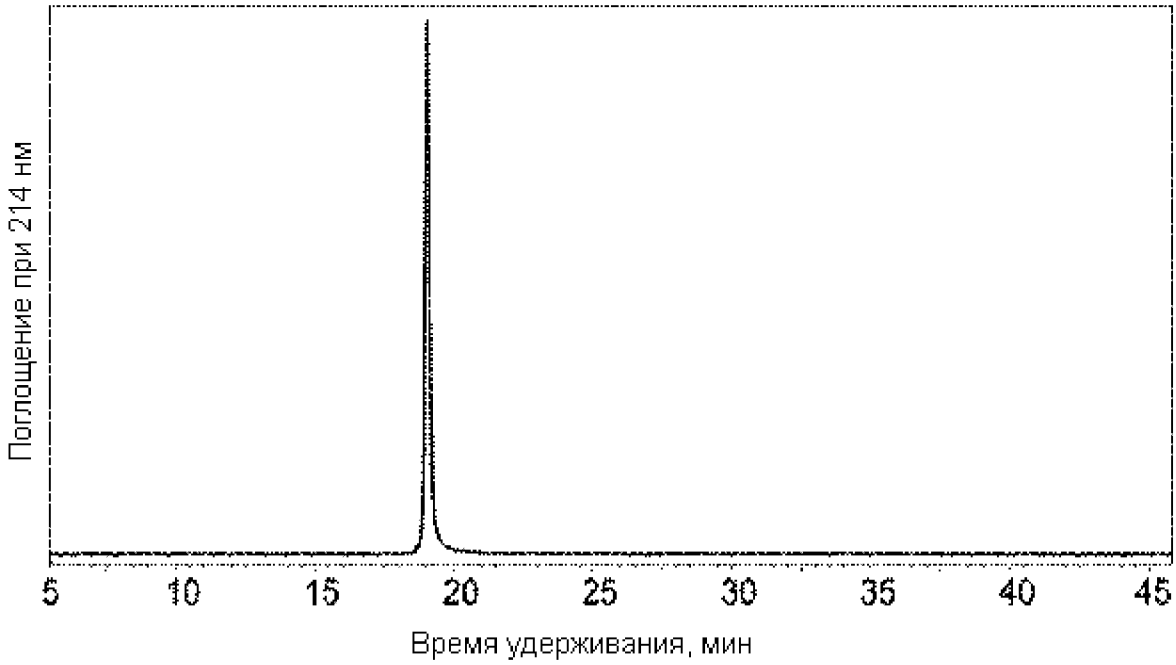

A
Фракции элюирования
B
Элюат


C
L E10 E11 E12 F12 F11 F10 F9 F8 F7 F6 F5 F4 F3 F2 F1

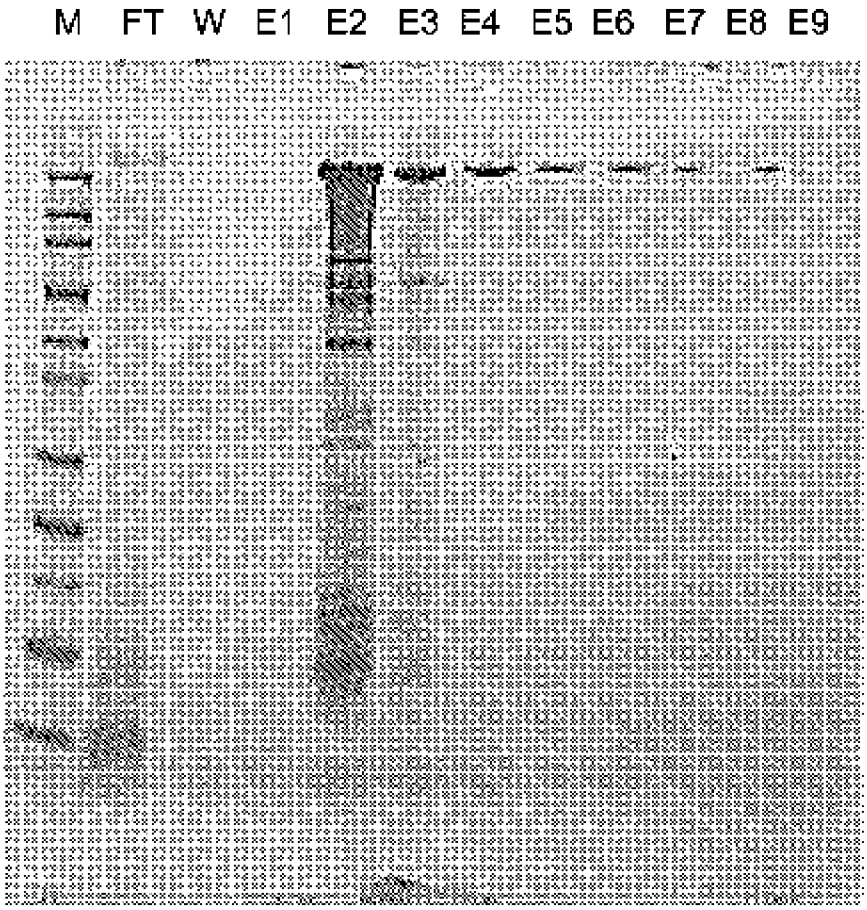
ФИГ. **51**


Фрагменты с N-концами
фр. E12, F12, F11
Маркеры протеолиза
фр. E12, F12, F11
E12
F12
F11
F10
F9
F8
F7
F6
Поглощение
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
Время удерживания, мин

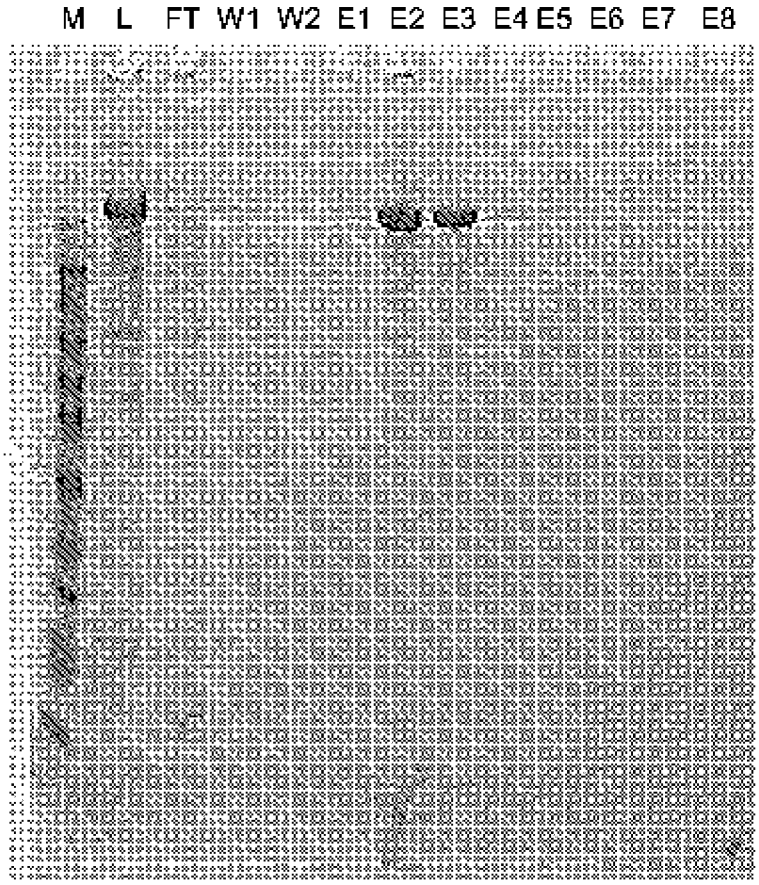
ФИГ. **52**


Поглощение при 214 нм
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Время удерживания, мин

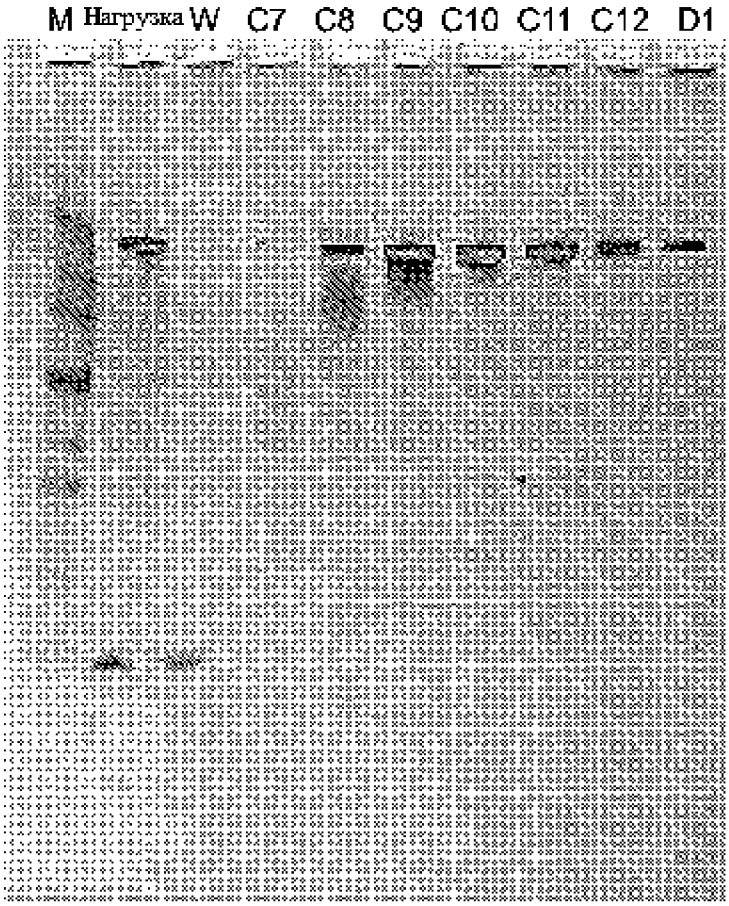
ФИГ. **53**



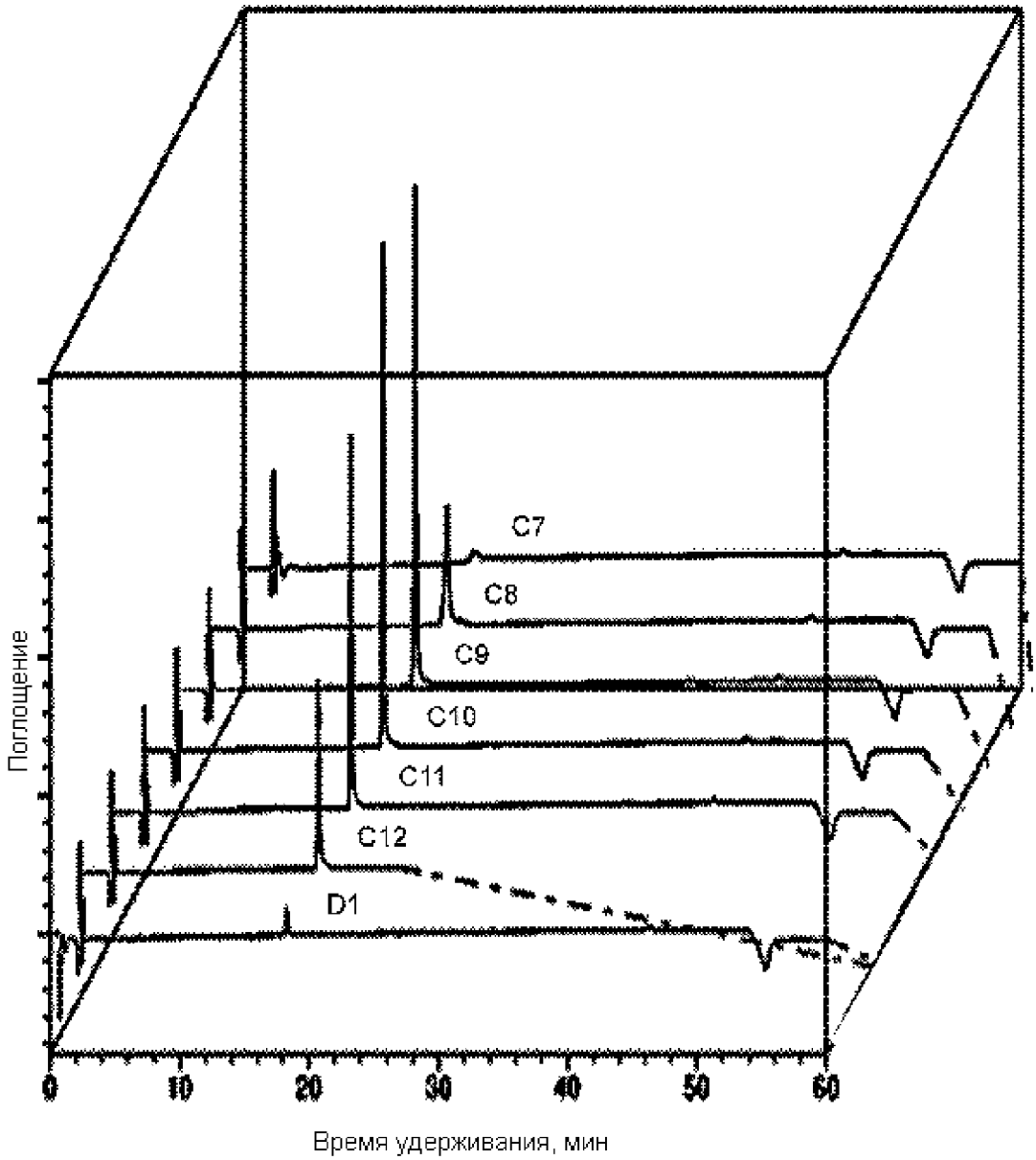
ФИГ. **54**



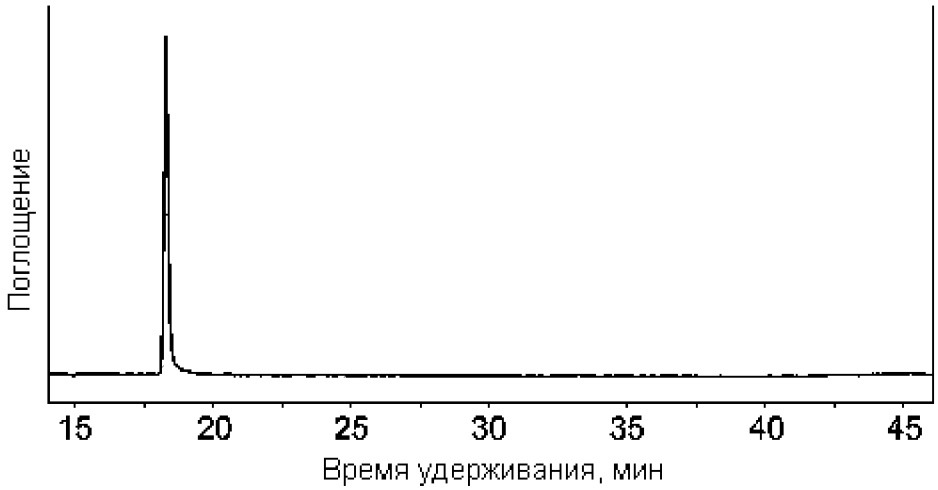
ФИГ. **55**



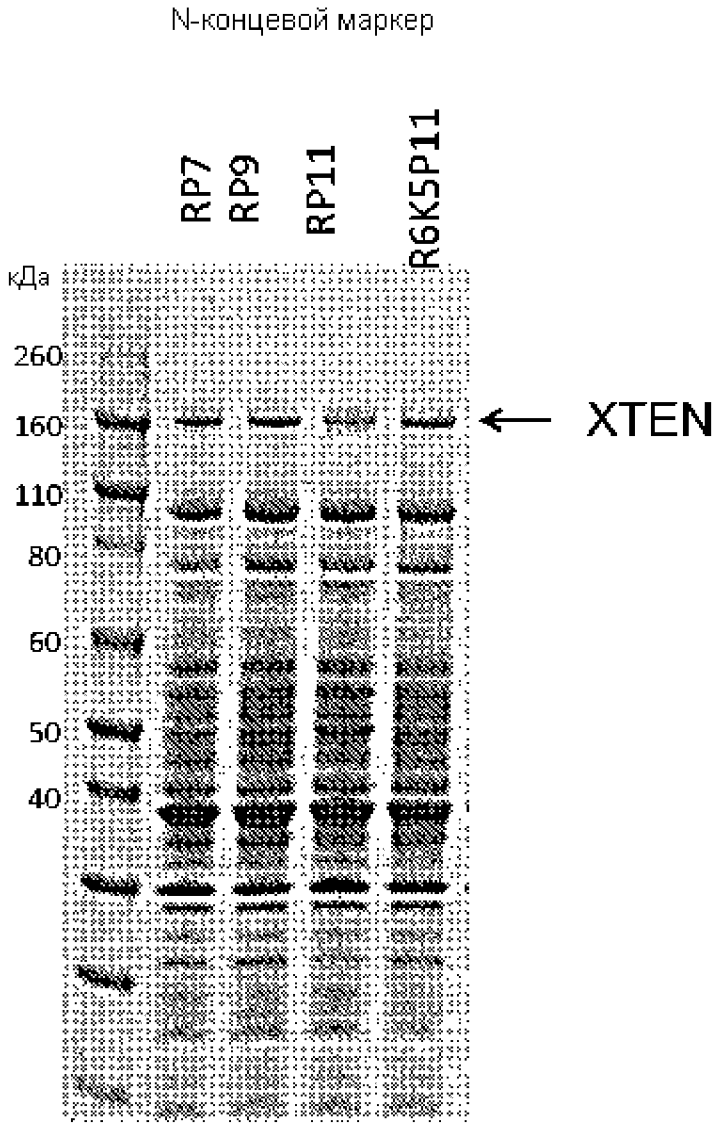
ФИГ. **56**


C7
C8
C9
C10
C11
C12
D1
Поглощение
0
10
20
30
40
50
60
Время удерживания, мин

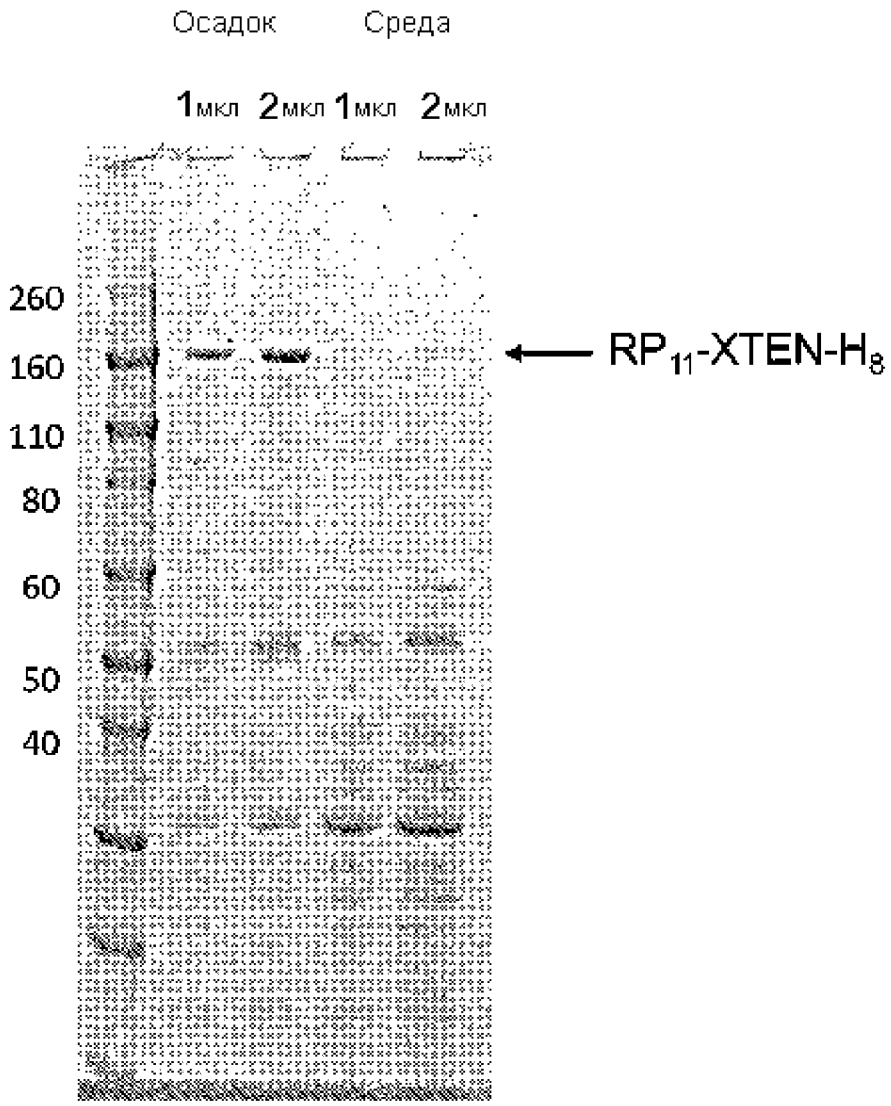
ФИГ. 57



ФИГ. **58**


N-концевой маркер
RP7
RP9
RP11
R6K5P11
кДа
260
160
110
80
60
50
40
XTEN

ФИГ. **59**

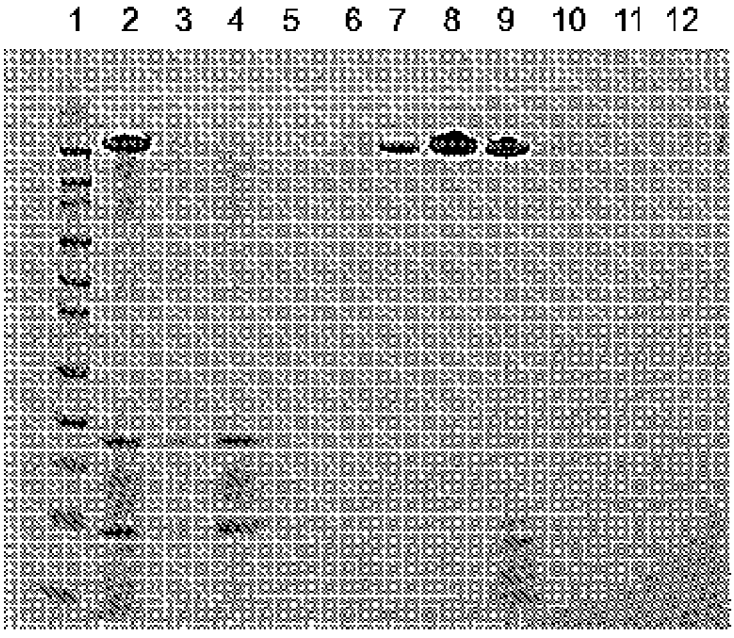

Осадок
Среда
1мкл
2мкл
1мкл
2мкл
260
160
110
80
60
50
40
RP11-XTEN-H8

ФИГ. **60**

Дорожка 1	Стандарты молекулярного веса
Дорожка 2	Нагрузка колонки с носителем MacroCap SP
Дорожка 3	Начальный элюат на выходе из колонки с носителем MacroCap SP
Дорожка 4	Раствор для вытеснения из колонки с носителем MacroCap SP
Дорожка 5	Раствор для промывки носителя MacroCap SP
Дорожка 6	Элюат 1 из носителя MacroCap SP
Дорожка 7	Элюат 2 из носителя MacroCap SP
Дорожка 8	Элюат 3 из носителя MacroCap SP
Дорожка 9	Элюат 4 из носителя MacroCap SP
Дорожка 10	Элюат 5 из носителя MacroCap SP
Дорожка 11	Элюат 6 из носителя MacroCap SP

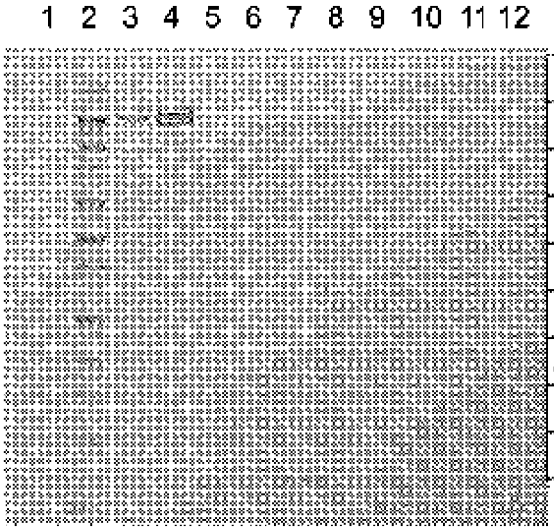
ФИГ. **61**

Дорожка 1	Стандарты молекулярного веса
Дорожка 2	Нагрузка IMAC-колонки
Дорожка 3	Начальный элюат на выходе из IMAC-колонки
Дорожка 4	Раствор для вытеснения из IMAC-колонки
Дорожка 5	Раствор для промывки IMAC-колонки
Дорожка 6	Элюат 1 из IMAC-колонки
Дорожка 7	Элюат 2 из IMAC-колонки SP
Дорожка 8	Элюат 3 из IMAC-колонки SP
Дорожка 9	Элюат 4 из IMAC-колонки SP
Дорожка 10	Элюат 5 из IMAC-колонки SP
Дорожка 11	Элюат 6 из IMAC-колонки SP
Дорожка 12	Элюат 7 из IMAC-колонки SP



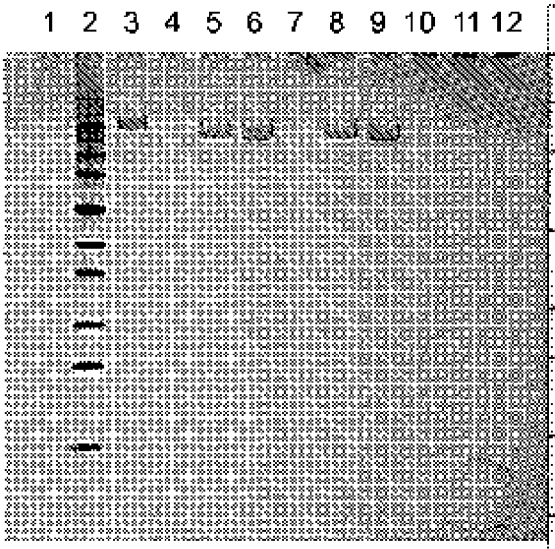
ФИГ. **62**

A



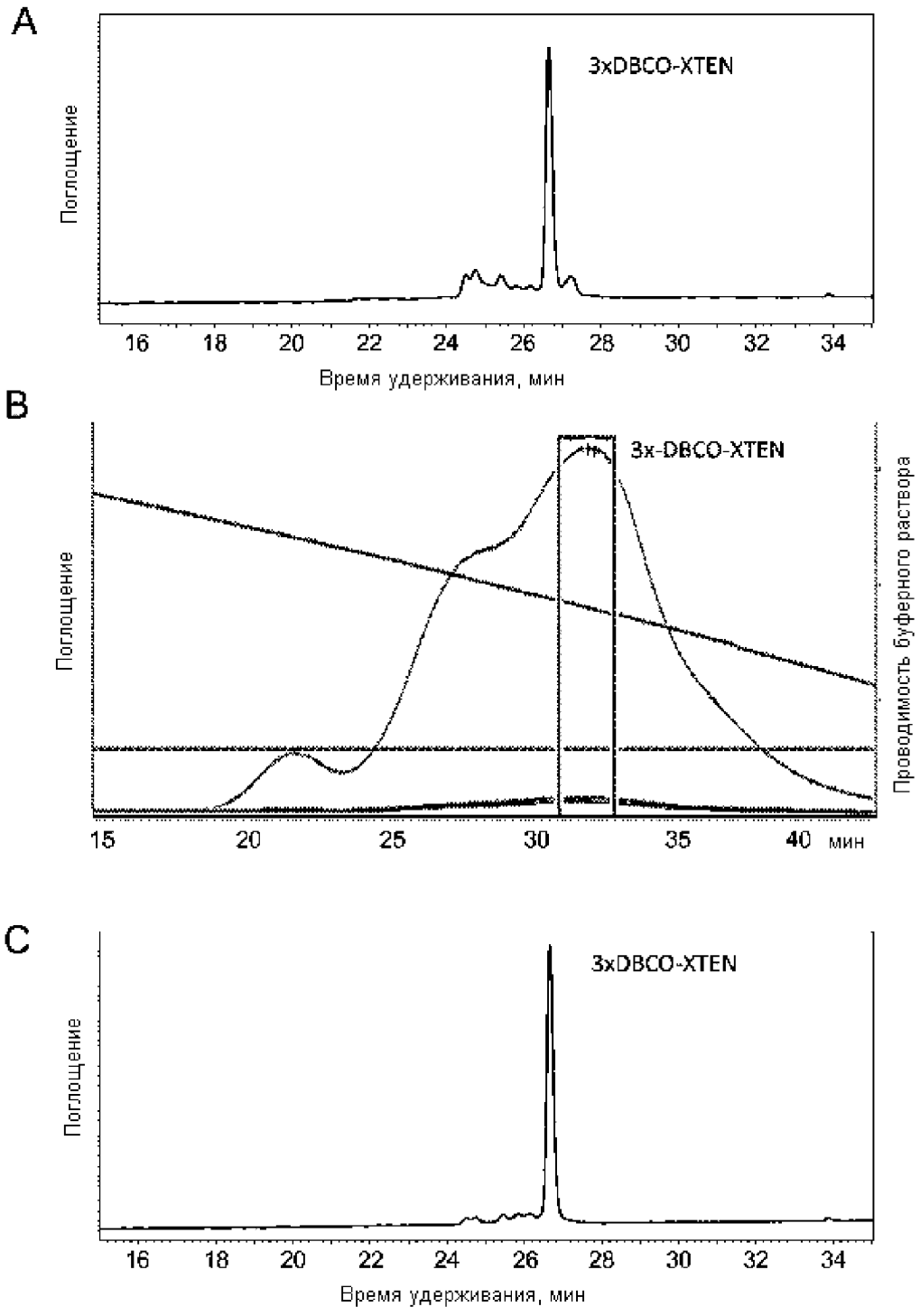
Дорожка 2	Стандарты молекулярного веса
Дорожка 3	2 мкл пула элюатов из IMAC-колонки
Дорожка 4	10 мкл пула элюатов из IMAC-колонки
Дорожка 5	Пустая дорожка
Дорожка 6	2 мкл пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:200
Дорожка 7	10 мкл пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:200
Дорожка 8	Пустая дорожка
Дорожка 9	2 мкл пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:500
Дорожка 10	10 мкл пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:500

B



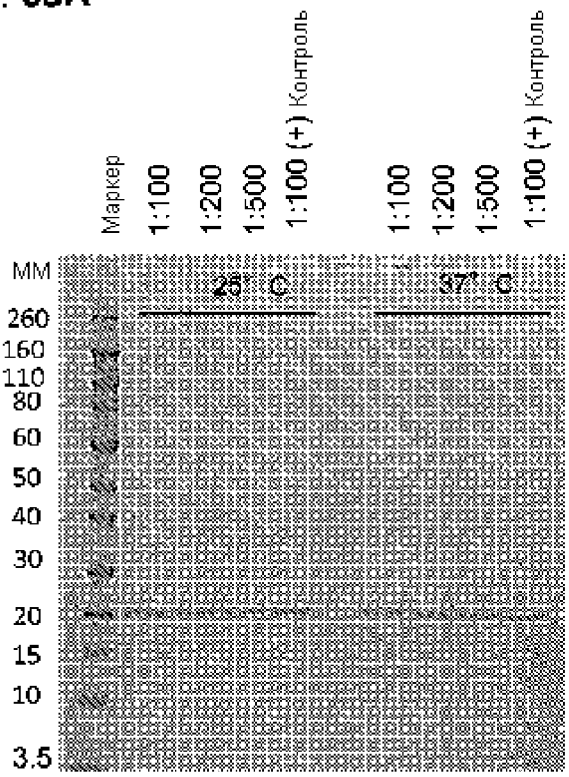
Дорожка 2	Стандарты молекулярного веса
Дорожка 3	2 мкл разбавленного 1:20 пула элюатов из IMAC-колонки
Дорожка 4	Пустая дорожка
Дорожка 5	5 мкл разбавленного 1:5 пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:200
Дорожка 6	10 мкл разбавленного 1:5 пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:200
Дорожка 7	Пустая дорожка
Дорожка 8	5 мкл разбавленного 1:5 пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:500
Дорожка 9	10 мкл разбавленного 1:5 пула элюатов из IMAC-колонки, расщепленного раствором трипсина 1:500
Дорожка 10	Пустая дорожка

ФИГ. **63**

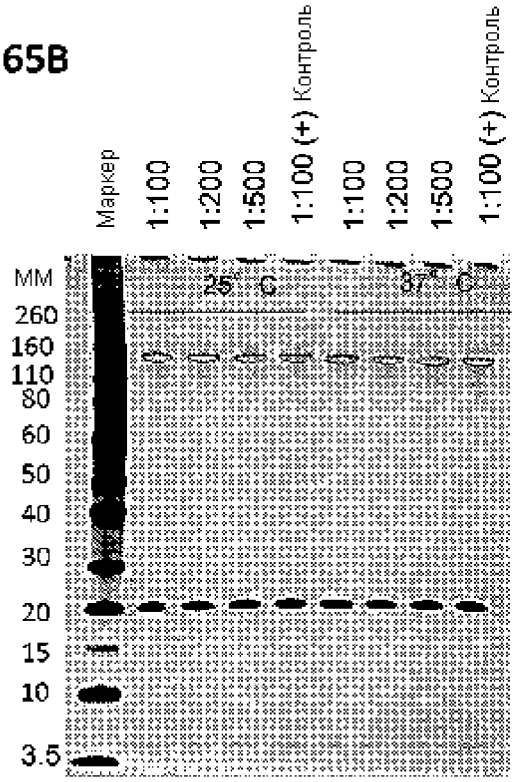

A
3xDBCO-XTEN
Поглощение
16 18 20 22 24 26 28 30 32 34
Время удерживания, мин
B
3x-DBCO-XTEN
Поглощение
Проводимость буферного раствора
15 20 25 30 35 40 мин
C
3xDBCO-XTEN
Поглощение
16 18 20 22 24 26 28 30 32 34
Время удерживания, мин

ФИГ. **64**

ФИГ. **65A**

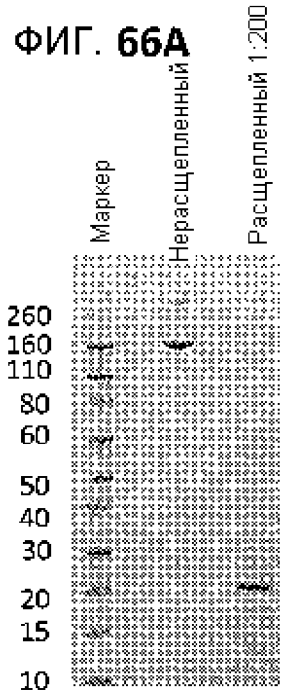


ФИГ. **65B**

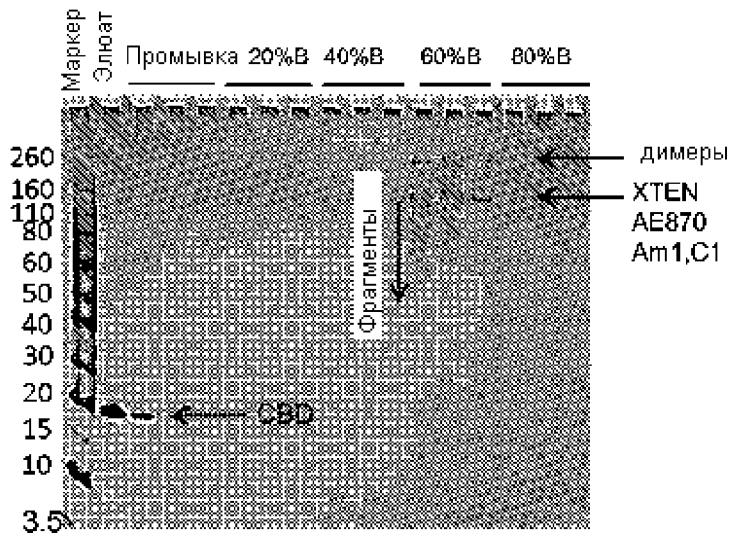


ФИГ. **65**

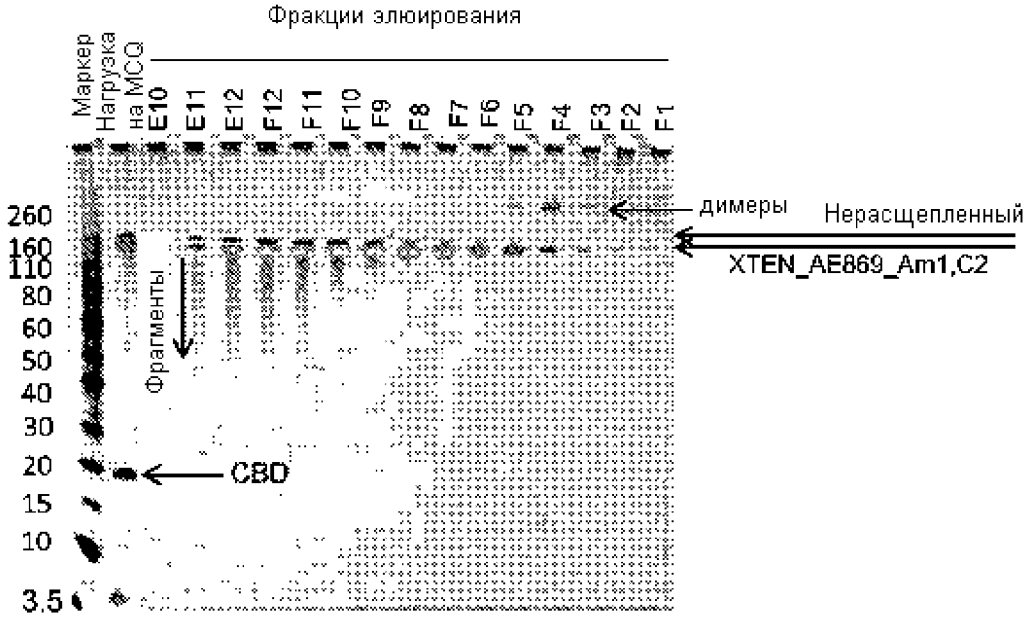
ФИГ. **66A**



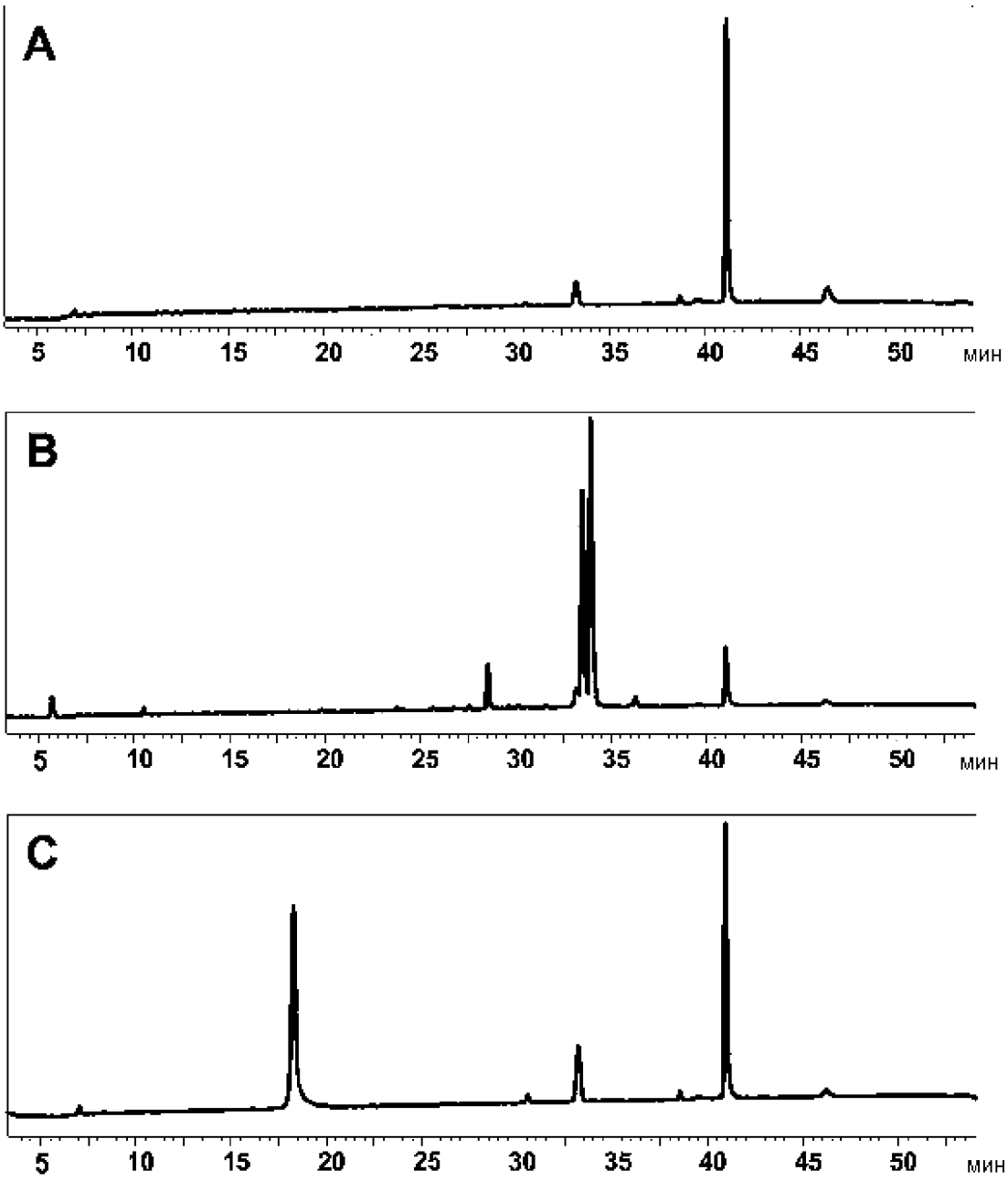
ФИГ. **66B**



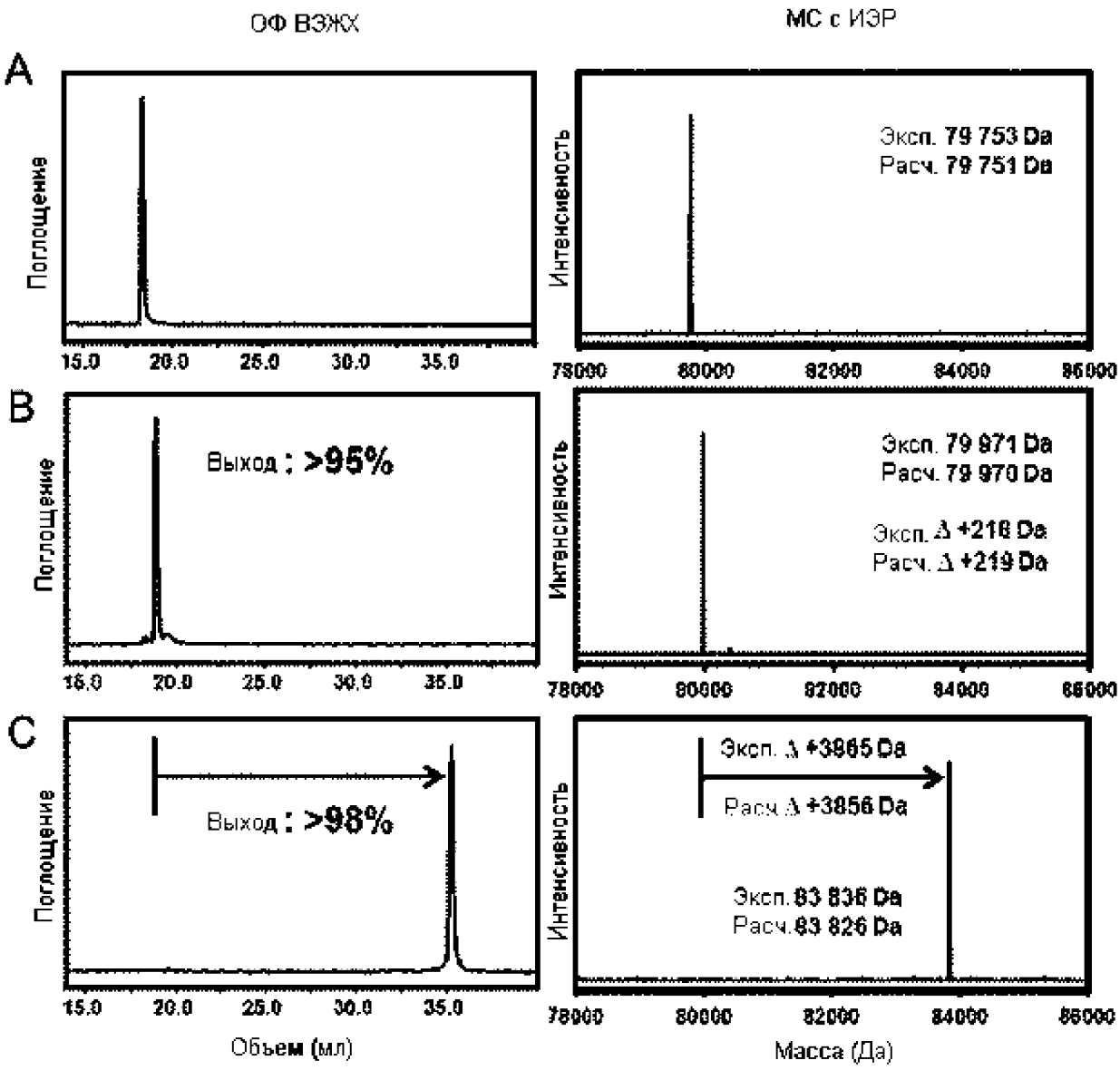
ФИГ. **66C**



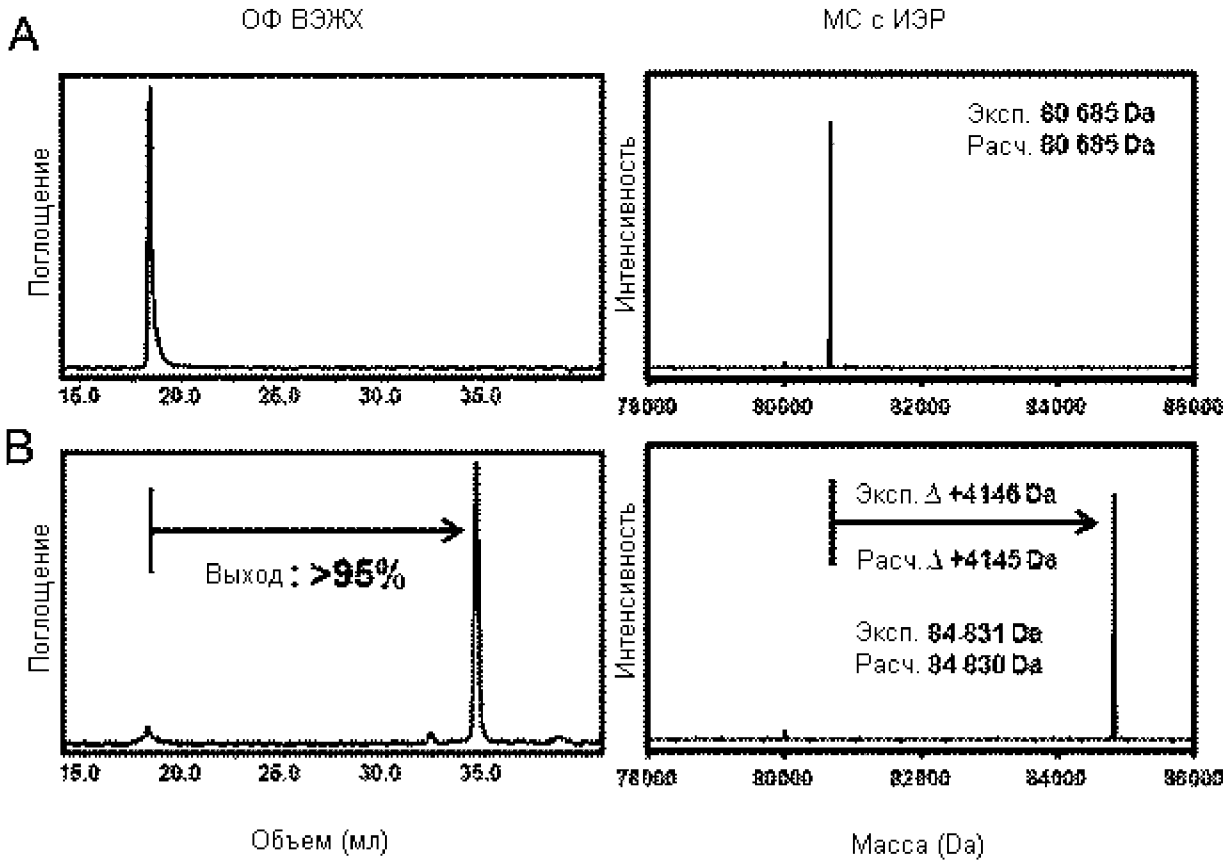
ФИГ. **66**


A
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
мин
B
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
мин
C
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
мин

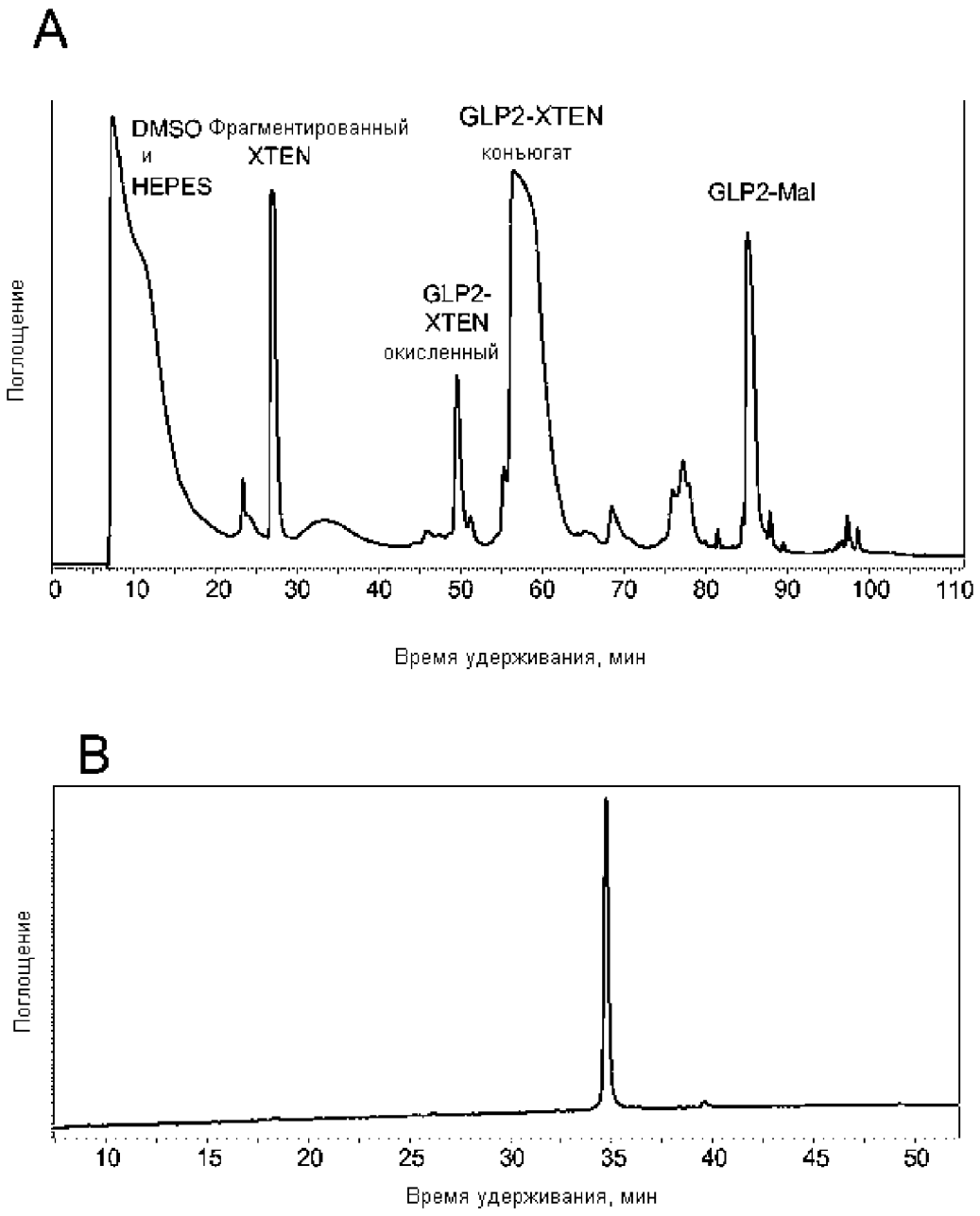
ФИГ. **67**


ОФ ВЭЖХ
МС с ИЭР
A
Поглощение
Интенсивность
Эксп. 79 753 Da
Расч. 79 751 Da
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
78000
80000
82000
84000
86000
B
Выход : >95%
Эксп. 79 971 Da
Расч. 79 970 Da
Эксп. Δ +218 Da
Расч. Δ +219 Da
C
Выход : >98%
Эксп. Δ +3865 Da
Расч. Δ +3856 Da
Эксп. 83 836 Da
Расч. 83 826 Da
Объем (мл)
Масса (Да)

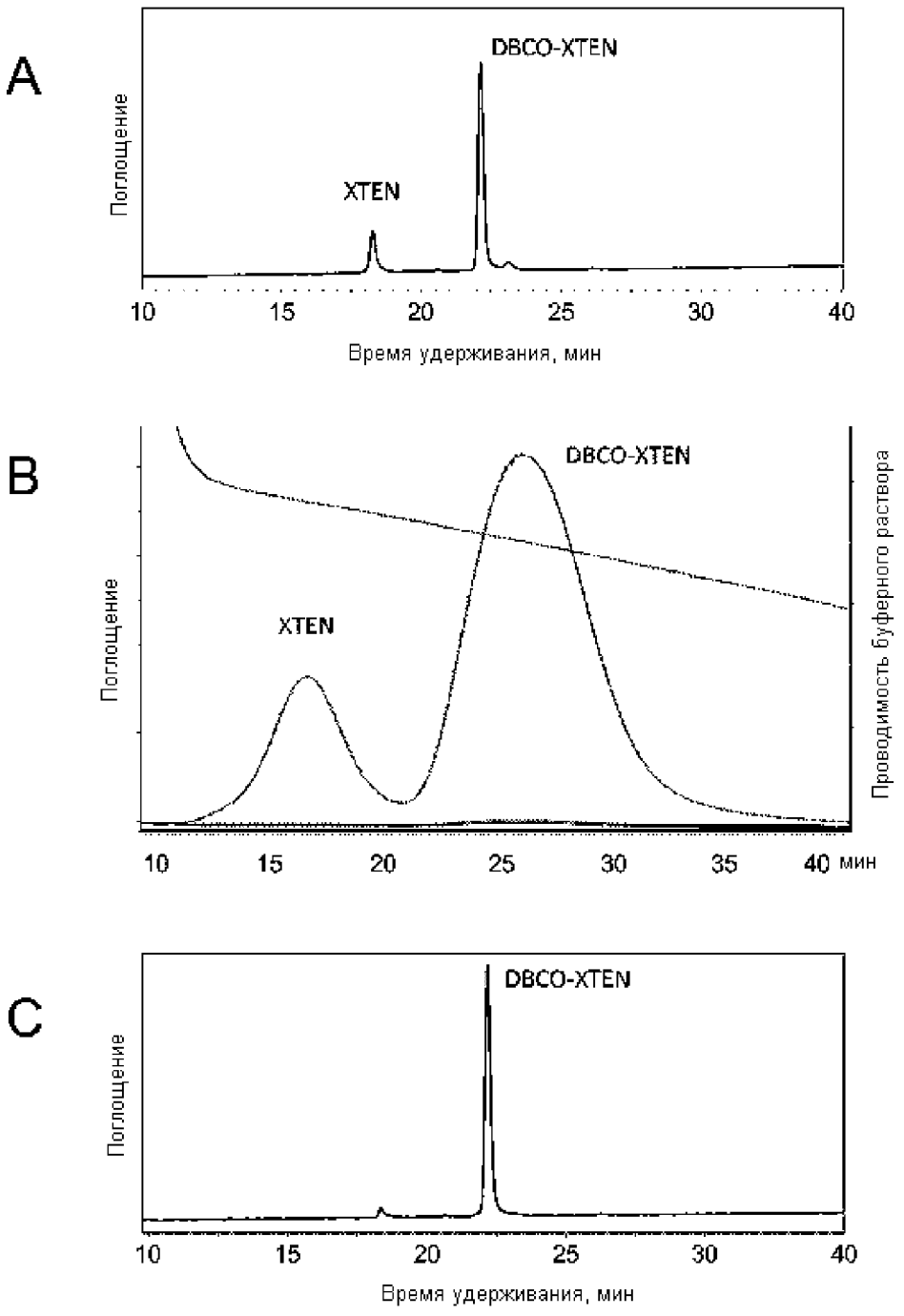
ФИГ. 68


A
ОФ ВЭЖХ
МС с ИЭР
Поглощение
Интенсивность
Эксп. 80 685 Da
Расч. 80 685 Da
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
78000
80000
82000
84000
86000
B
Поглощение
Интенсивность
Выход : >95%
Эксп. Δ +4146 Da
Расч. Δ +4145 Da
Эксп. 84 831 Da
Расч. 84 830 Da
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
78000
80000
82000
84000
86000
Объем (мл)
Масса (Da)

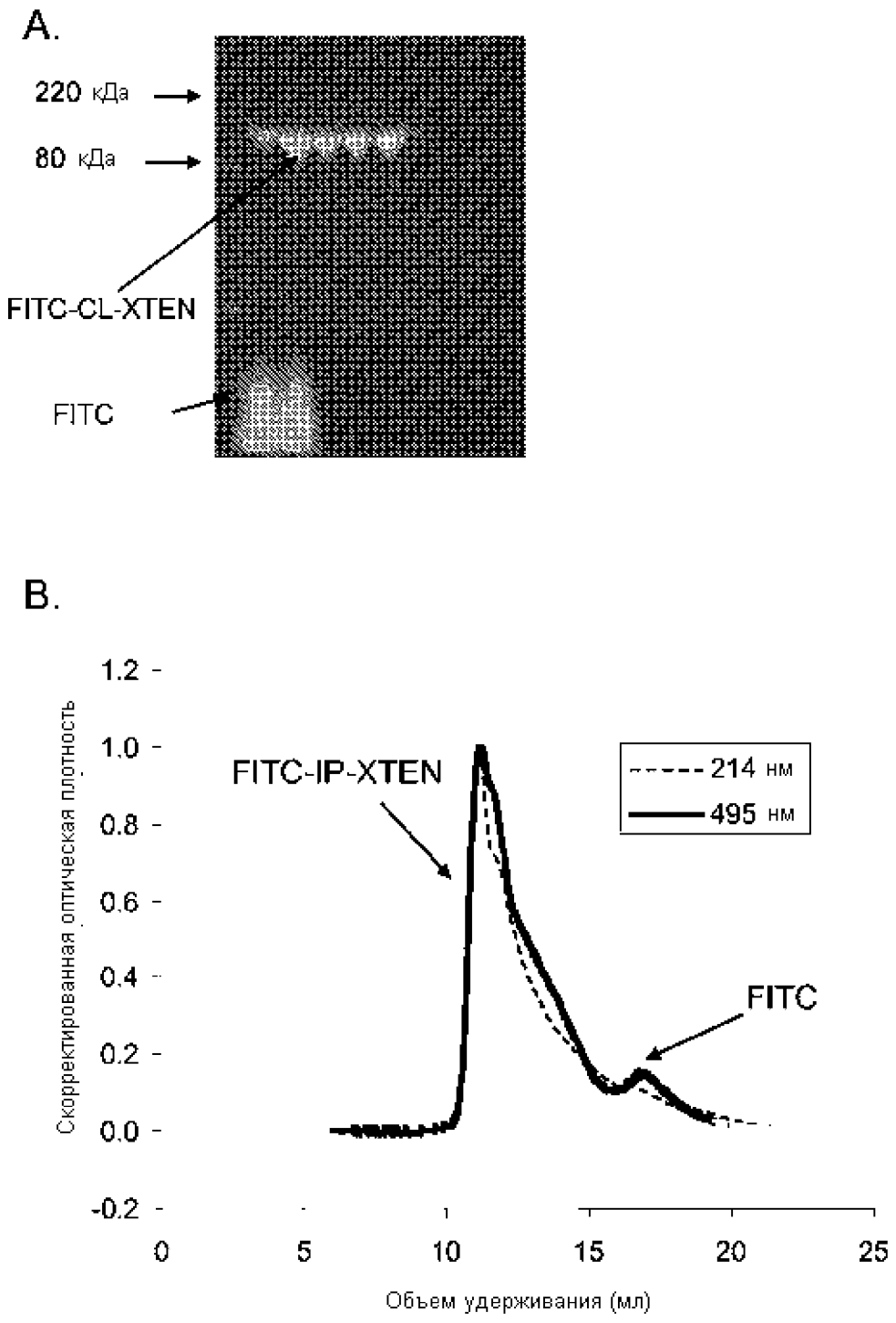
ФИГ. **69**


A
DMSO и HEPES
Фрагментированный XTEN
GLP2-XTEN конъюгат
GLP2-XTEN окисленный
GLP2-Mal
Поглощение
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Время удерживания, мин
B
Поглощение
10 15 20 25 30 35 40 45 50
Время удерживания, мин

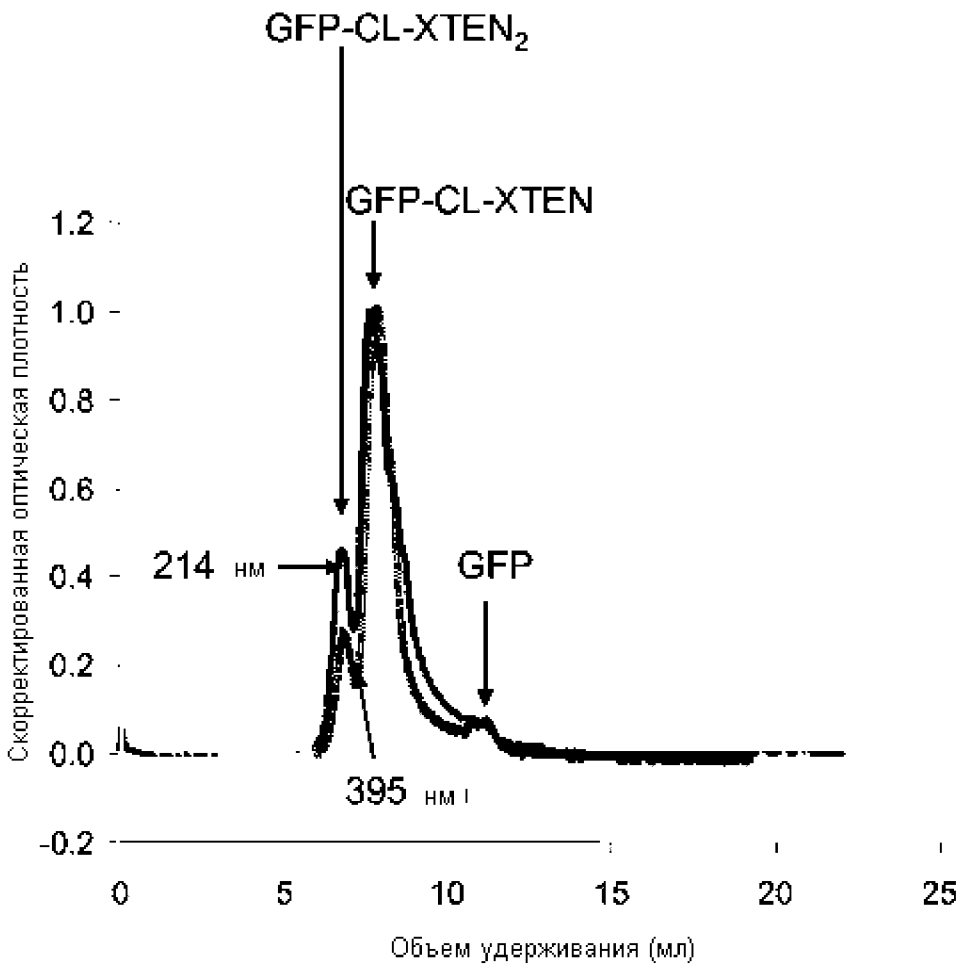
ФИГ. **70**


A
DBCO-XTEN
XTEN
Поглощение
10
15
20
25
30
40
Время удерживания, мин
B
DBCO-XTEN
XTEN
Поглощение
Проводимость буферного раствора
10
15
20
25
30
35
40 мин
C
DBCO-XTEN
Поглощение
10
15
20
25
30
40
Время удерживания, мин

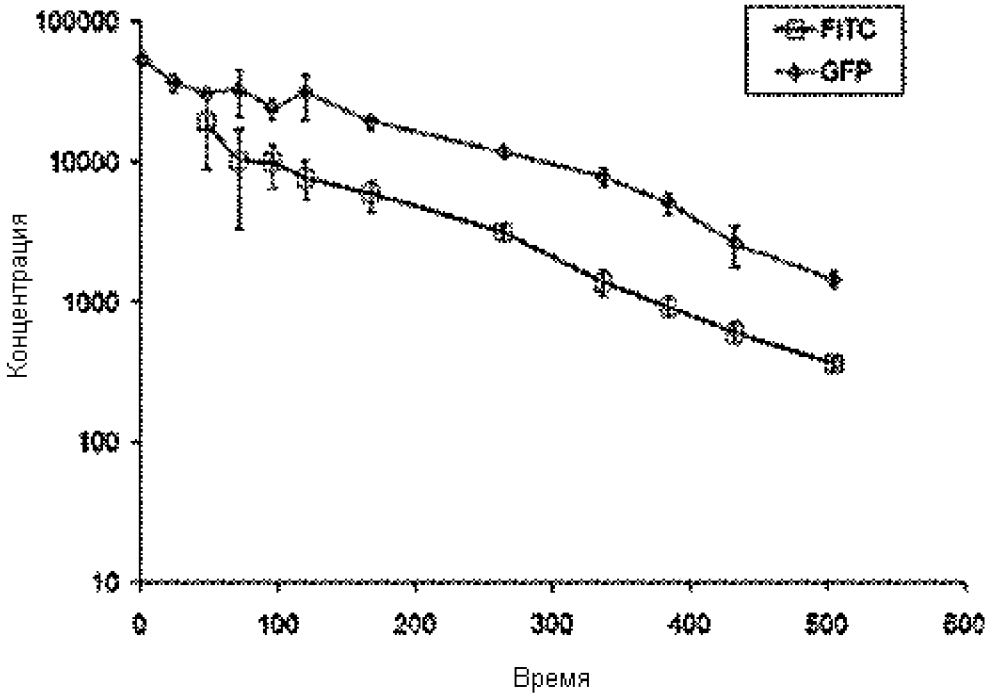
ФИГ. **71**


A.
220 кДа
80 кДа
FITC-CL-XTEN
FITC
B.
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Скорректированная оптическая плотность
FITC-IP-XTEN
214 нм
495 нм
FITC
0
5
10
15
20
25
Объем удерживания (мл)

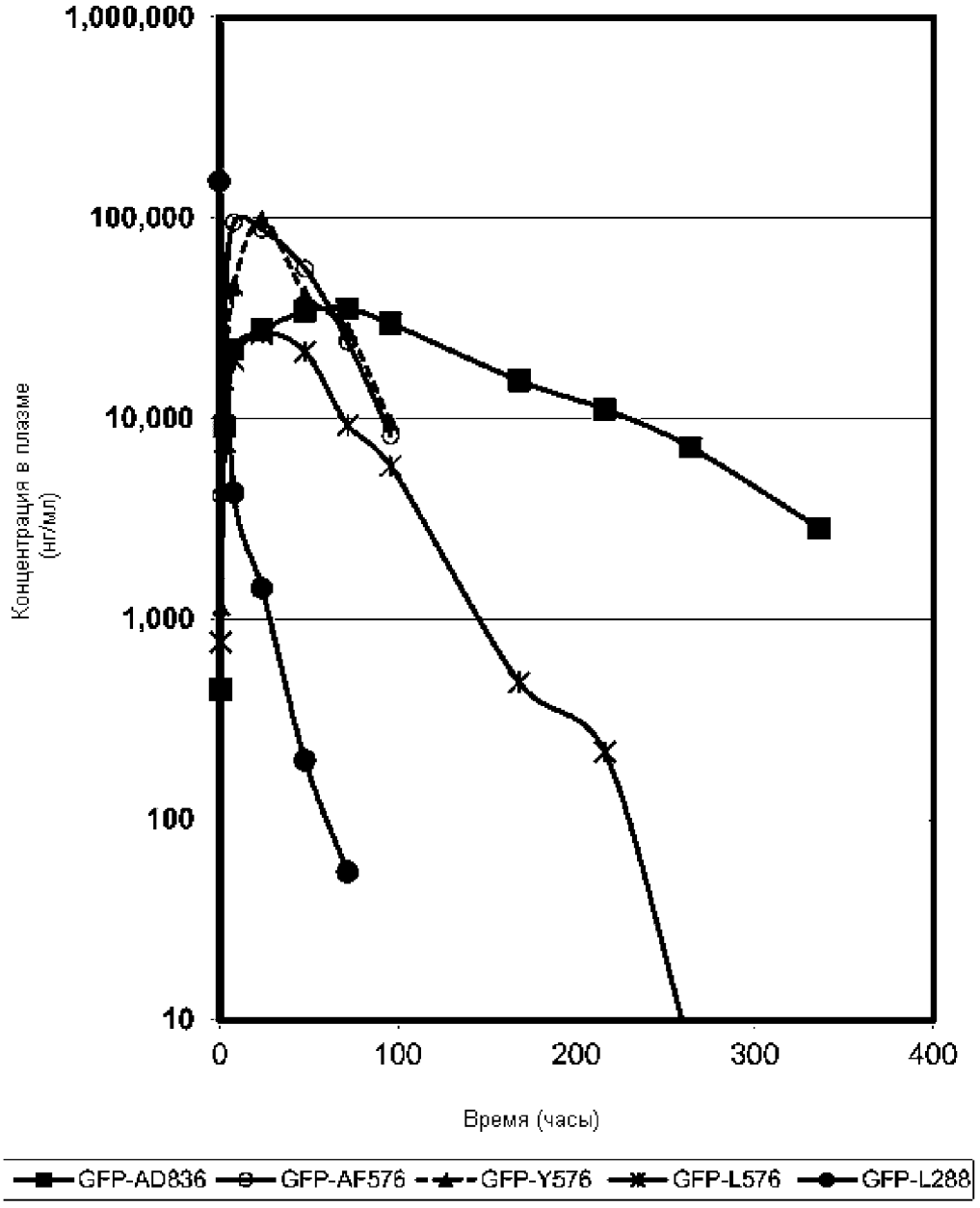
ФИГ. **72**


GFP-CL-XTEN2
GFP-CL-XTEN
GFP
214 нм
395 нм
Скорректированная оптическая плотность
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0
5
10
15
20
25
Объем удерживания (мл)

ФИГ. **73**


FITC
GFP
100000
10000
1000
100
10
Концентрация
0
100
200
300
400
500
600
Время

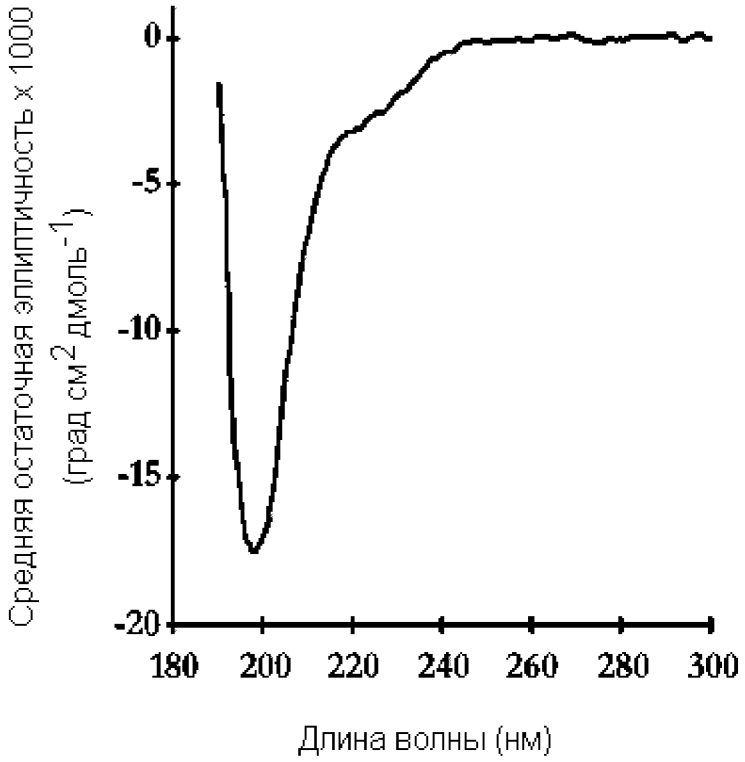
ФИГ. **74**


1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
Концентрация в плазме (нг/мл)
0
100
200
300
400
Время (часы)
GFP-AD836
GFP-AF576
GFP-Y576
GFP-L576
GFP-L288

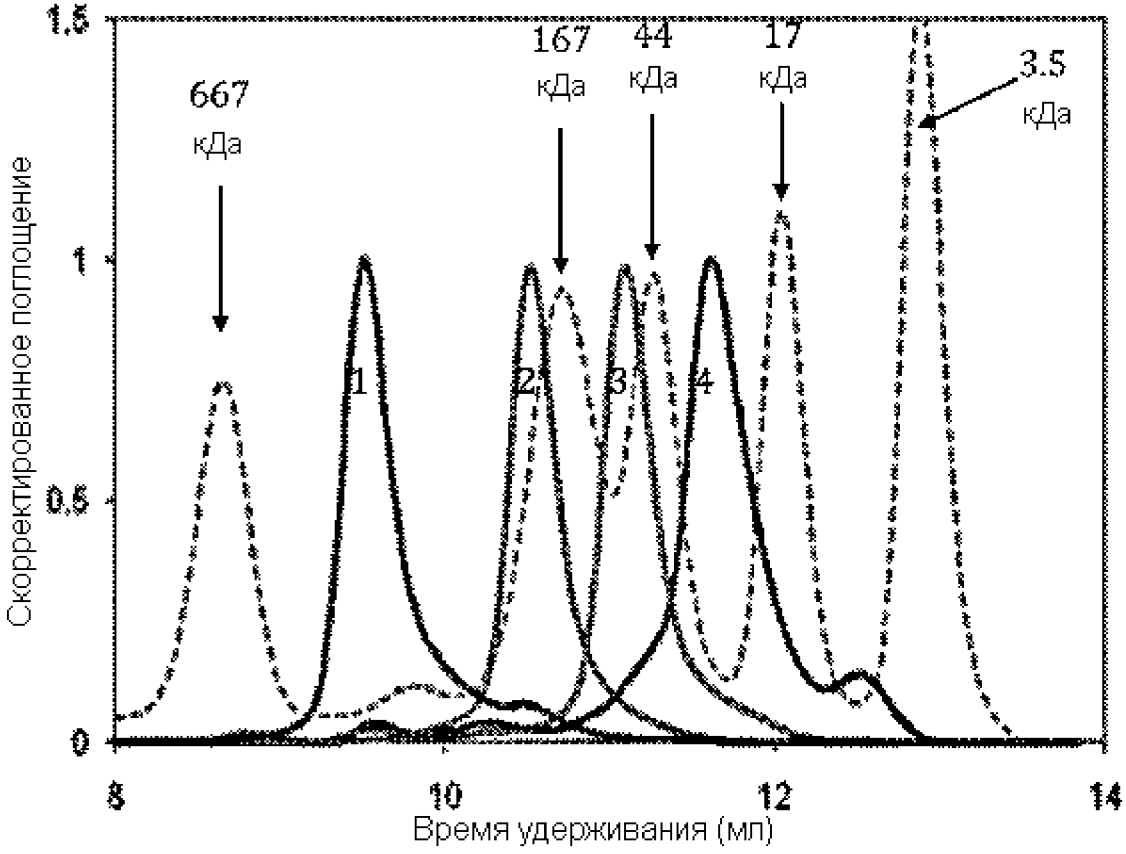
ФИГ. **75**

Время (дни)
0
1
7
A
Плазма обезьяны
B
Обезьяна in vivo
C
Гомогенат почек

ФИГ. 76


Средняя остаточная эллиптичность x 1000
(град см^2 дмоль$^{-1}$)
0
-5
-10
-15
-20
180
200
220
240
260
280
300
Длина волны (нм)

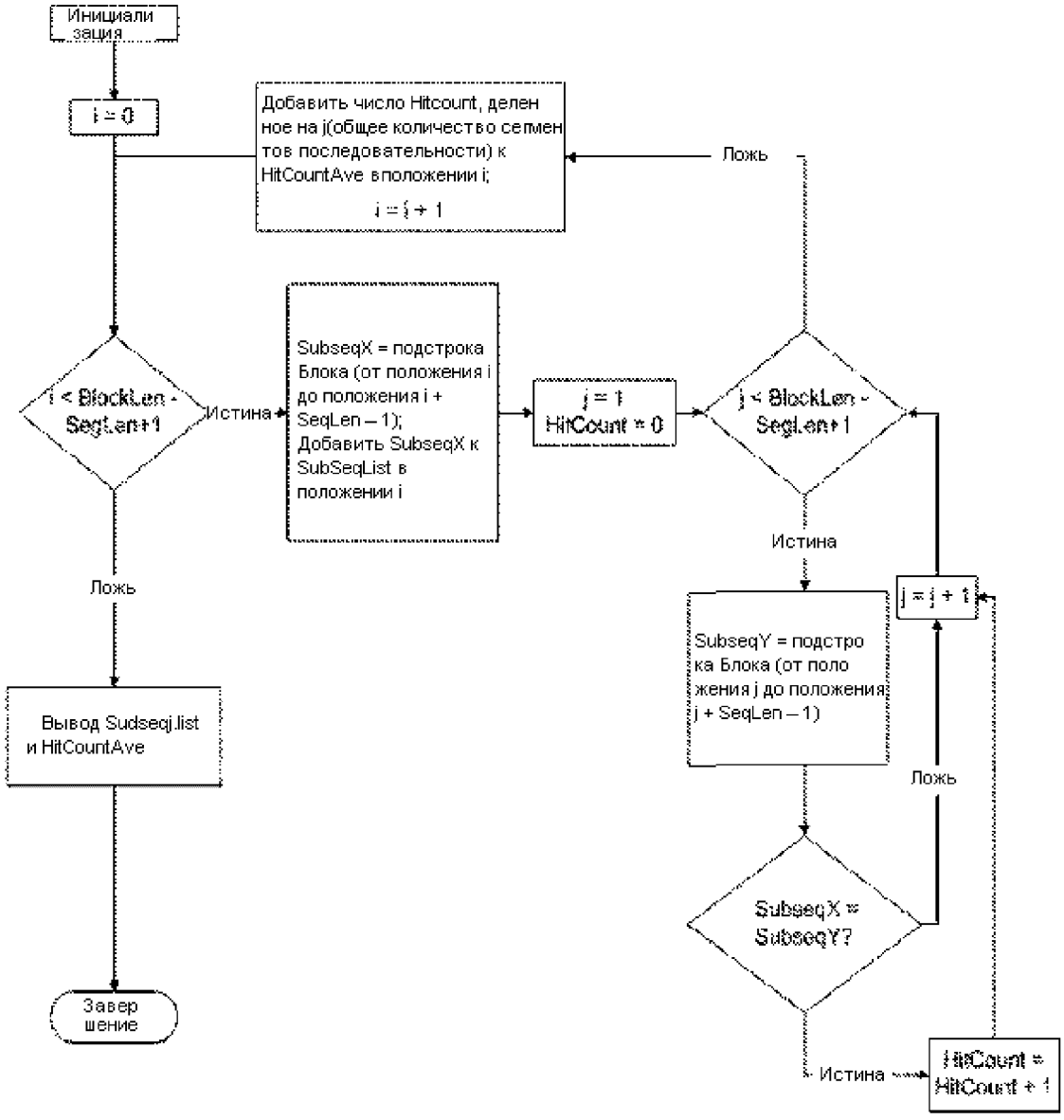
ФИГ. **77**



1. Глюкагон-Y288
2. Глюкагон-Y144
3. Глюкагон-Y72
4. Глюкагон-Y36

- - - - = Стандарты

ФИГ. 78


Инициали зация
i = 0
Добавить число Hitcount, делен ное на j(общее количество сегмен тов последовательности) к HitCountAve вположении i;
i = i + 1
Ложь
i < BlockLen - SeqLen+1
Истина
SubseqX = подстрока Блока (от положения i до положения i + SeqLen – 1); Добавить SubseqX к SubSeqList в положении i
j = 1 HitCount = 0
j < BlockLen - SeqLen+1
Истина
Ложь
SubseqY = подстро ка Блока (от поло жения j до положения j + SeqLen – 1)
j = j + 1
Ложь
SubseqX = SubseqY?
Истина
HitCount = HitCount + 1
Вывод Sudseqj.list и HitCountAve
Завер шение

ФИГ. **79**

XTEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Последовательность	A	S	T	G	E	T	G	E	T	G	E

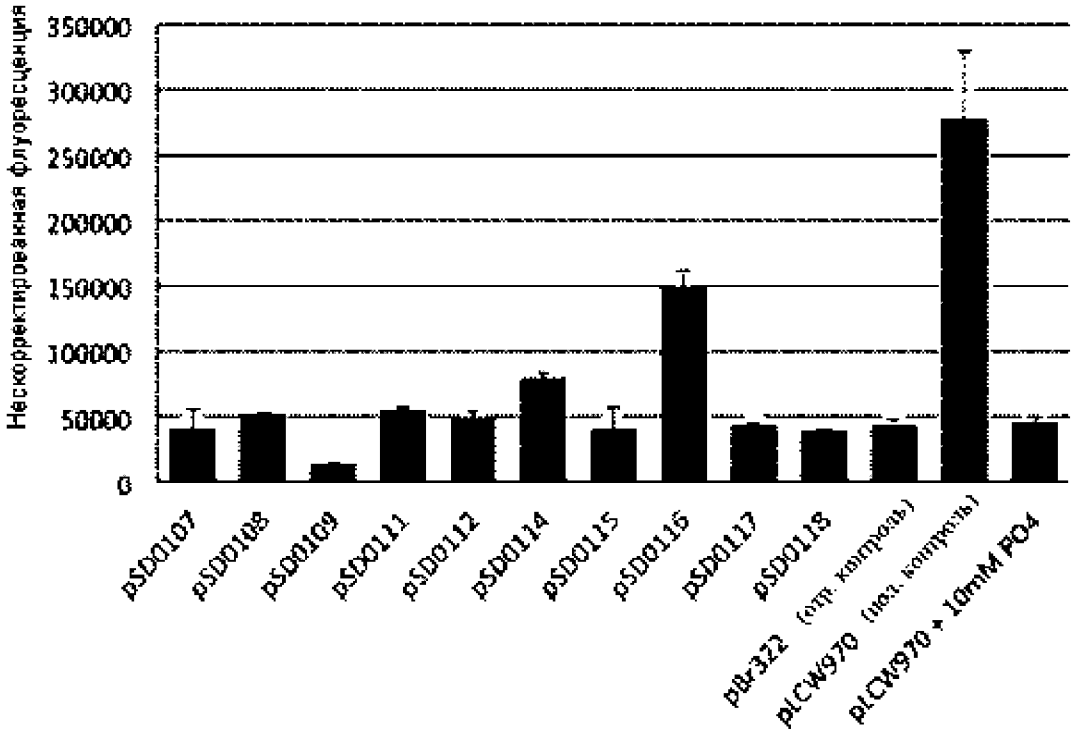
XTEN Длина: **N=11**

Длина подпоследовательности: **S=3**

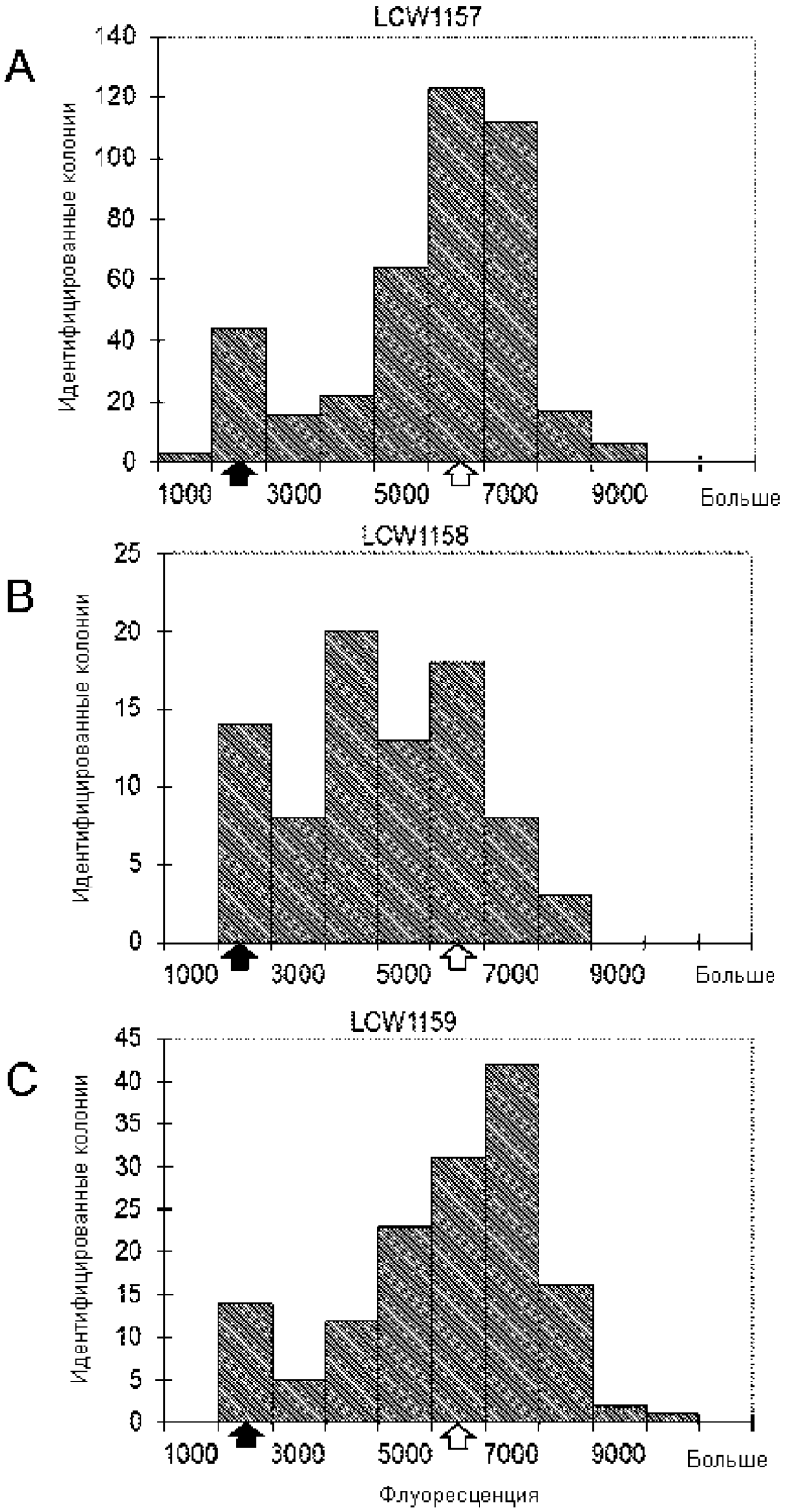
		Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 4	Seg 5	Seg 6	Seg 7	Seg 8	Seg 9
		AST	STG	TGE	GET	ETG	TGE	GET	ETG	TGE
Seg 1	AST	x								
Seg 2	STG		x							
Seg 3	TGE			x			x			
Seg 4	GET				x			x		
Seg 5	ETG					x			x	
Seg 6	TGE			x			x			x
Seg 7	GET				x			x		
Seg 8	ETG					x			x	
Seg 9	TGE						x			x
		1	1	2	2	2	3	2	2	2

Число подпоследовательностей **= 1.89**

ФИГ. **80**

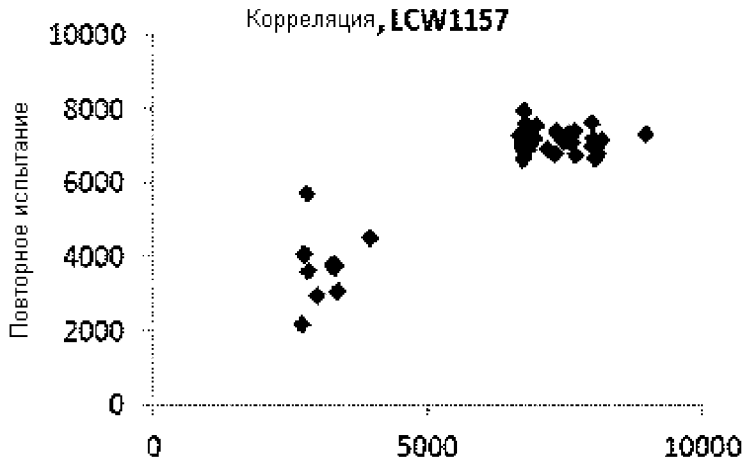

Нескорректированная флуоресценция
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
pSD0107
pSD0108
pSD0109
pSD0111
pSD0112
pSD0114
pSD0115
pSD0116
pSD0117
pSD0118
pBr322 (отр. контроль)
pLCW970 (полл. контроль)
pLCW970 + 10mM PO4

ФИГ. 81

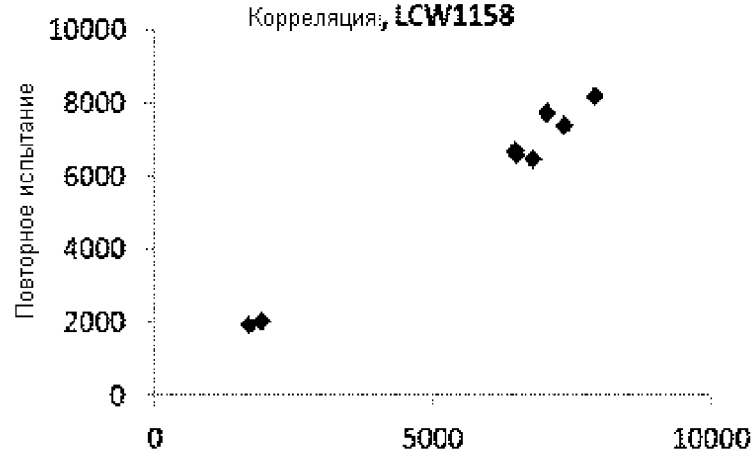

A
LCW1157
Идентифицированные колонии
140
120
100
80
60
40
20
0
1000
3000
5000
7000
9000
Больше
B
LCW1158
Идентифицированные колонии
25
20
15
10
5
0
1000
3000
5000
7000
9000
Больше
C
LCW1159
Идентифицированные колонии
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1000
3000
5000
7000
9000
Больше
Флуоресценция

ФИГ. **82, A, B, C**

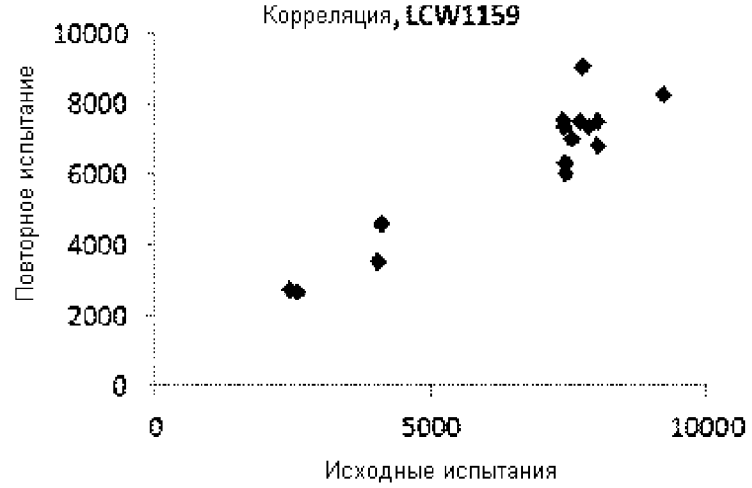
D



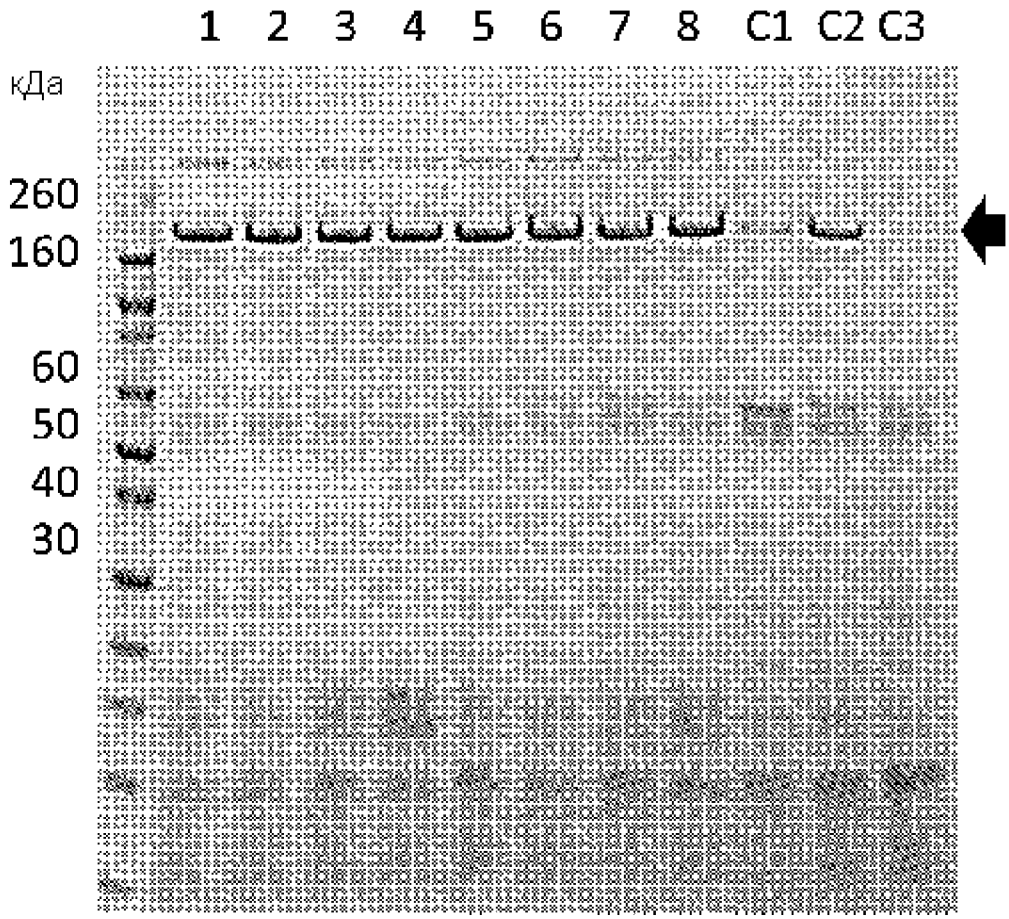
E



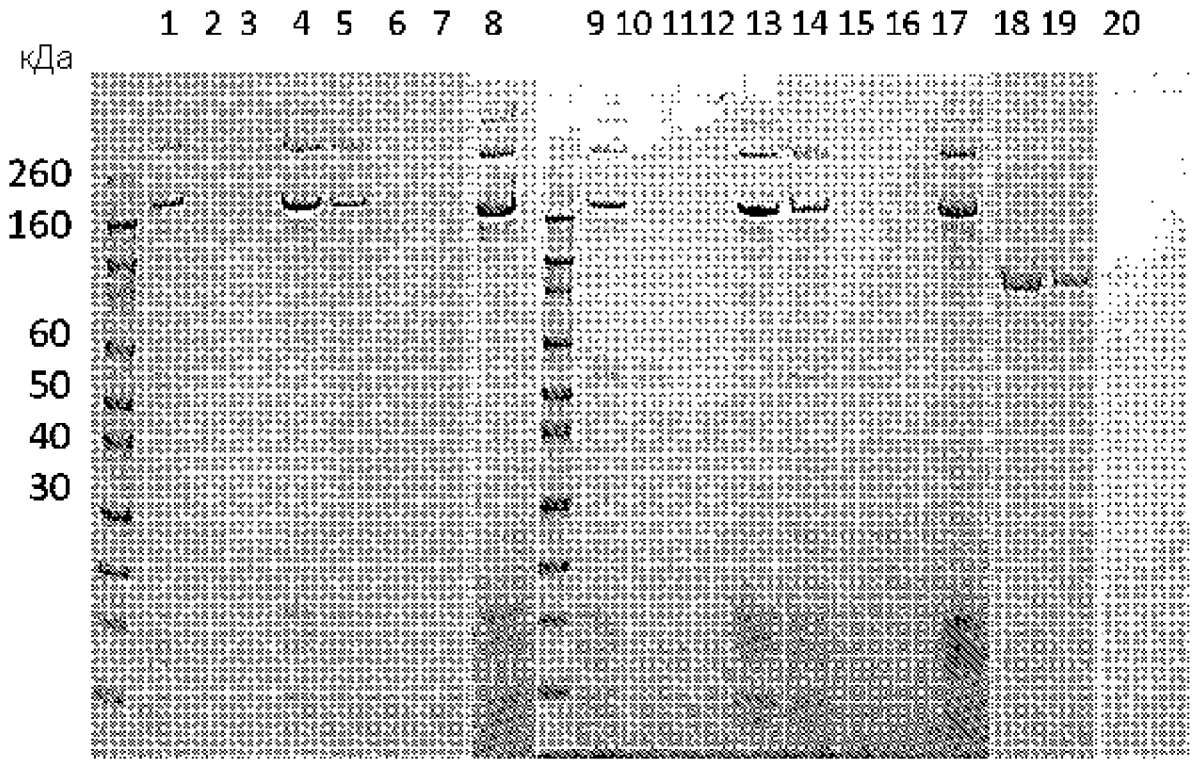
F



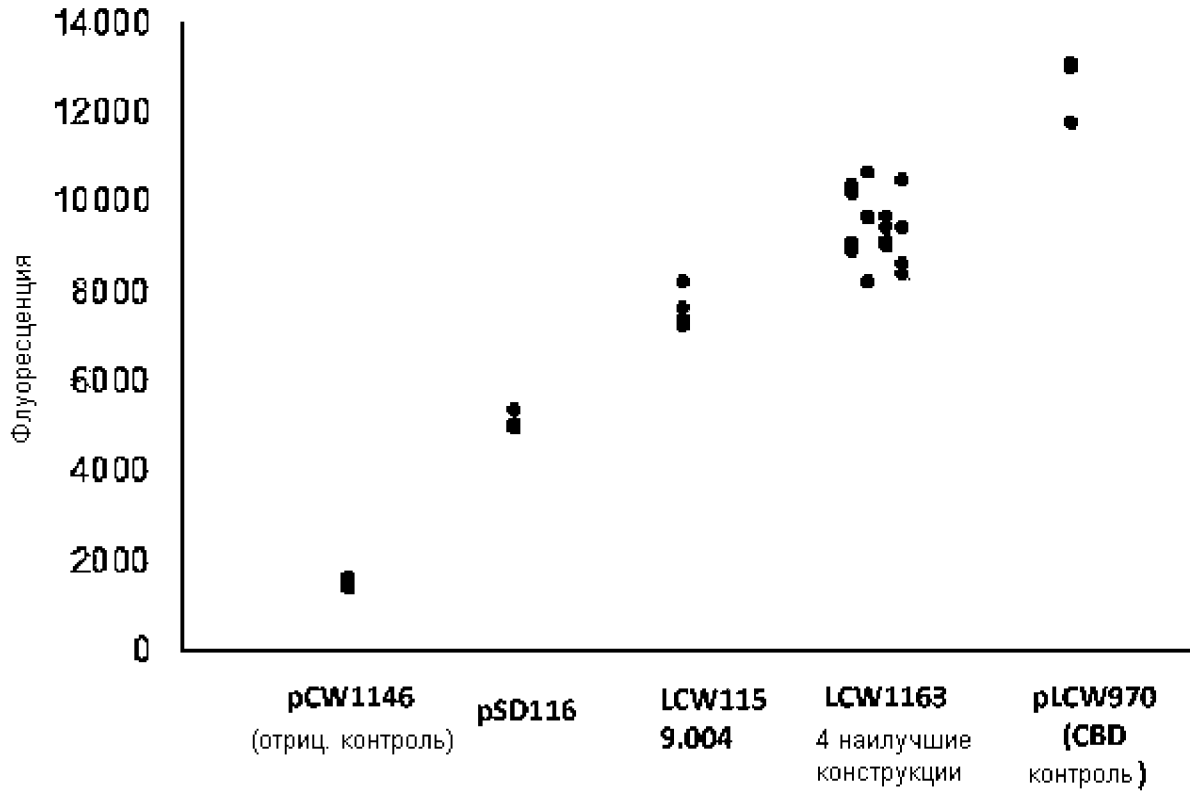
ФИГ. 82, D, E, F



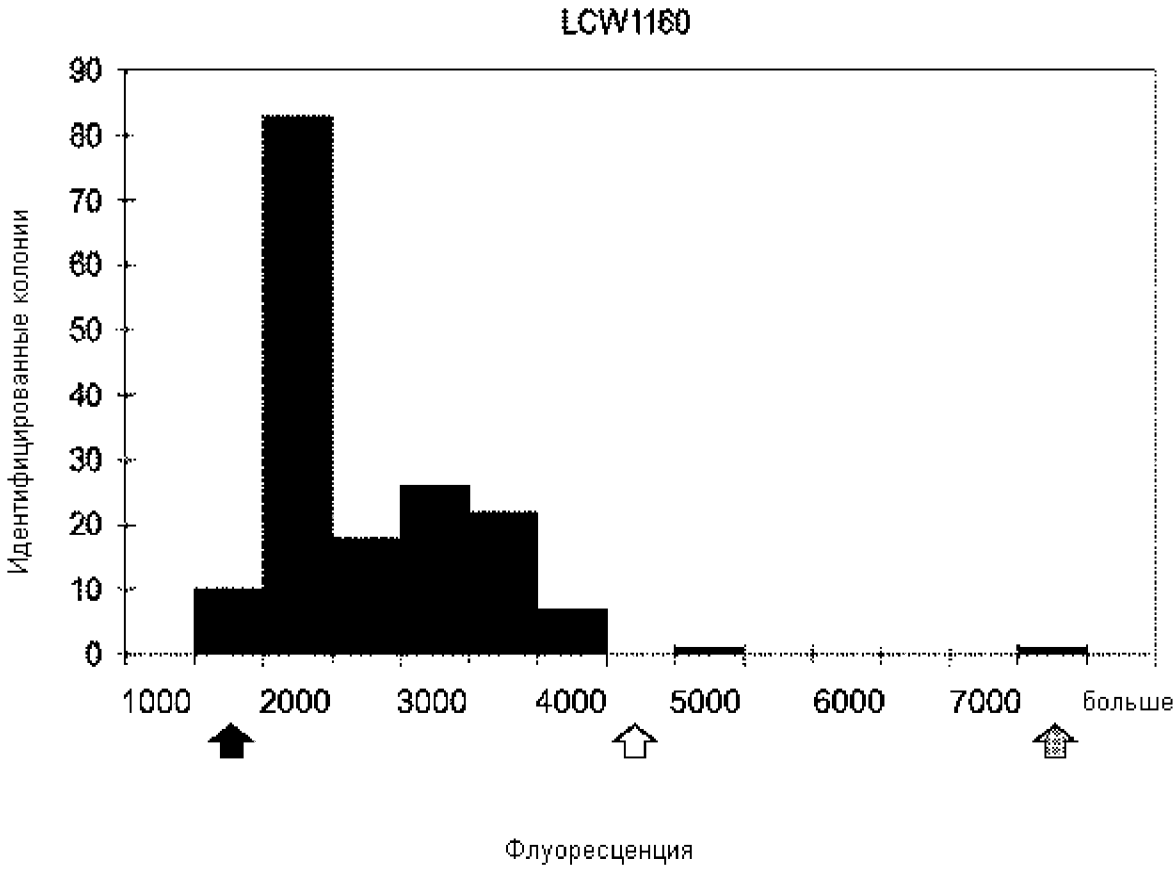
ФИГ. **83**



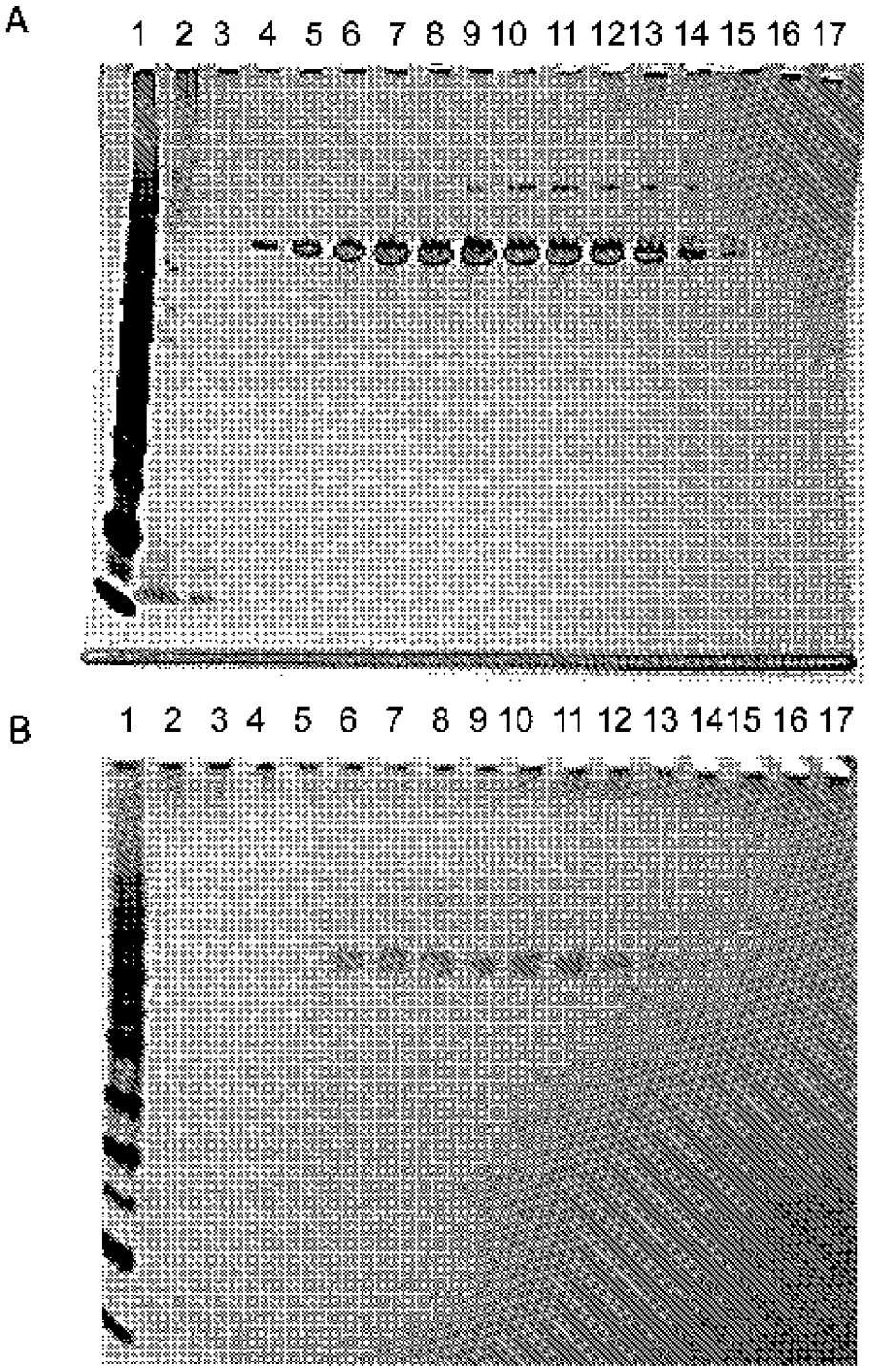
ФИГ. **84**


14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Флуоресценция
pCW1146
(отриц. контроль)
pSD116
LCW1159.004
LCW1163
4 наилучшие конструкции
pLCW970
(CBD
контроль)

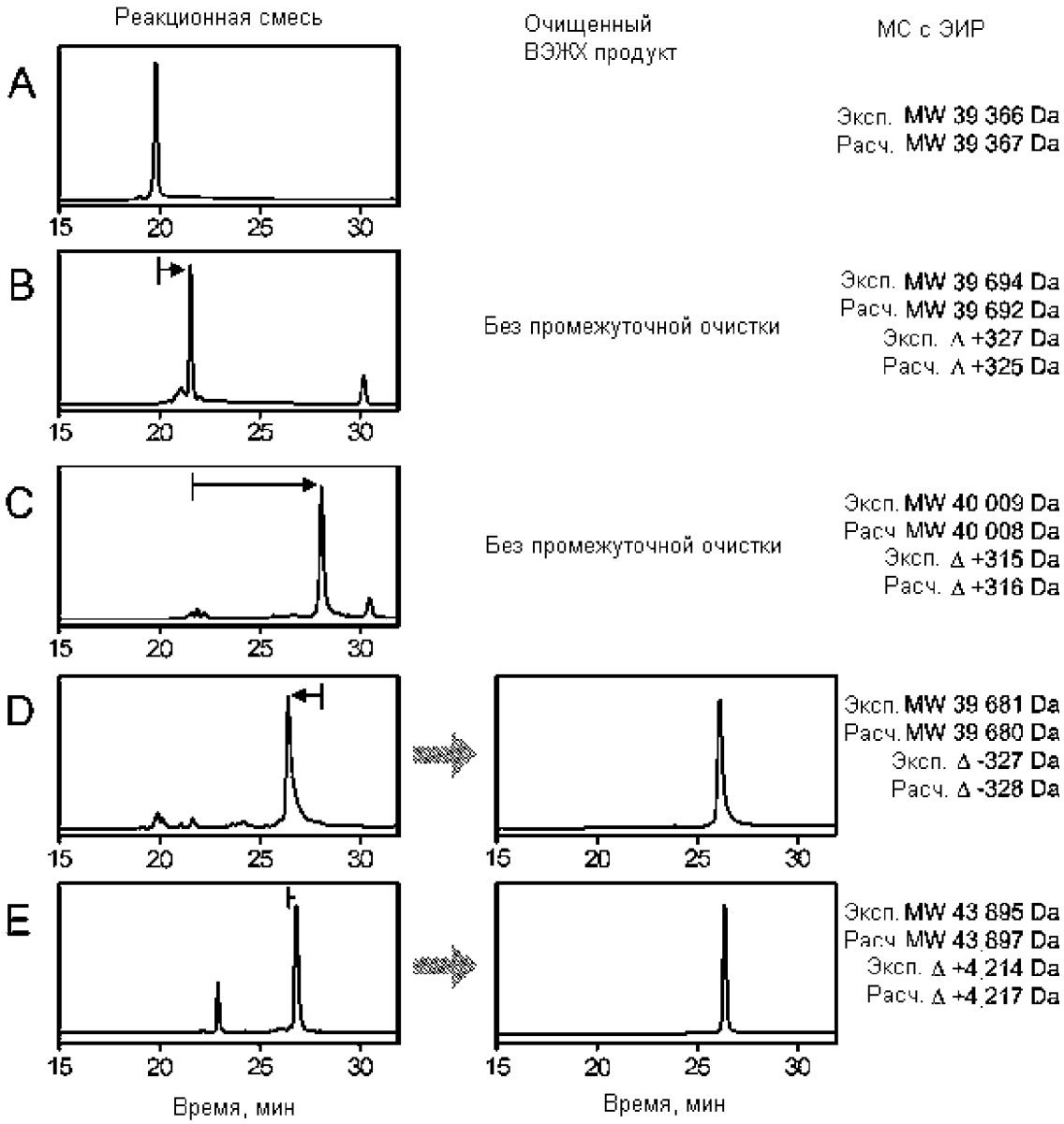
ФИГ. 85


LCW1160
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Идентифицированные колонии
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
больше
Флуоресценция

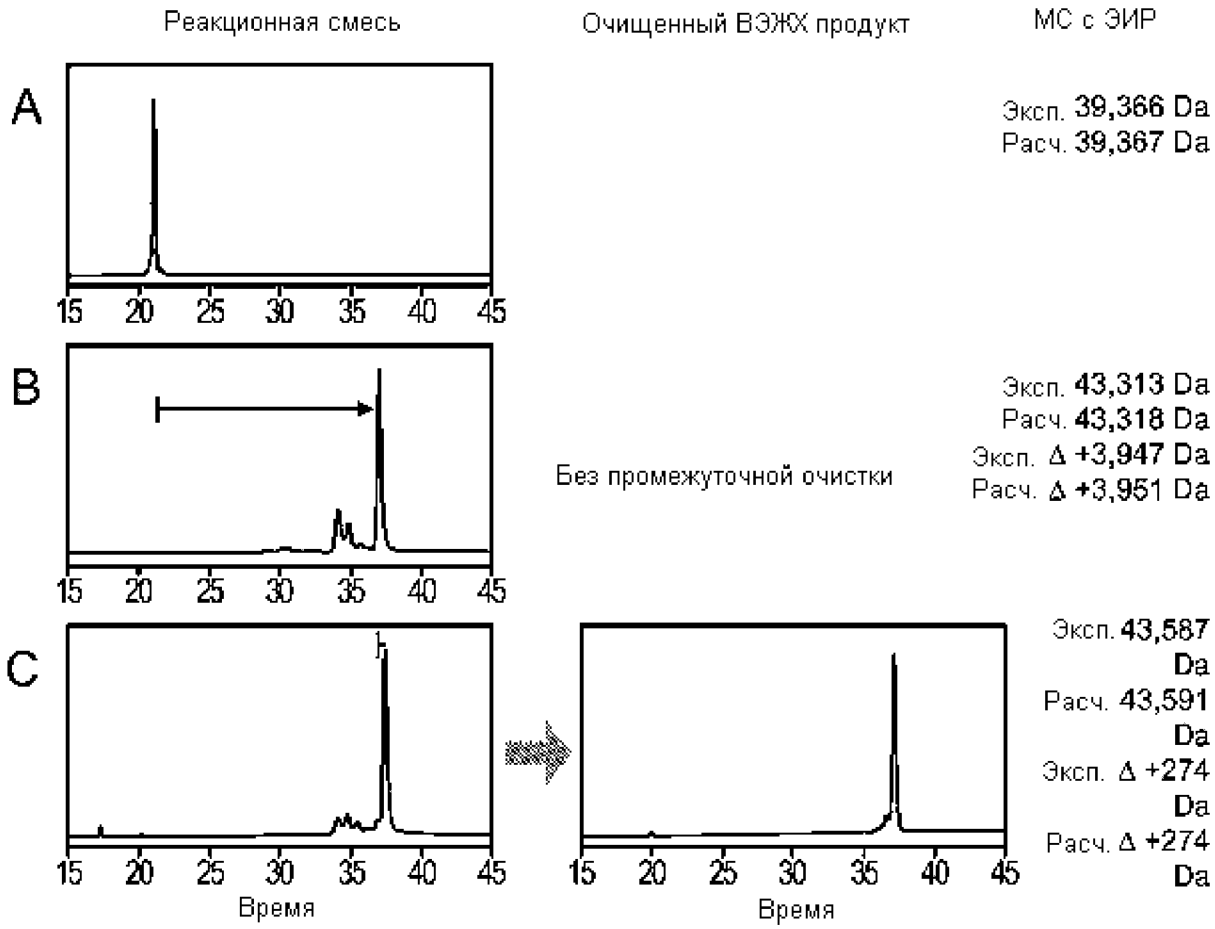
ФИГ. **86**


A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

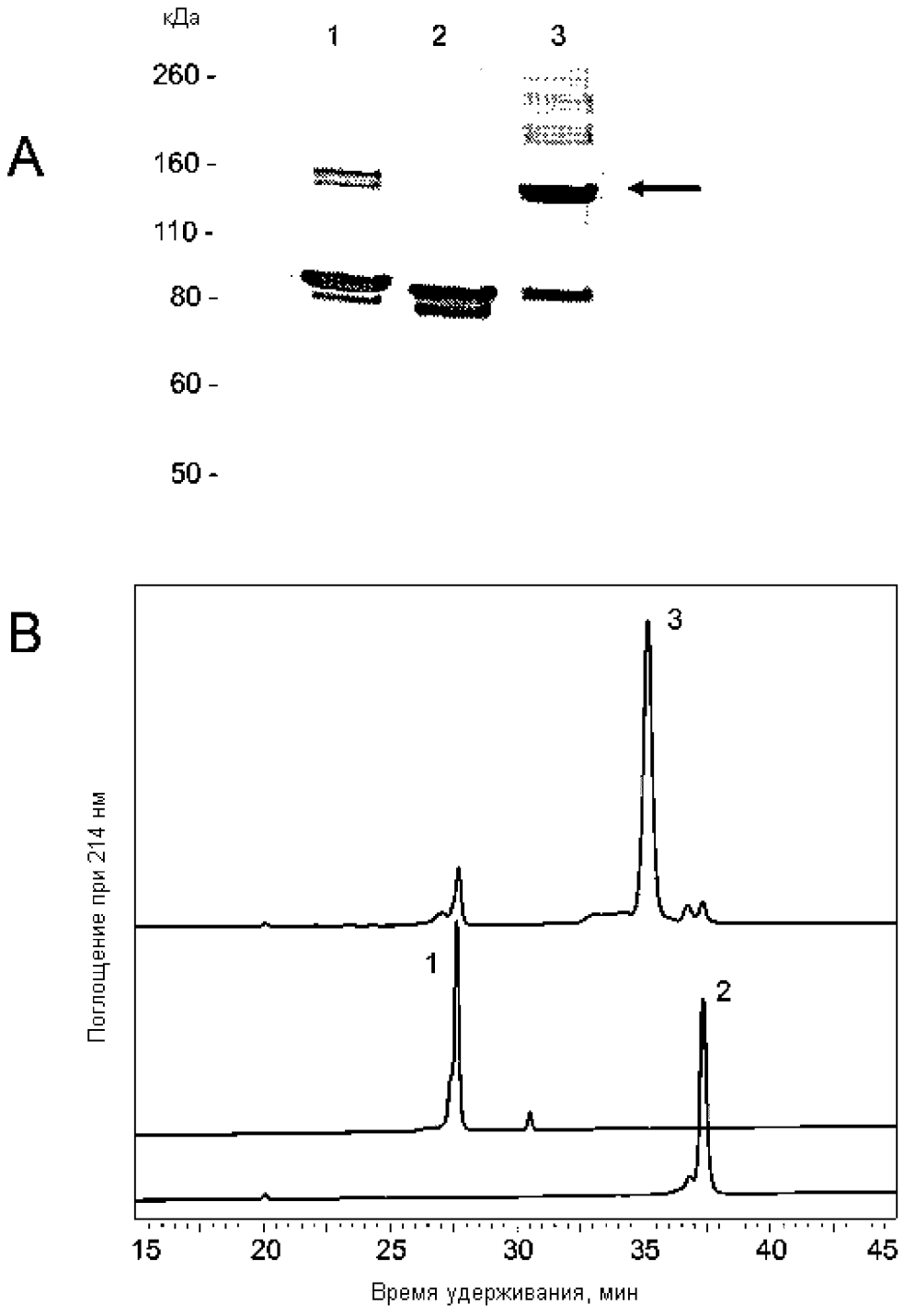
ФИГ. **87**


Реакционная смесь
Очищенный ВЭЖХ продукт
МС с ЭИР
A
Эксп. MW 39 366 Da
Расч. MW 39 367 Da
B
Без промежуточной очистки
Эксп. MW 39 694 Da
Расч. MW 39 692 Da
Эксп. Δ +327 Da
Расч. Δ +325 Da
C
Без промежуточной очистки
Эксп. MW 40 009 Da
Расч. MW 40 008 Da
Эксп. Δ +315 Da
Расч. Δ +316 Da
D
Эксп. MW 39 681 Da
Расч. MW 39 680 Da
Эксп. Δ -327 Da
Расч. Δ -328 Da
E
Эксп. MW 43 895 Da
Расч. MW 43 897 Da
Эксп. Δ +4 214 Da
Расч. Δ +4 217 Da
15
20
25
30
Время, мин
Время, мин

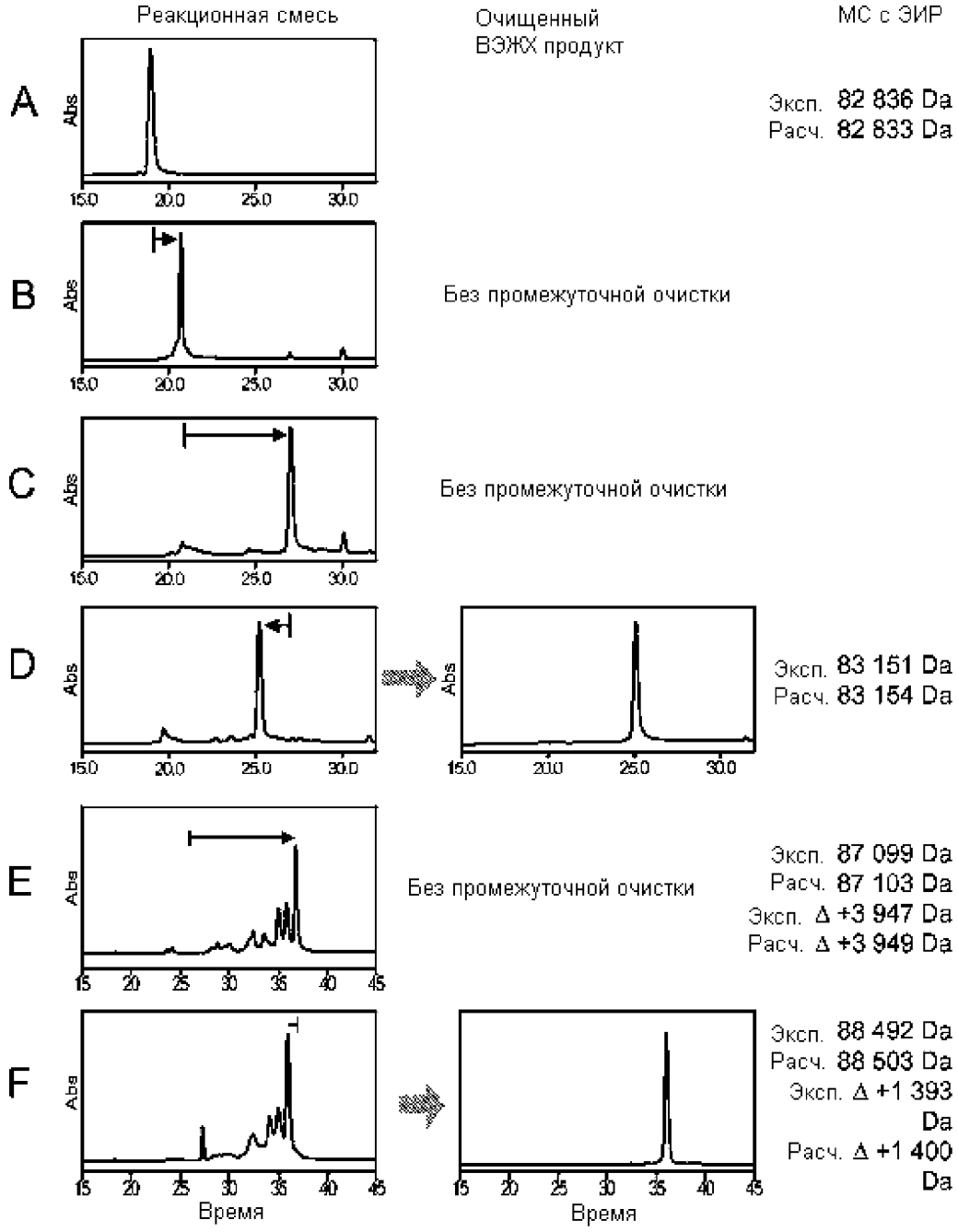
ФИГ. **88**


Реакционная смесь
Очищенный ВЭЖХ продукт
МС с ЭИР
A
Эксп. 39,366 Da
Расч. 39,367 Da
B
Эксп. 43,313 Da
Расч. 43,318 Da
Эксп. Δ +3,947 Da
Расч. Δ +3,951 Da
Без промежуточной очистки
C
Эксп. 43,587 Da
Расч. 43,591 Da
Эксп. Δ +274 Da
Расч. Δ +274 Da
15 20 25 30 35 40 45
Время

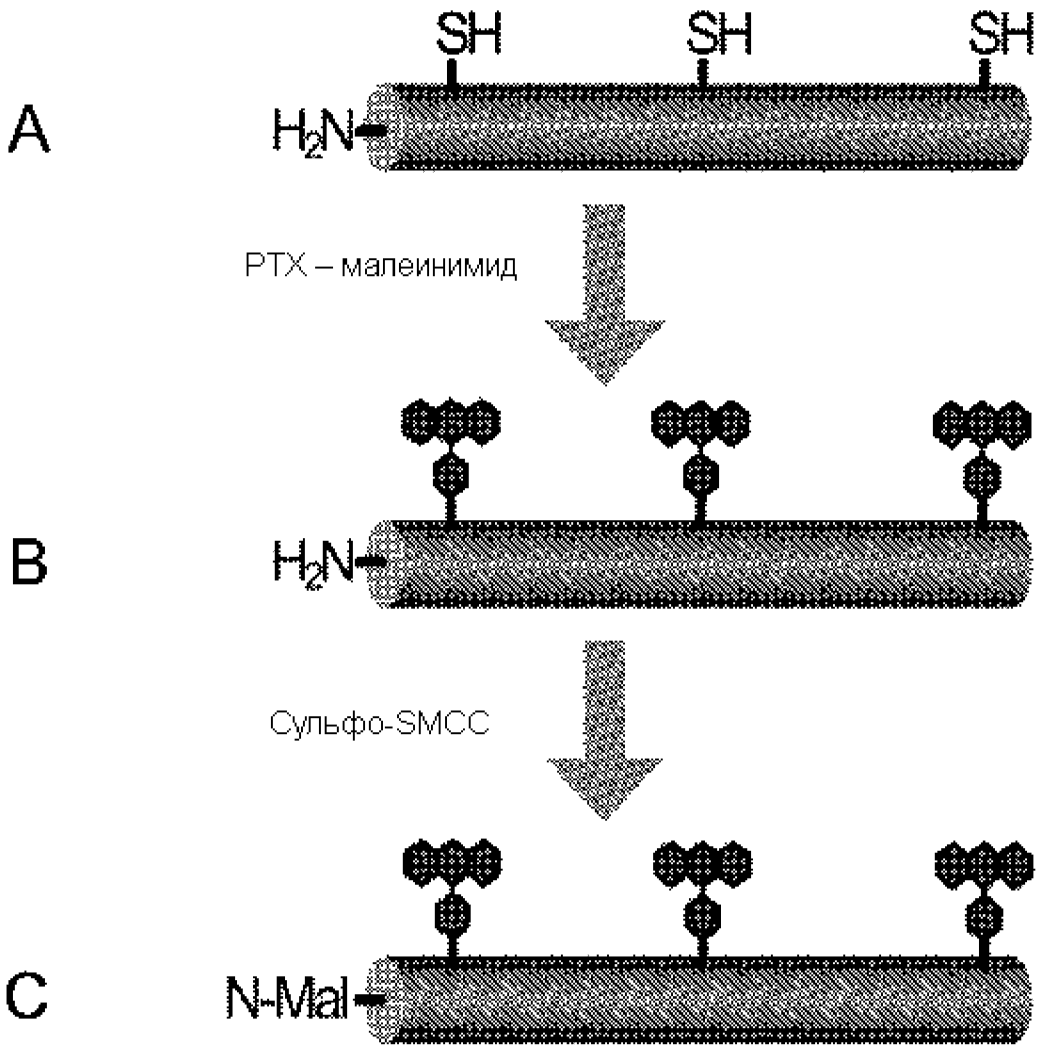
ФИГ. **89**


A
кДа
1
2
3
260 -
160 -
110 -
80 -
60 -
50 -
B
Поглощение при 214 нм
1
2
3
15
20
25
30
35
40
45
Время удерживания, мин

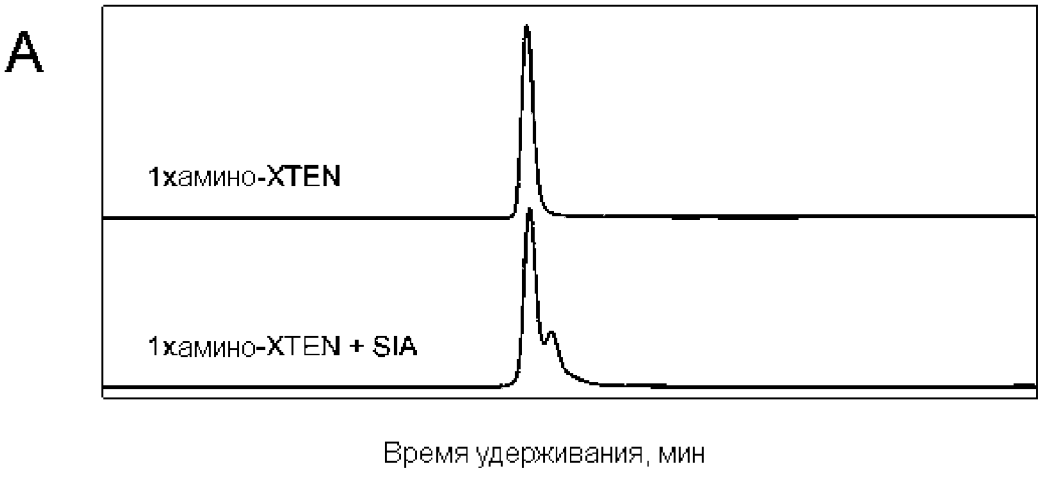
ФИГ. **90**

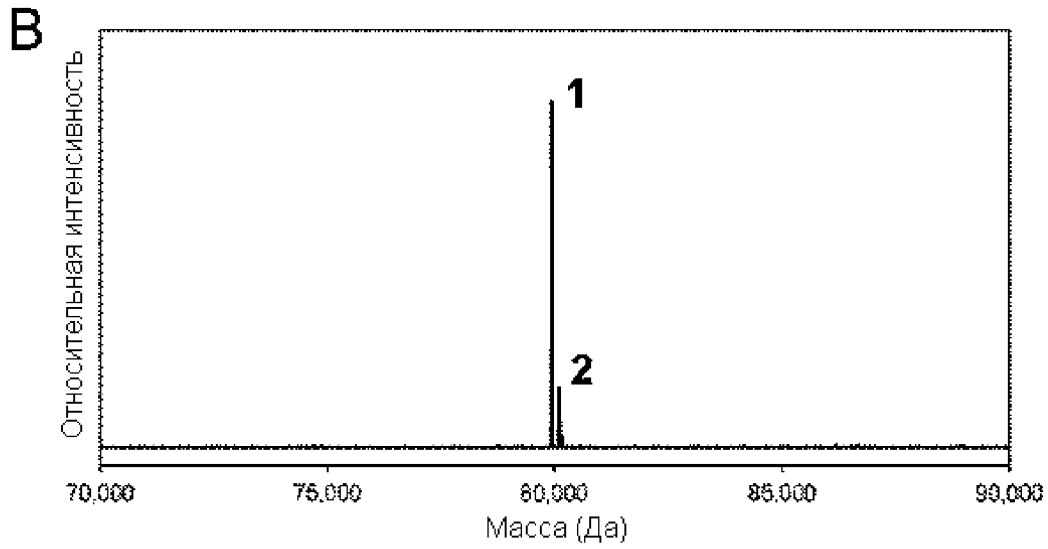

Реакционная смесь
Очищенный ВЭЖХ продукт
МС с ЭИР
A
Abs
15.0 20.0 25.0 30.0
Эксп. 82 836 Da
Расч. 82 833 Da
B
Abs
15.0 20.0 25.0 30.0
Без промежуточной очистки
C
Abs
15.0 20.0 25.0 30.0
Без промежуточной очистки
D
Abs
15.0 20.0 25.0 30.0
Abs
15.0 20.0 25.0 30.0
Эксп. 83 151 Da
Расч. 83 154 Da
E
Abs
15 20 25 30 35 40 45
Без промежуточной очистки
Эксп. 87 099 Da
Расч. 87 103 Da
Эксп. Δ +3 947 Da
Расч. Δ +3 949 Da
F
Abs
15 20 25 30 35 40 45
Время
15 20 25 30 35 40 45
Время
Эксп. 88 492 Da
Расч. 88 503 Da
Эксп. Δ +1 393 Da
Расч. Δ +1 400 Da

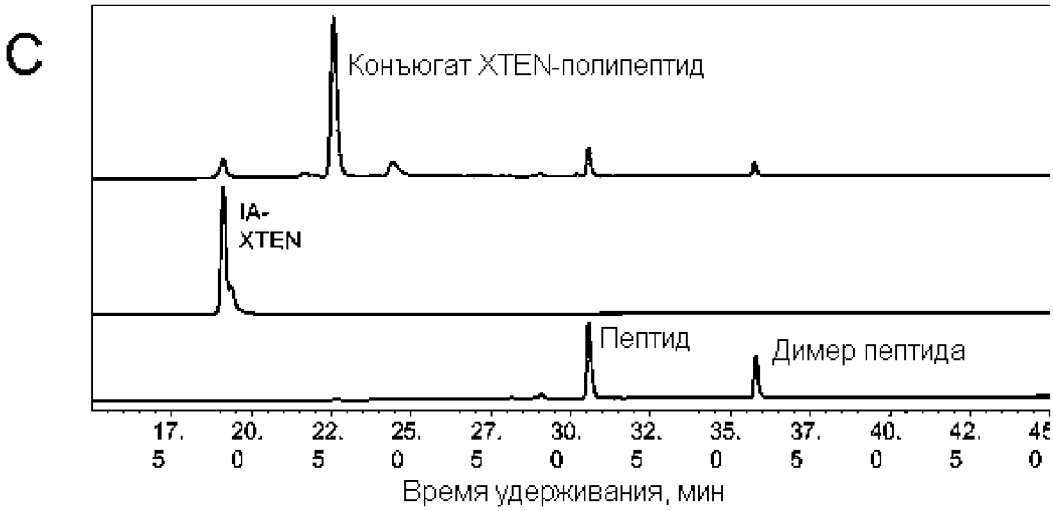
ФИГ. **91**



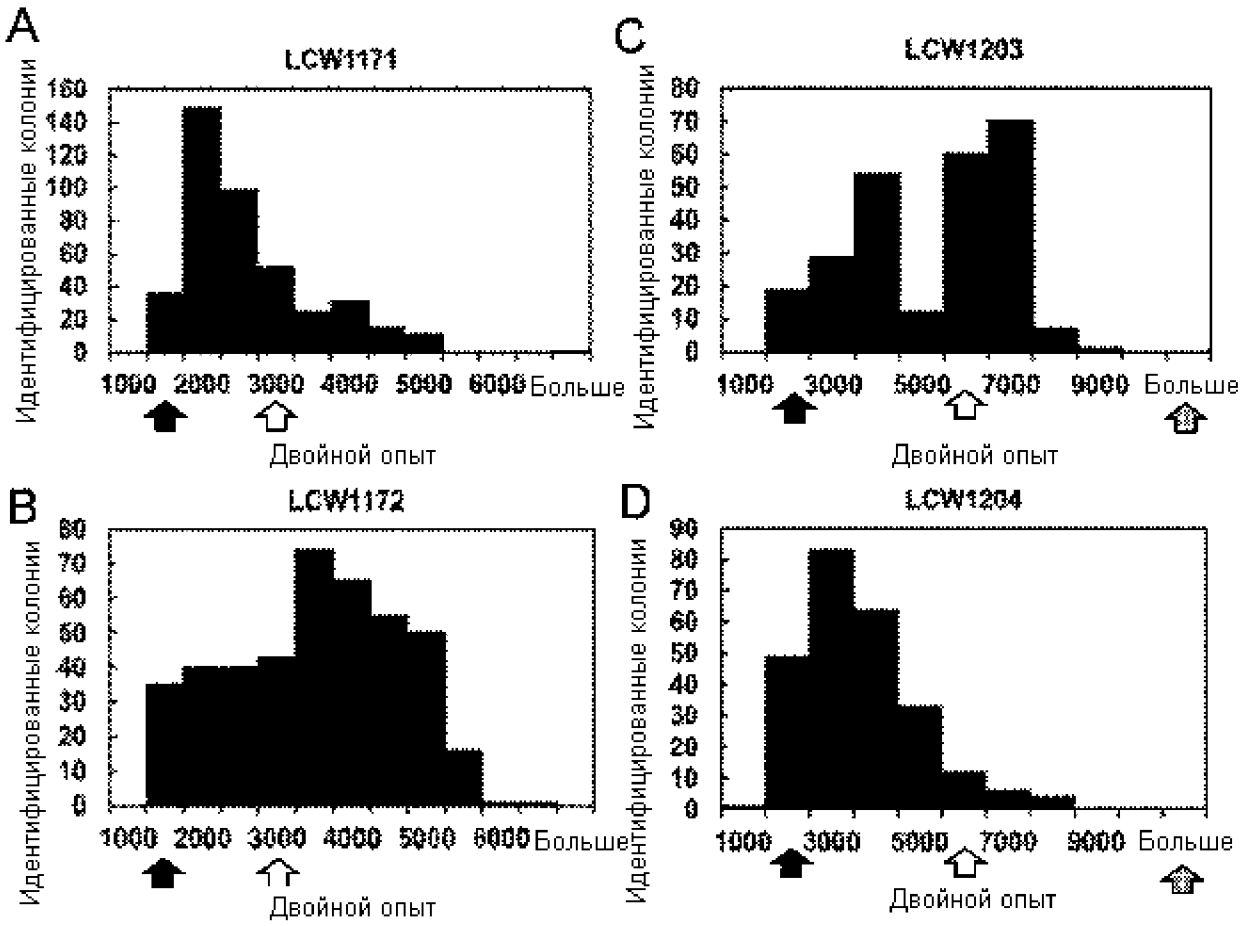
ФИГ. **92**


A
1хамино-XTEN
1хамино-XTEN + SIA
Время удерживания, мин

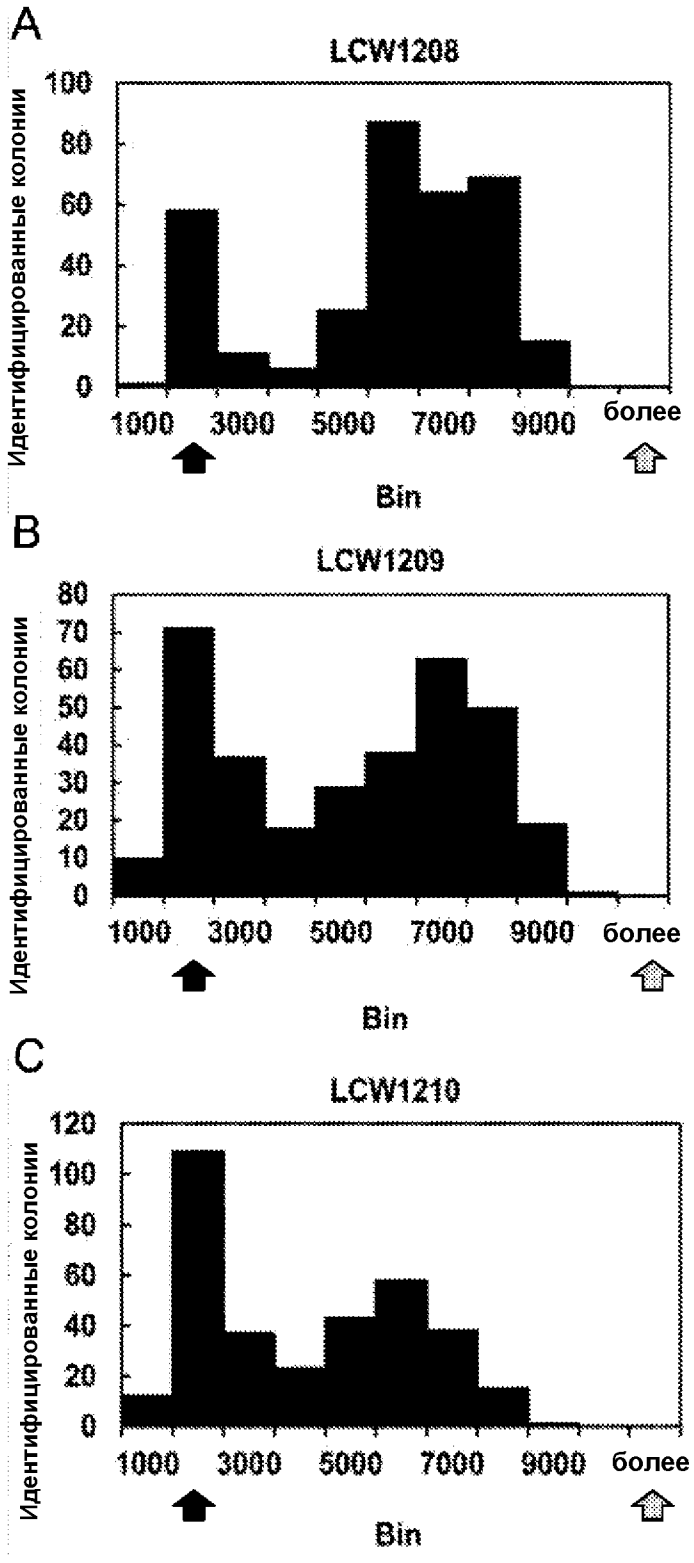

B
Относительная интенсивность
1
2
70,000
75,000
80,000
85,000
90,000
Масса (Да)


C
Конъюгат XTEN-полипептид
IA-
XTEN
Пептид
Димер пептида
17.
5
20.
0
22.
5
25.
0
27.
5
30.
0
32.
5
35.
0
37.
5
40.
0
42.
5
Время удерживания, мин

ФИГ. **93**

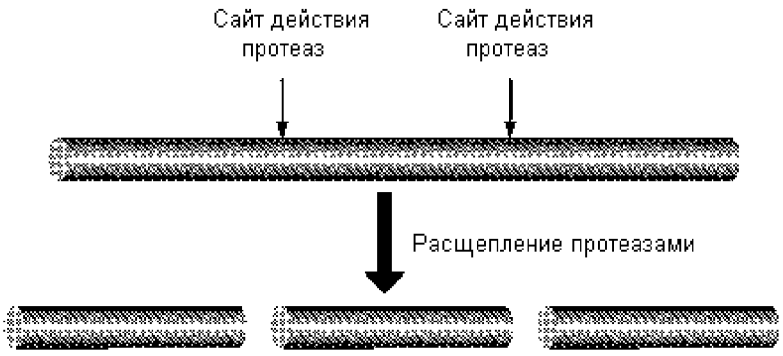

A
LCW1171
Идентифицированные колонии
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1000 2000 3000 4000 5000 6000 Больше
Двойной опыт
C
LCW1203
Идентифицированные колонии
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1000 3000 5000 7000 9000 Больше
Двойной опыт
B
LCW1172
Идентифицированные колонии
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1000 2000 3000 4000 5000 6000 Больше
Двойной опыт
D
LCW1204
Идентифицированные колонии
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1000 3000 5000 7000 9000 Больше
Двойной опыт

ФИГ. **94**

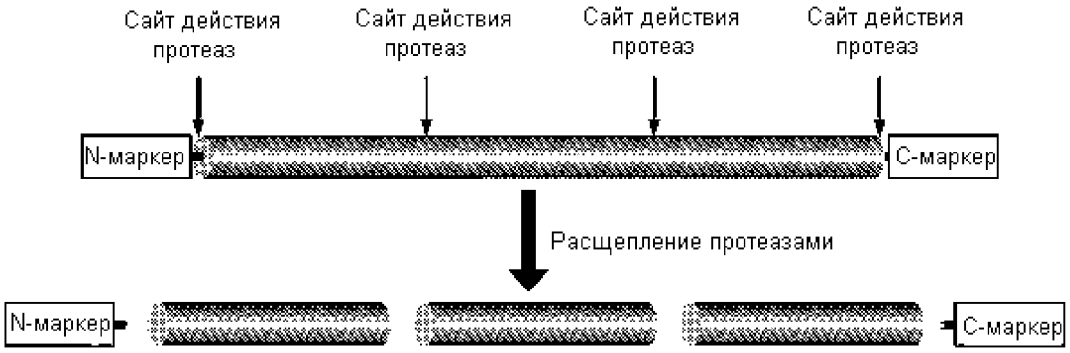

A
LCW1208
Идентифицированные колонии
100
80
60
40
20
0
1000
3000
5000
7000
9000
более
Bin
B
LCW1209
Идентифицированные колонии
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1000
3000
5000
7000
9000
более
Bin
C
LCW1210
Идентифицированные колонии
120
100
80
60
40
20
0
1000
3000
5000
7000
9000
более
Bin

ФИГ. 95

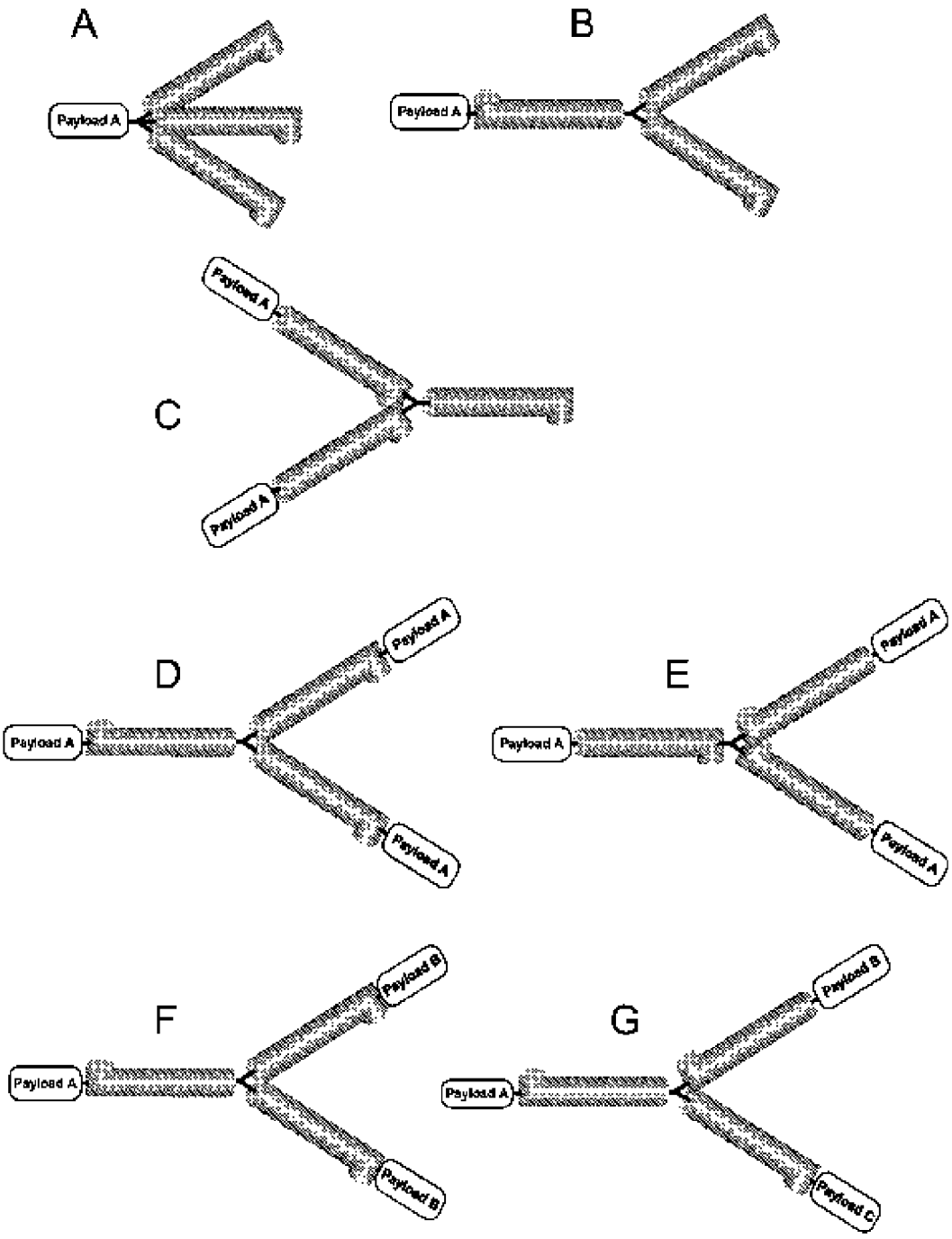
A


Сайт действия протеаз
Сайт действия протеаз
Расщепление протеазами

B

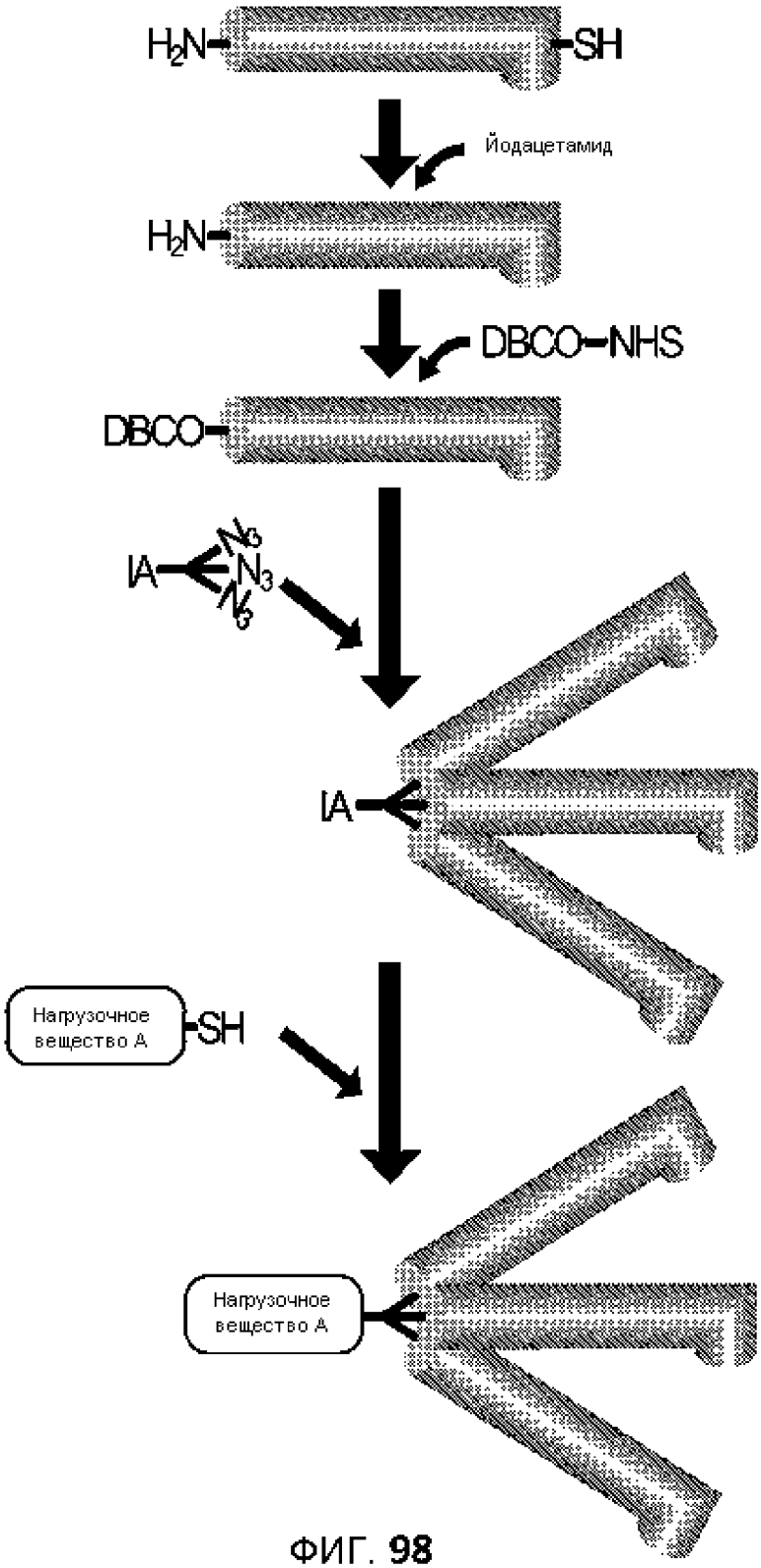

Сайт действия протеаз
Сайт действия протеаз
Сайт действия протеаз
Сайт действия протеаз
N-маркер
C-маркер
Расщепление протеазами
N-маркер
C-маркер

ФИГ. **96**

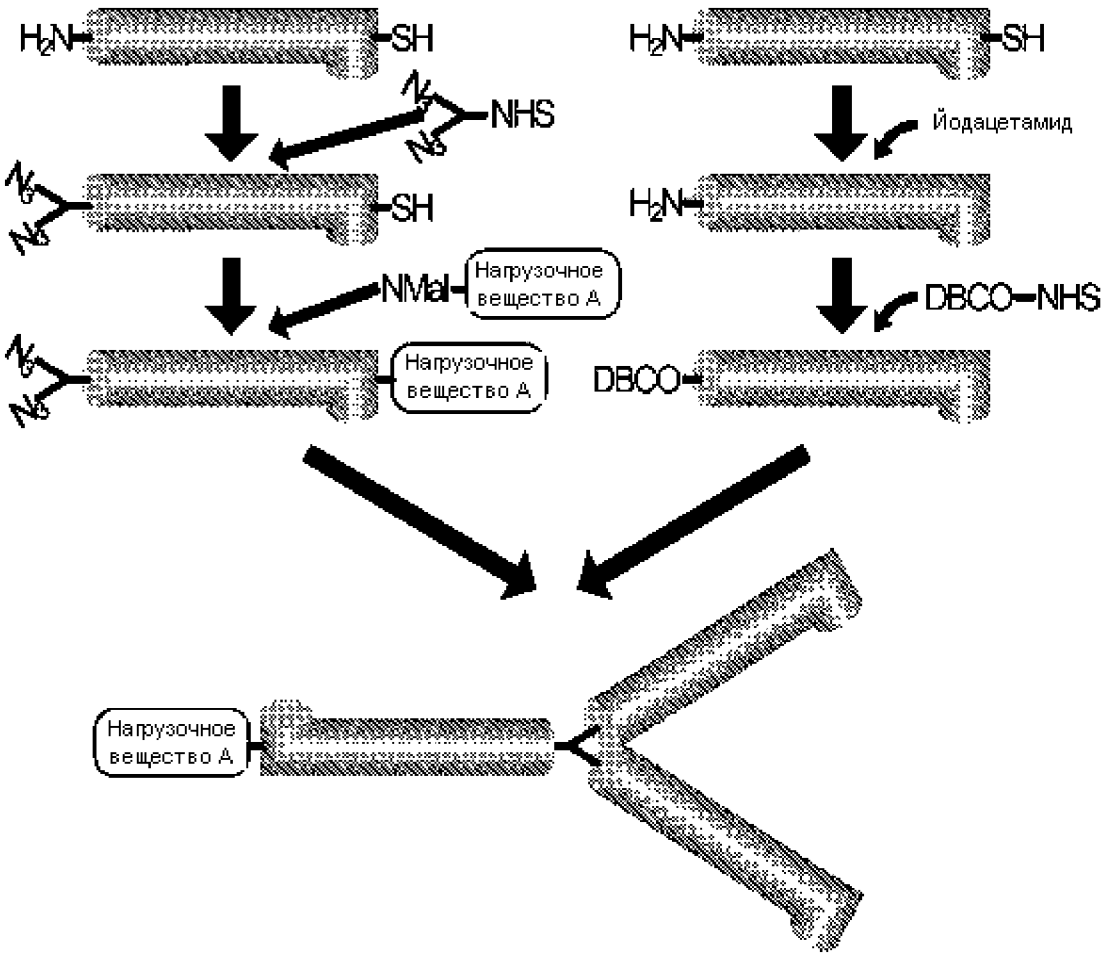


*Payload A, B – Нагрузочное вещество A, B

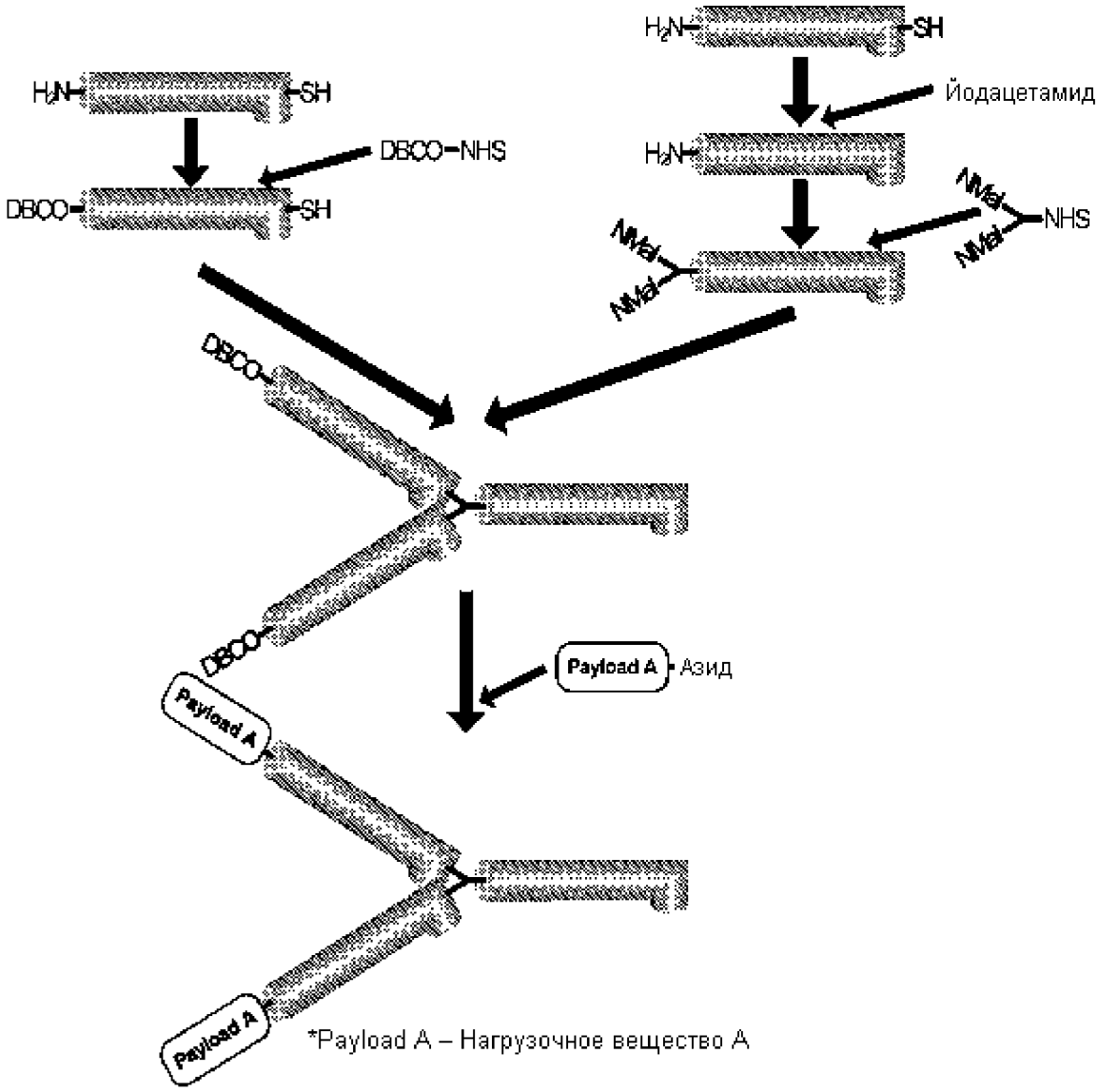
ФИГ. **97**


H2N
SH
Йодацетамид
H2N
DBCO-NHS
DBCO
IA
N3
N3
N3
IA
Нагрузочное вещество А
SH
Нагрузочное вещество А

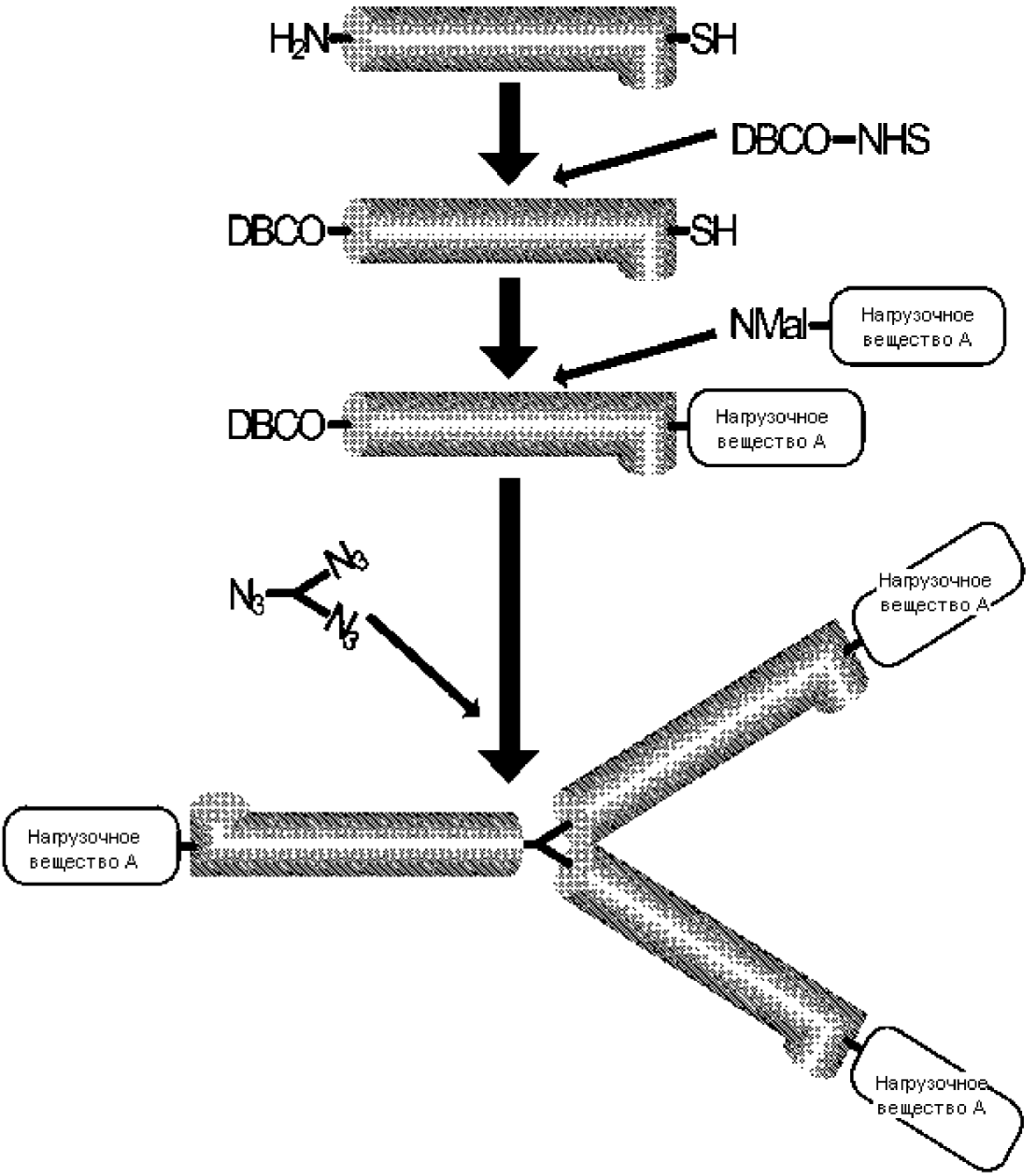
ФИГ. **98**


H2N
SH
NHS
SH
NMal
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество А
H2N
SH
Йодацетамид
H2N
DBCO—NHS
DBCO
Нагрузочное вещество А

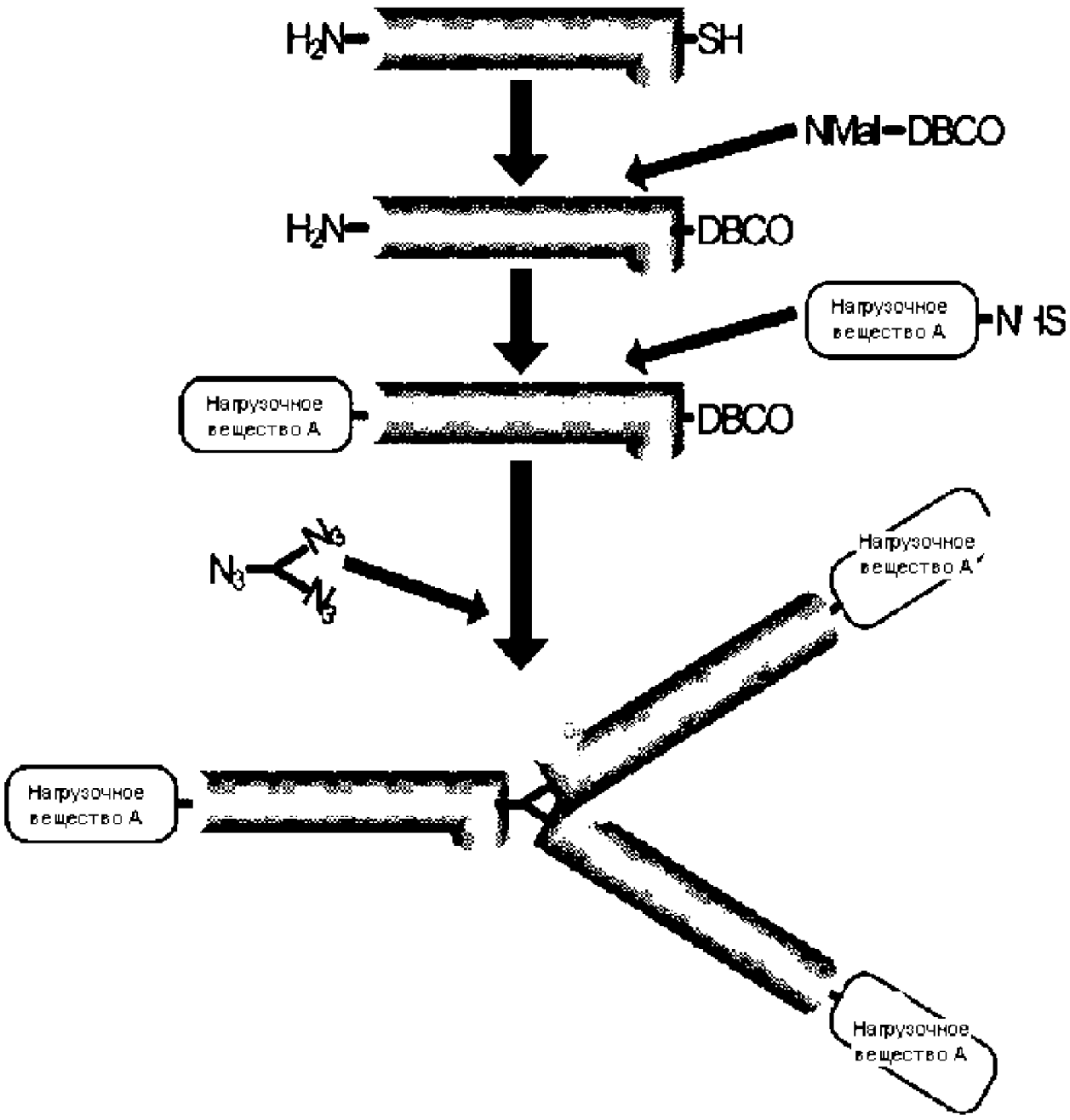
ФИГ. **99**


H2N
SH
DBCO-NHS
DBCO
SH
H2N
SH
Йодацетамид
H2N
NMal
NMal
NHS
NMal
NMal
DBCO
DBCO
Payload A
Азид
Payload A
Payload A
*Payload A – Нагрузочное вещество A

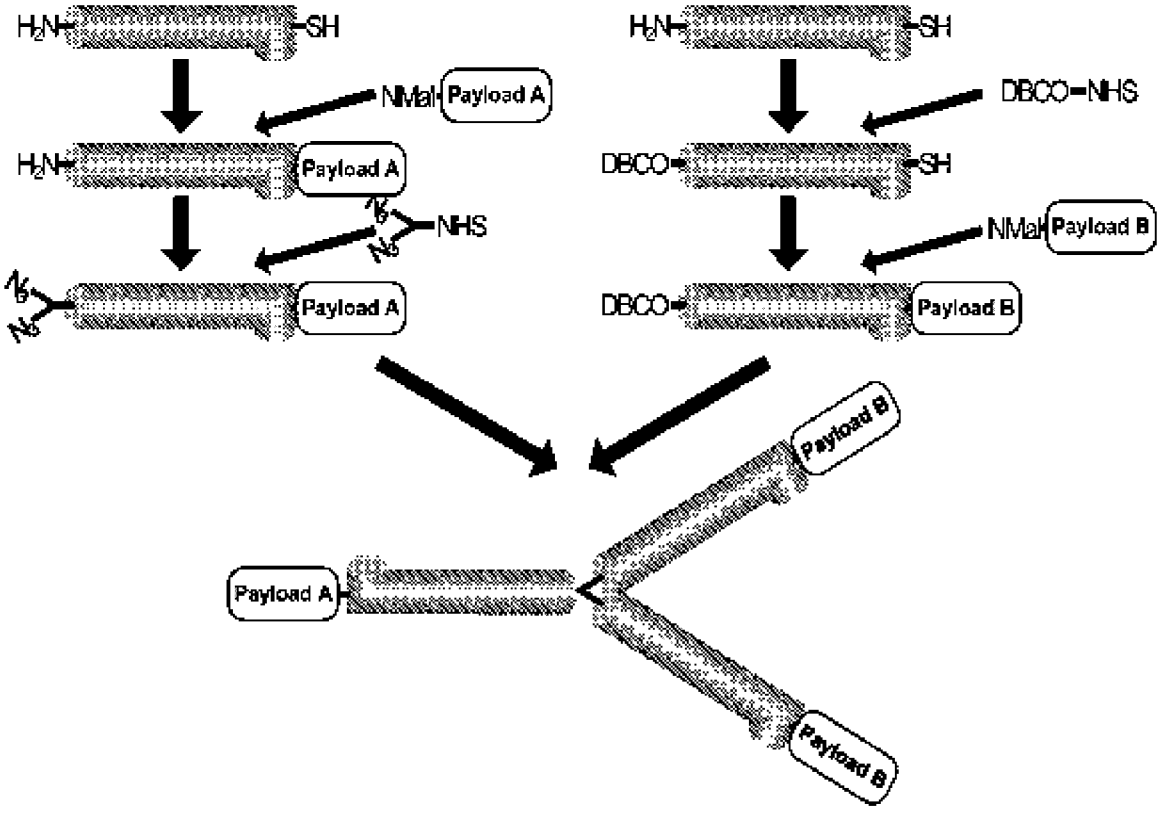
ФИГ. **100**


H2N
SH
DBCO–NHS
DBCO
SH
NMal
Нагрузочное вещество А
DBCO
Нагрузочное вещество А
N3
N3
N3
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество А

ФИГ. **101**

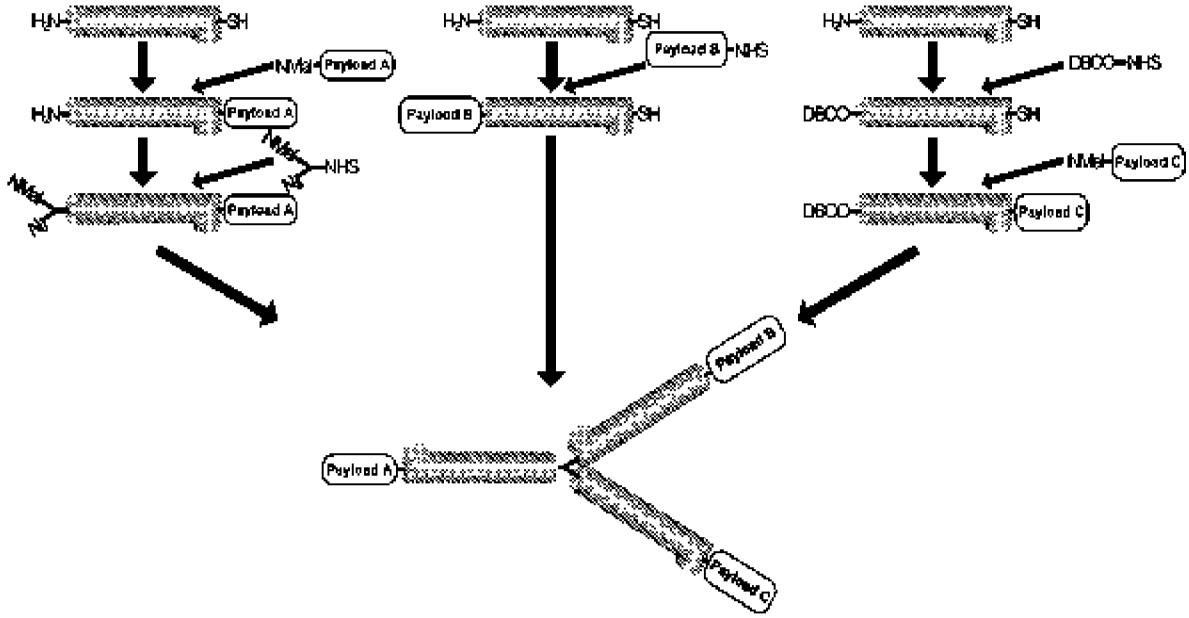

H2N
SH
NMal-DBCO
H2N
DBCO
Нагрузочное вещество А
N HS
Нагрузочное вещество А
DBCO
N3
N3
N3
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество А
Нагрузочное вещество А

ФИГ. **102**



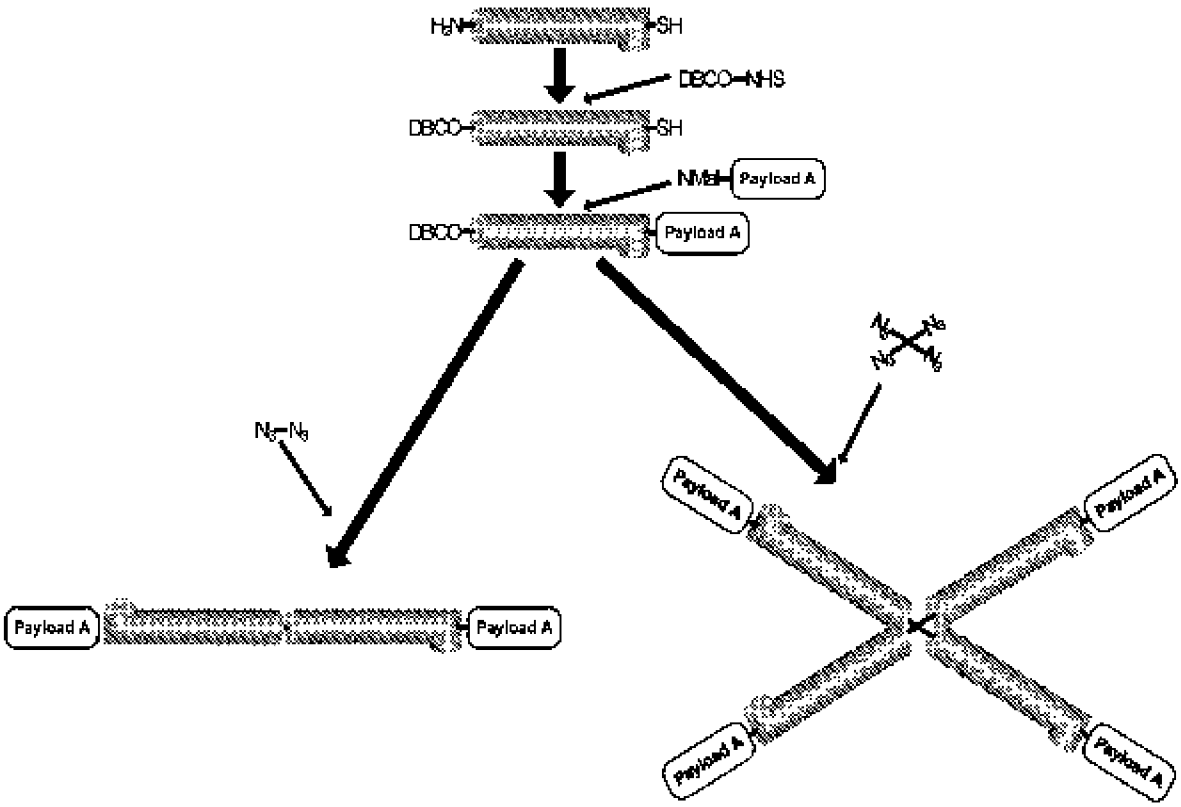
*Payload A, B – Нагрузочное вещество A, B

ФИГ. **103**



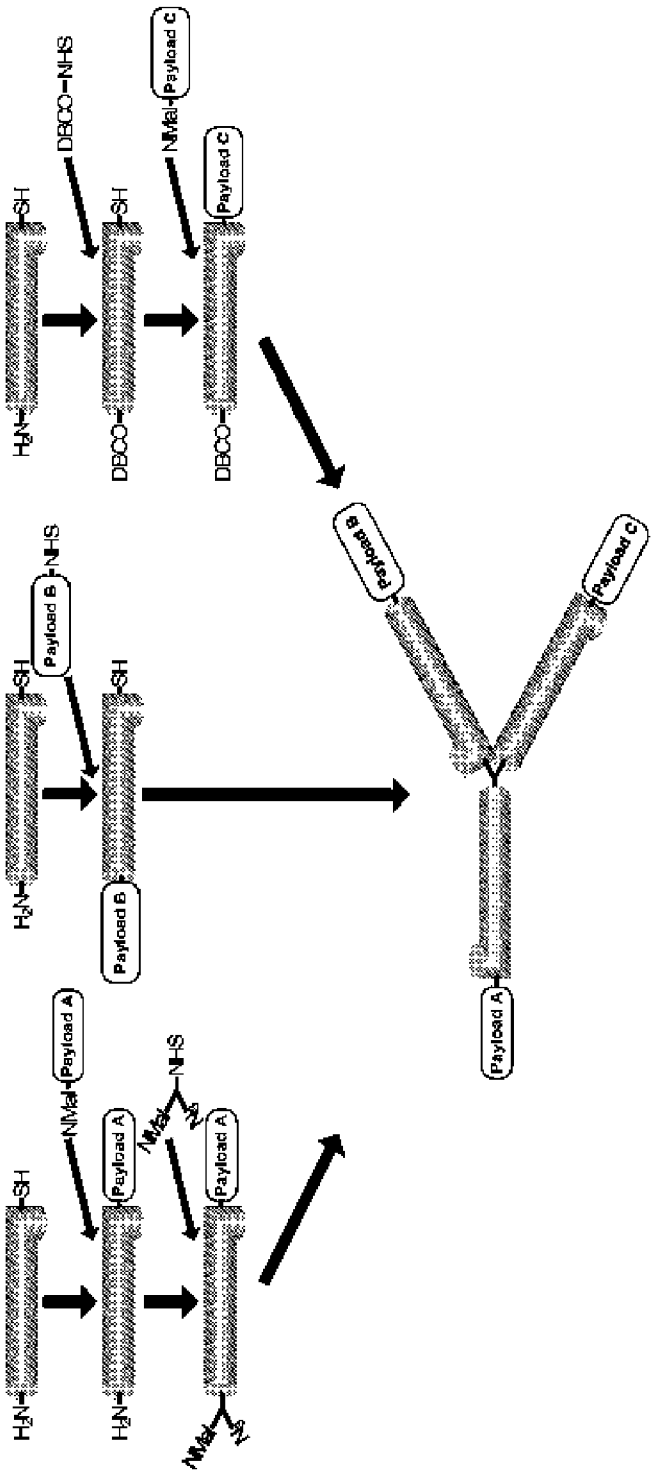
*Payload A, B, C – Нагрузочное вещество A, B, C

ФИГ. **104**



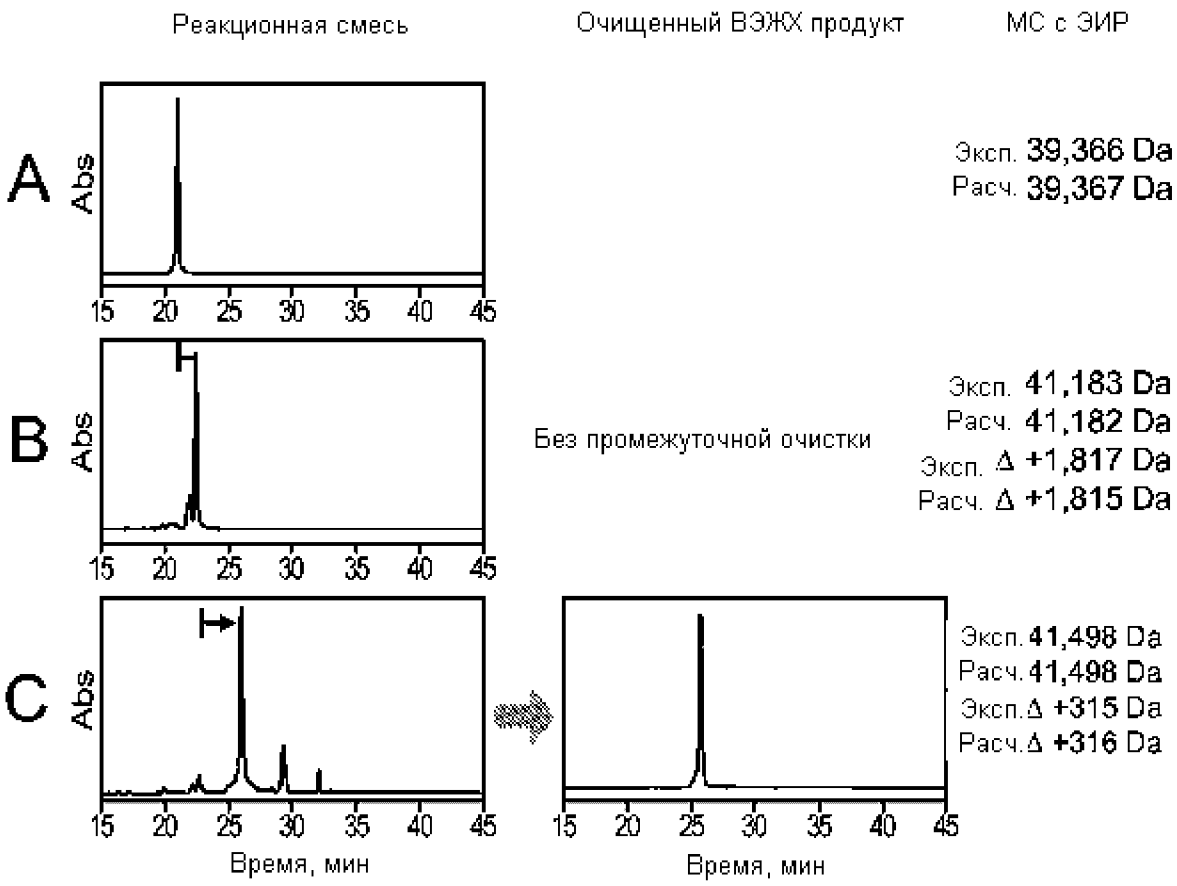
*Payload A – Нагрузочное вещество A

ФИГ. **105**

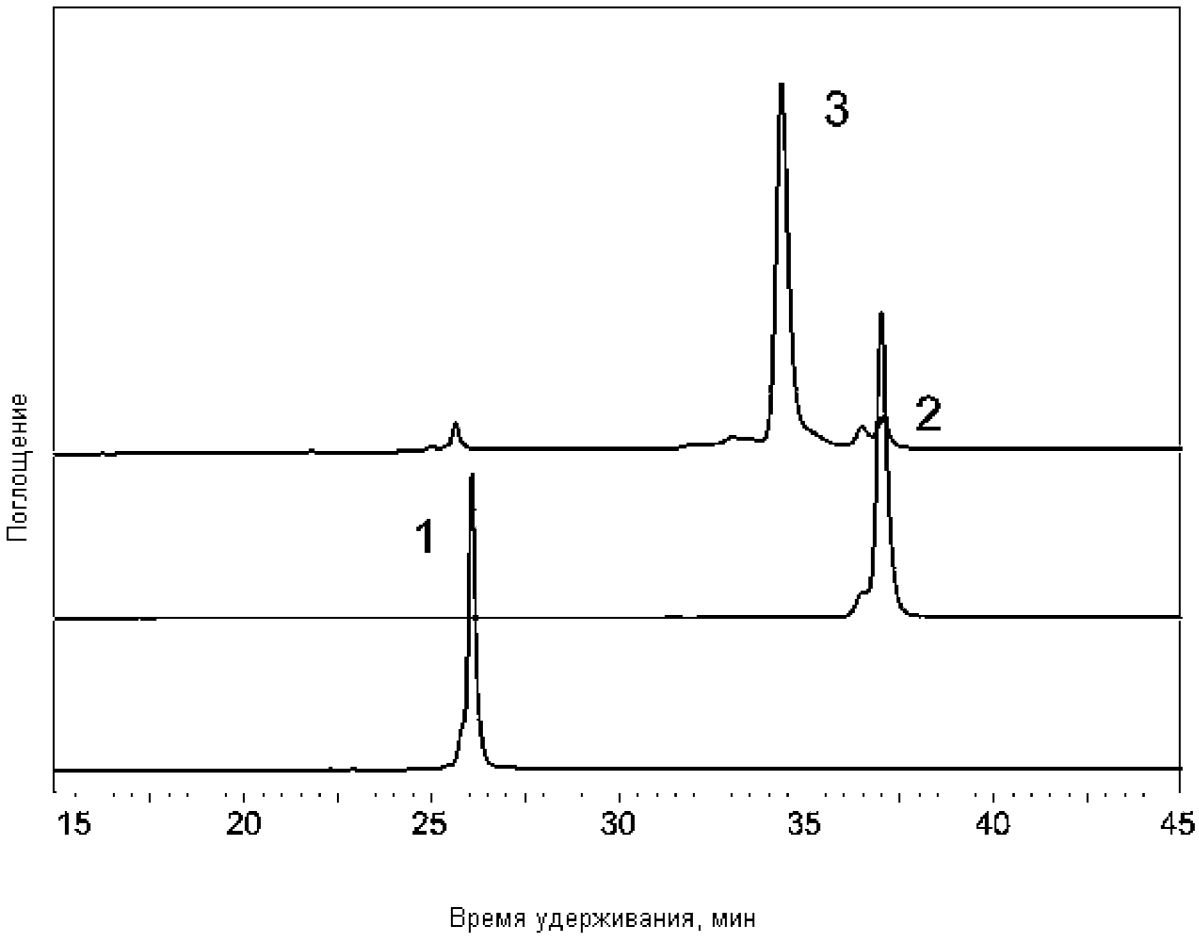


*Payload A, B, C – Нагрузочное вещество A, B, C

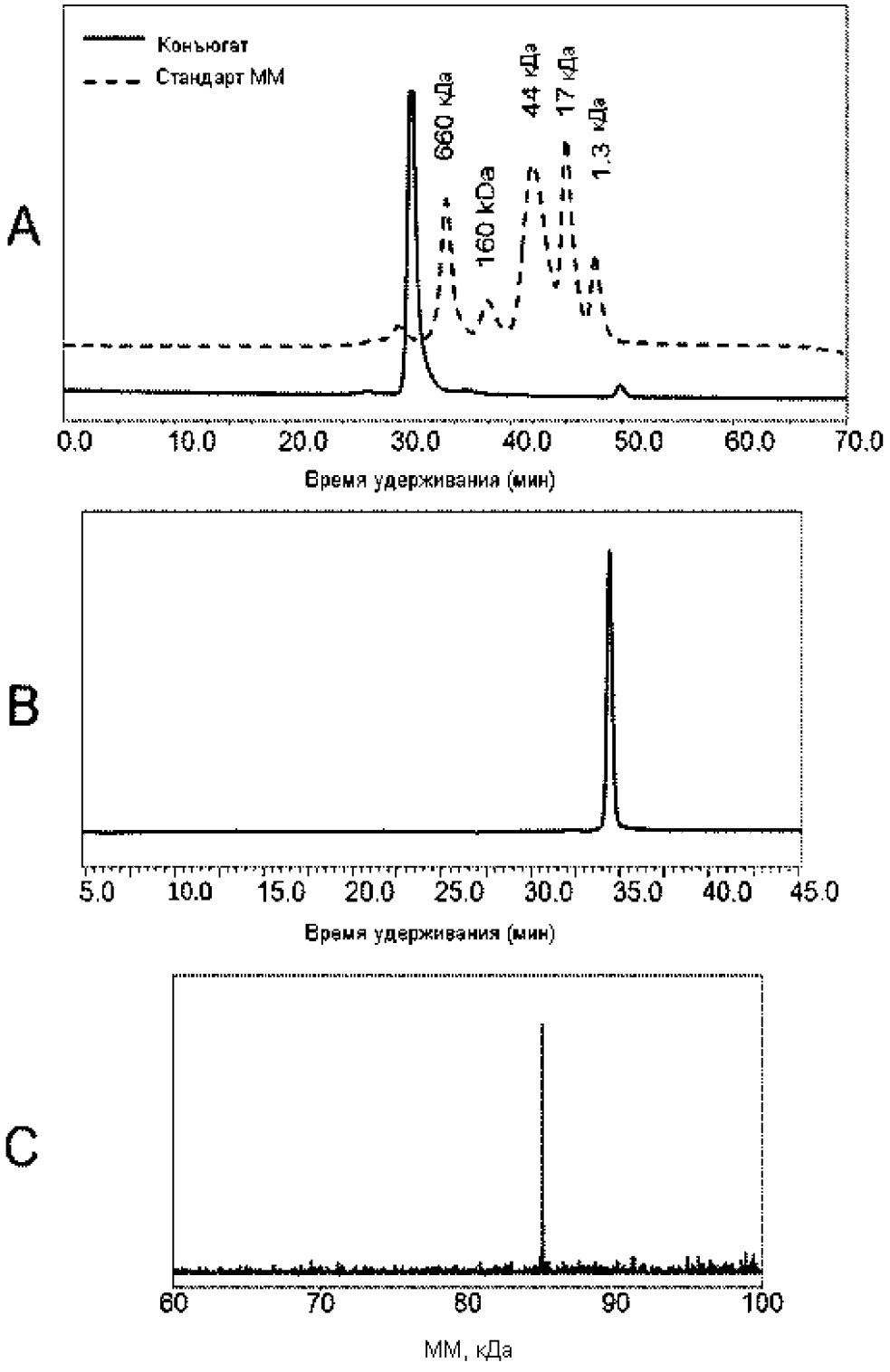
ФИГ. **106**


Реакционная смесь
Очищенный ВЭЖХ продукт
МС с ЭИР
A
Abs
15 20 25 30 35 40 45
Эксп. 39,366 Da
Расч. 39,367 Da
B
Abs
15 20 25 30 35 40 45
Без промежуточной очистки
Эксп. 41,183 Da
Расч. 41,182 Da
Эксп. Δ +1,817 Da
Расч. Δ +1,815 Da
C
Abs
15 20 25 30 35 40 45
Время, мин
15 20 25 30 35 40 45
Время, мин
Эксп. 41,498 Da
Расч. 41,498 Da
Эксп. Δ +315 Da
Расч. Δ +316 Da

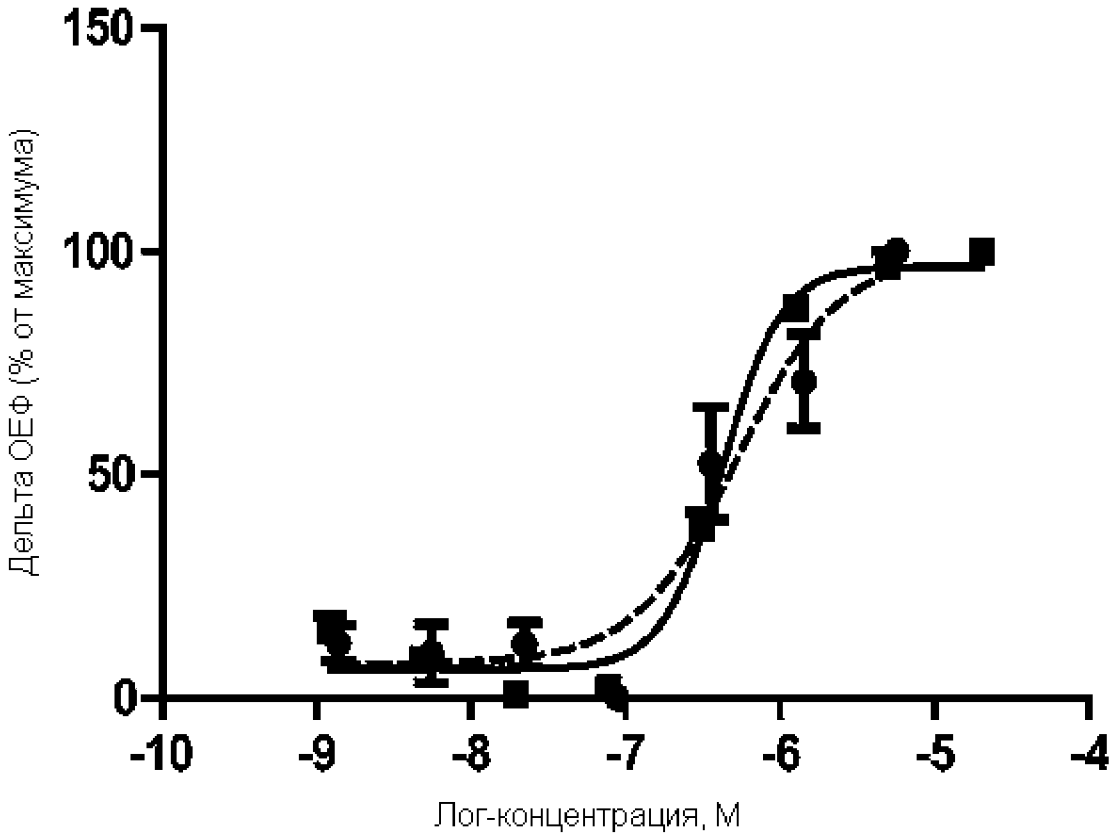
ФИГ. **107**



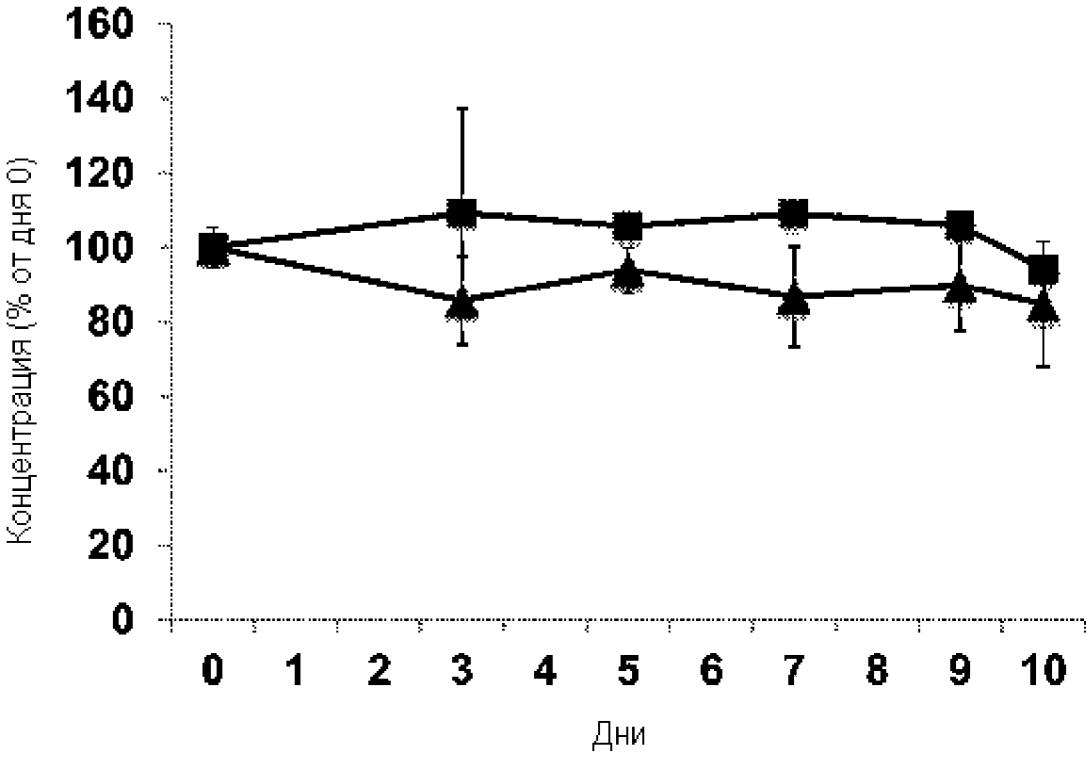
ФИГ. **108**


A
Конъюгат
Стандарт ММ
660 кДа
160 кДа
44 кДа
17 кДа
1.3 кДа
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
Время удерживания (мин)
B
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
Время удерживания (мин)
C
60
70
80
90
100
ММ, кДа

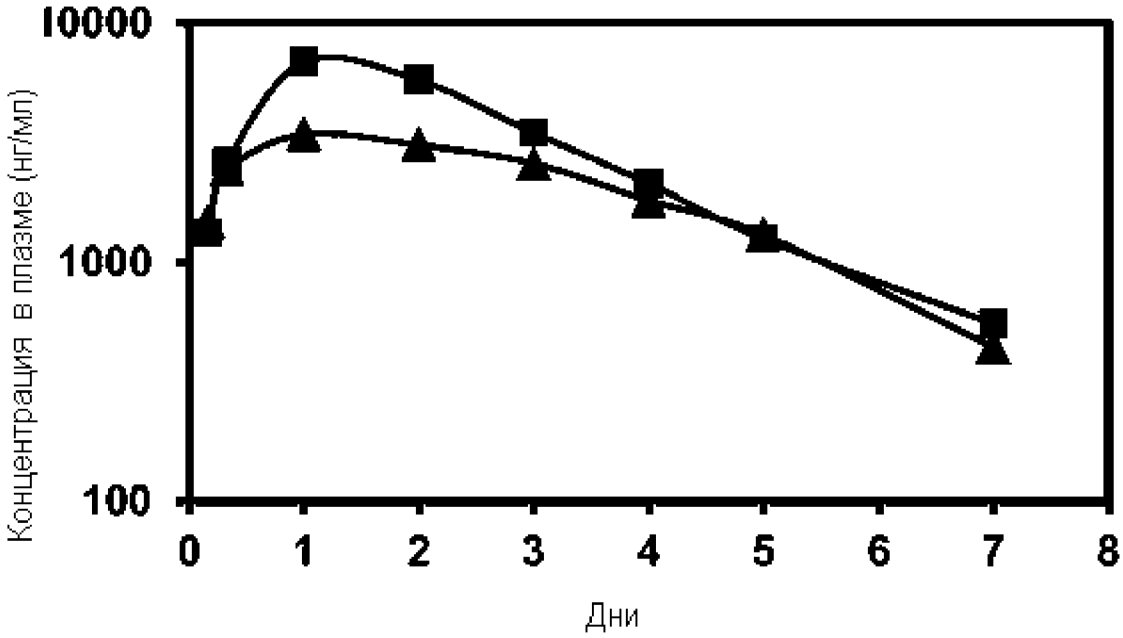
ФИГ. **109**


150
100
50
0
Дельта ОЕФ (% от максимума)
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Лог-концентрация, М

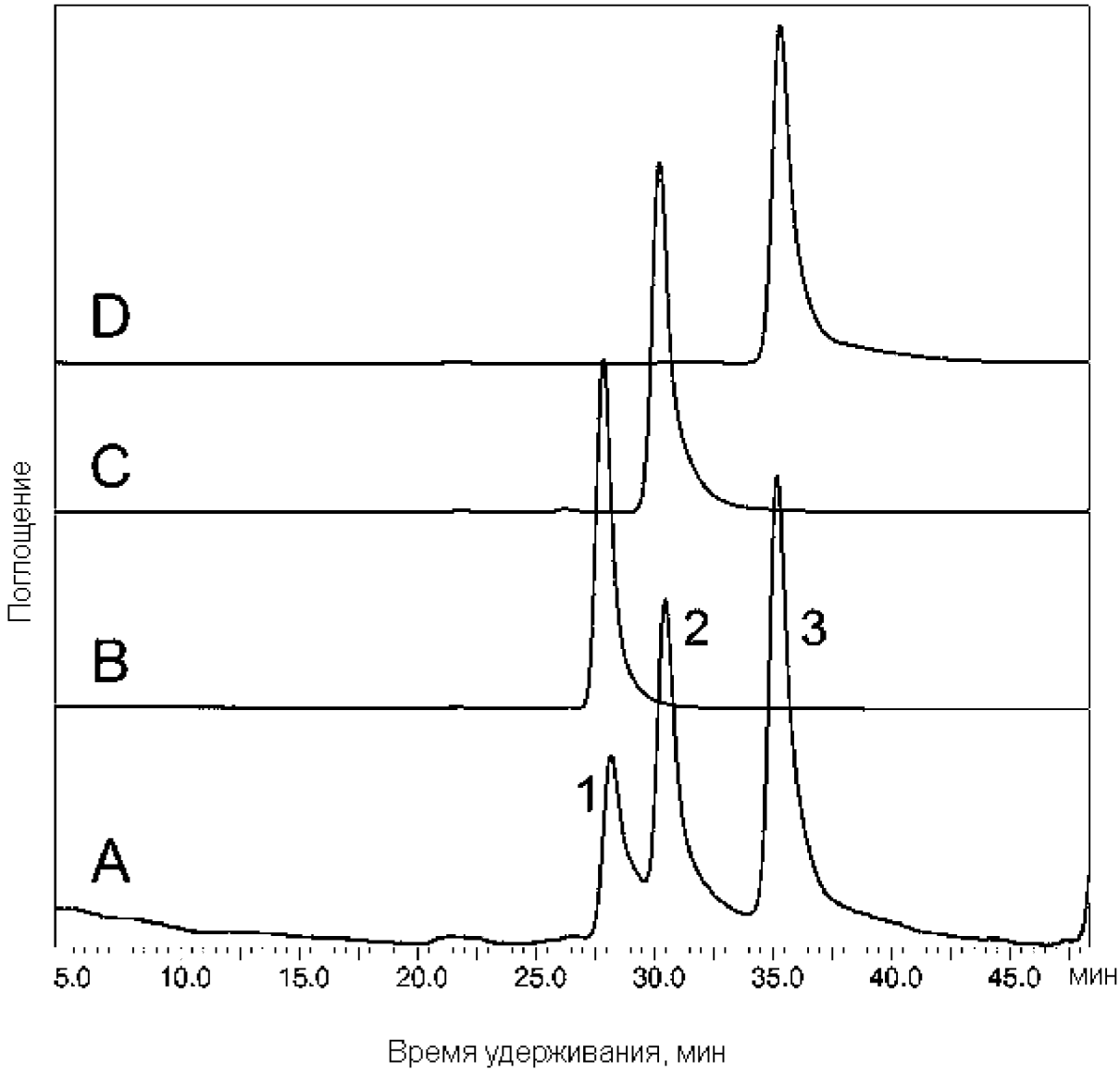
ФИГ. 110


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Концентрация (% от дня 0)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Дни

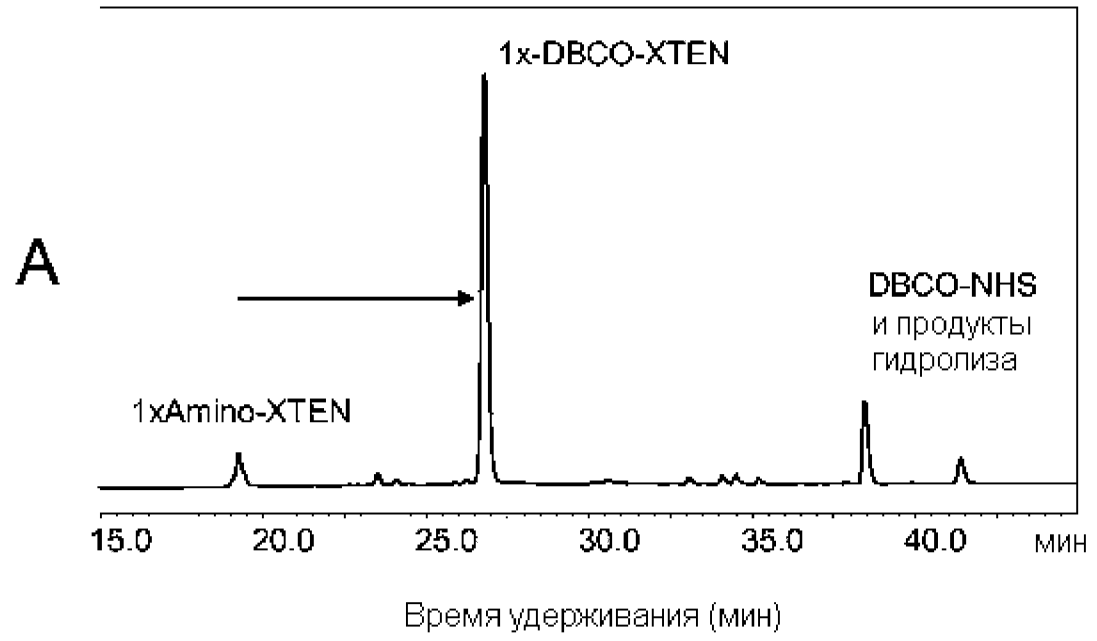
ФИГ. **111**

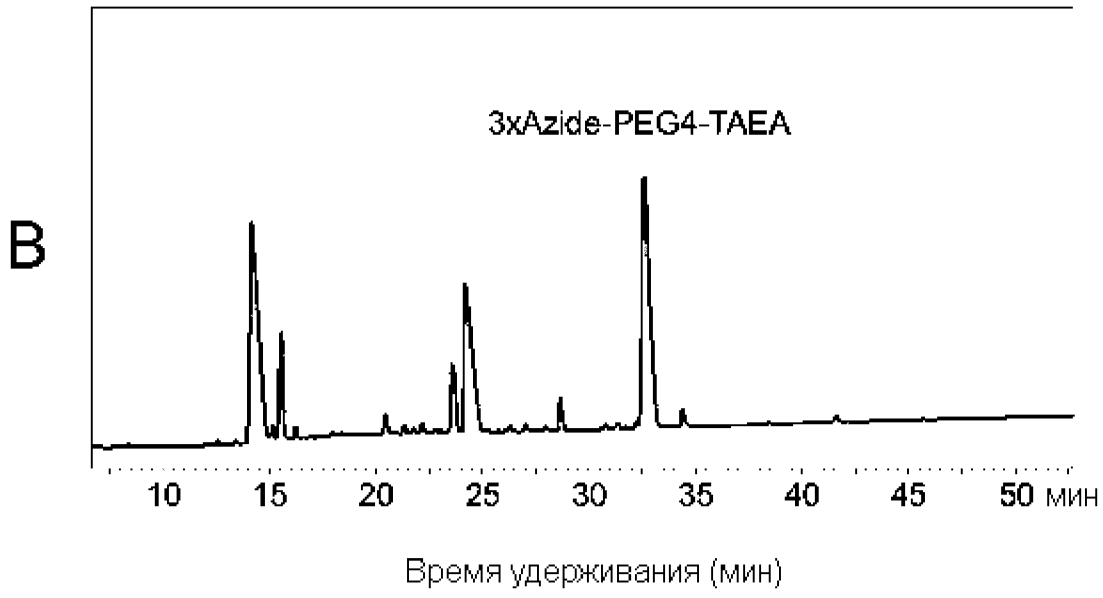


ФИГ. **112**

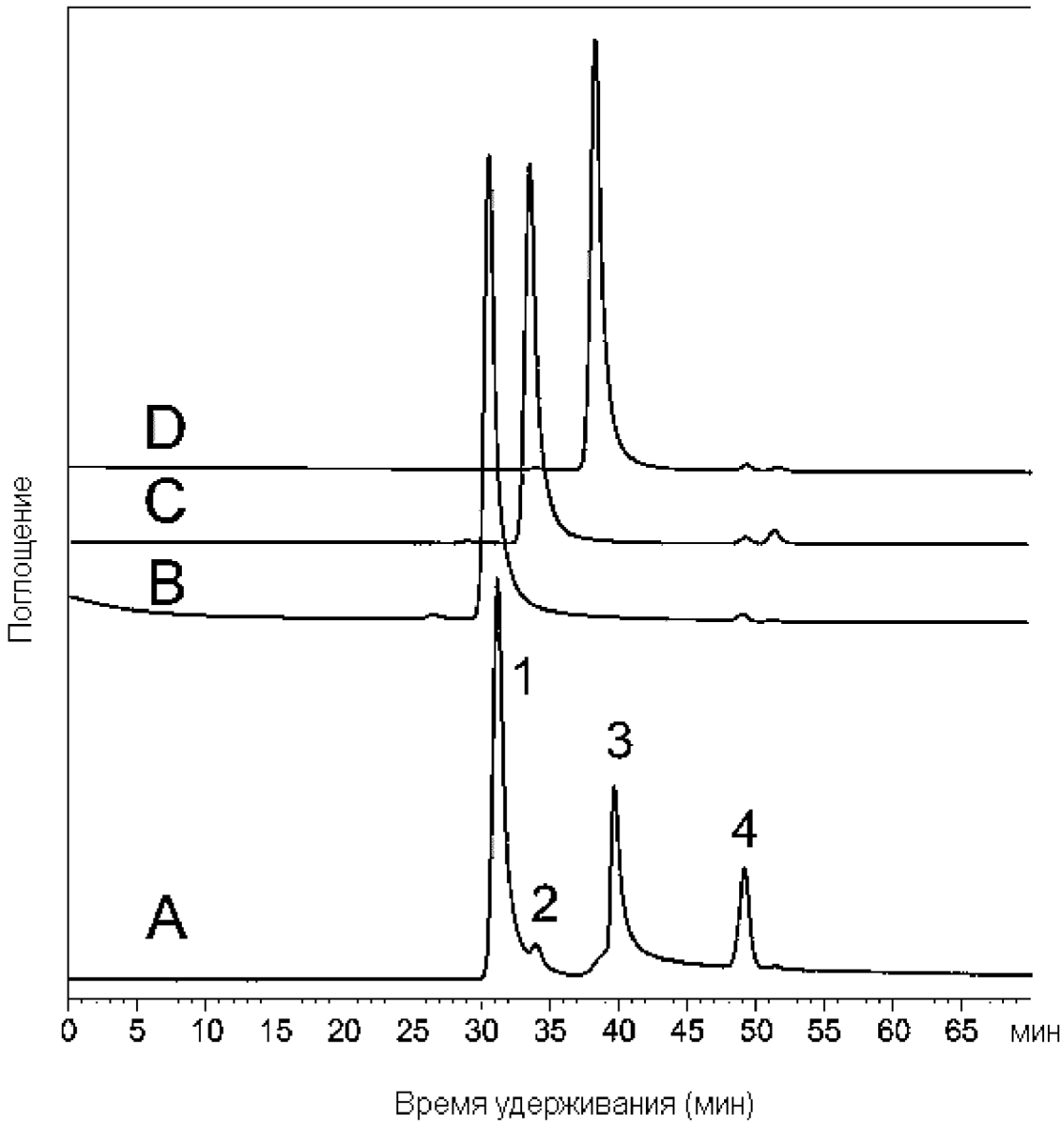

D
C
B
A
1
2
3
Поглощение
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
мин
Время удерживания, мин

ФИГ. **113**

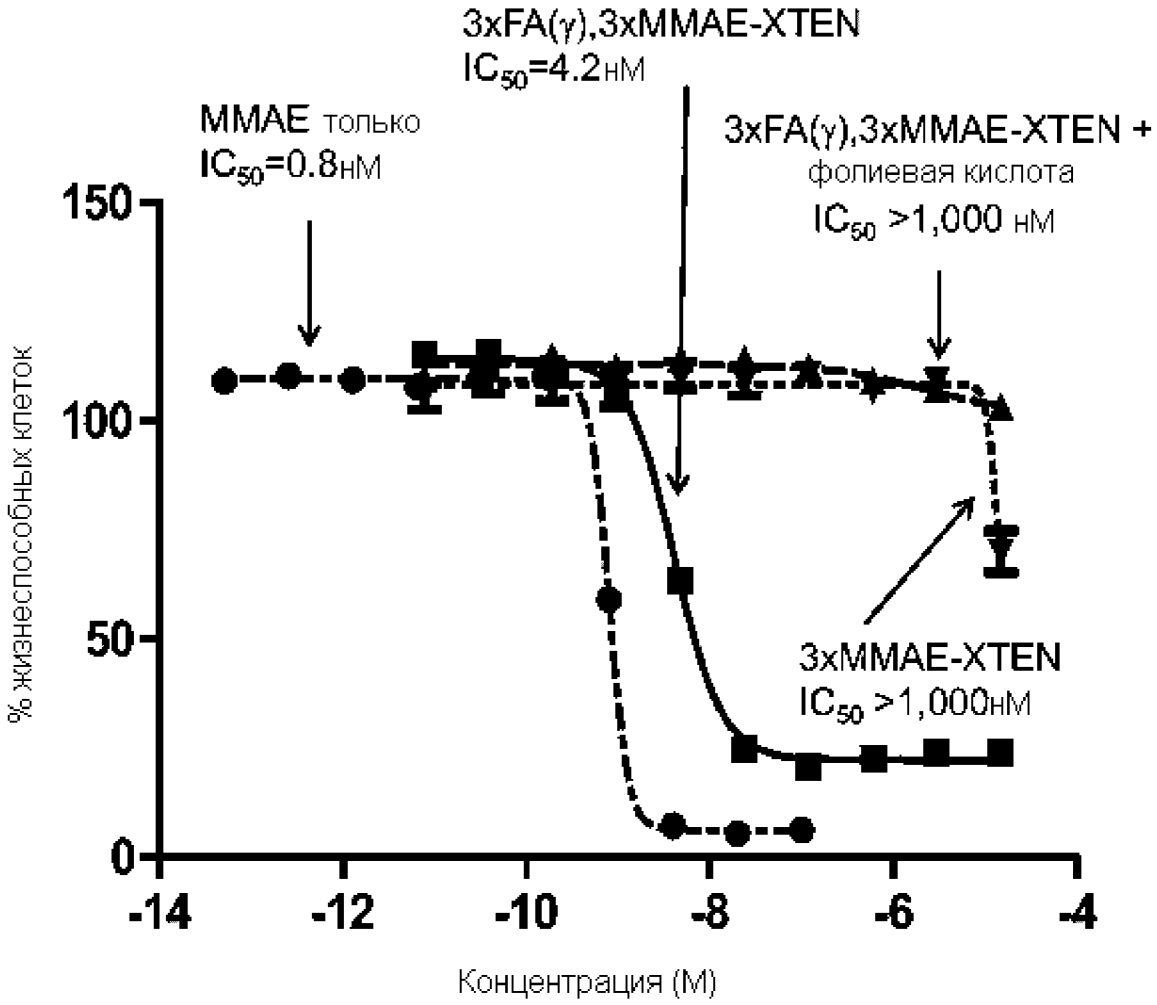

A
1x-DBCO-XTEN
DBCO-NHS
и продукты
гидролиза
1xAmino-XTEN
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
мин
Время удерживания (мин)


B
3xAzide-PEG4-TAEA
10
15
20
25
30
35
40
45
50 мин
Время удерживания (мин)

ФИГ. **114**

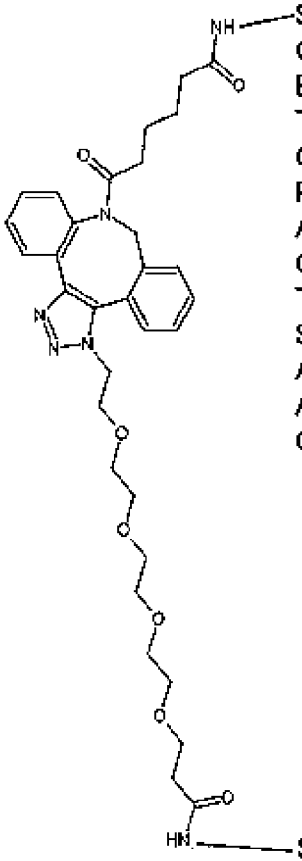

D
C
B
A
1
2
3
4
Поглощение
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 мин
Время удерживания (мин)

ФИГ. **115**


3xFA(γ),3xMMAE-XTEN
IC50=4.2нМ
MMAE только
IC50=0.8нМ
3xFA(γ),3xMMAE-XTEN +
фолиевая кислота
IC50 >1,000 нМ
3xMMAE-XTEN
IC50 >1,000нМ
% жизнеспособных клеток
150
100
50
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (М)

ФИГ. **116**

A



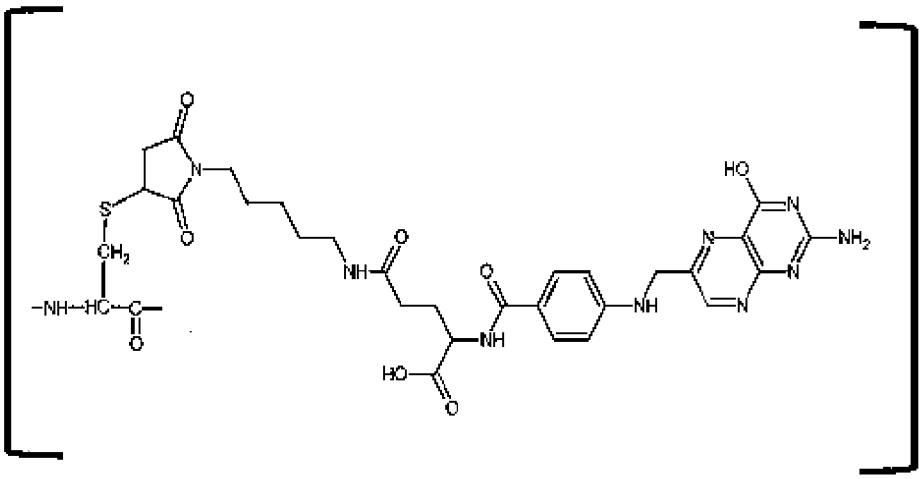
SAGSPTAEAAGXGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATS
GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP
ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES
GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET
PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGXGTAEA
AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT
SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP
AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP
ATSGSETPTAEAA
GXGTAEAASASR

SAGSPTAEAAGZGTAEAAGTSESATPESGPGSEPATS
GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP
ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES
GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET
PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPTAEAAGZGTAEA
AGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT
SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP
AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP
ATSGSETPTAEAAGZGTAEAASASR

ФИГ. **117A**

B

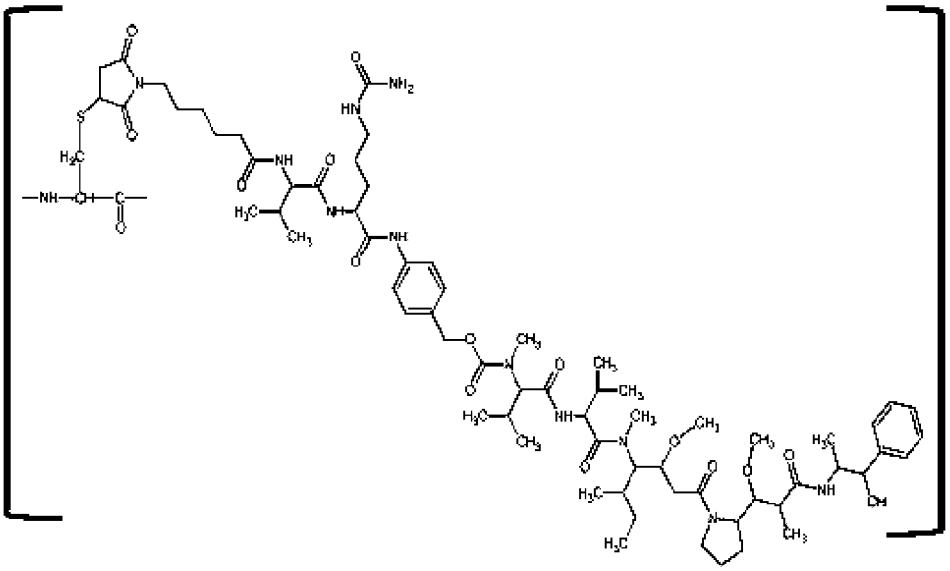
X =



Остаток X = остаток Цис, модифицированный Фолат-γ-Мал

C

Z =



Остаток Z = остаток Цис, модифицированный MC-Вал-Цит-PAB-MMAE

ФИГ. **117B, C**