

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293253 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.24

(22) Дата подачи заявки
2017.05.05

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

(54) ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ GDF15 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/333,886

(32) 2016.05.10

(33) US

(62) 201892561; 2017.05.05

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

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

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

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

A1

202293253

202293253

A1

[0001] ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ GDF15 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к гибридным белкам GDF15. В частности, настоящее изобретение относится к гибриднему белку, содержащему белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок GDF15, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим гибридные белки, рекомбинантным клеткам с ними, а также фармацевтическим композициям, содержащим эти гибридные белки. Также предложены способы продуцирования гибридных белков и применения гибридных белков для лечения метаболических расстройств.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Белок GDF15, член семейства TGF β , - это секретируемый белок, который циркулирует в плазме в виде гомодимера с молекулярной массой 25 кДа. У большинства субъектов уровни белка GDF15 в плазме варьируют в интервале 150-1150 пг/мл (Tsai et al., *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012, 3: 239-243). Уровни белка GDF15 в плазме возрастают в состоянии травмы, при сердечно-сосудистых и определенных типах онкологических заболеваний. Полагают, что данное возрастание обусловлено цитопротекторным механизмом. Высокие уровни белка GDF15 в плазме связаны с потерей массы тела вследствие анорексии и кахексии при онкологических заболеваниях, а также при почечной и сердечной недостаточности. В одном клиническом исследовании уровни белка GDF15 служили в качестве независимого прогностического фактора резистентности к инсулину у субъектов, страдающих ожирением, но не больных диабетом (Kempf et al., *Eur. J. Endo*. 2012, 167: 671-678). Исследование на близнецах показало, что различия в уровнях белка GDF15 в парах близнецов коррелировали с различиями в индексах массы тела (ИМТ) в соответственных парах, подтверждая, что GDF15 служит долгосрочным регулятором энергетического гомеостаза (Tsai et al., *PLoS One*. 2015, 10 (7):e0133362).

[0004] Белок GDF15 был подробно изучен как биомаркер

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

[0005] В многочисленных работах продемонстрировано улучшение переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину в моделях мышей после введения белка GDF15. Две независимых линии трансгенных мышей со сверхэкспрессией GDF15 имели пониженную массу тела и массу жировой ткани, а также улучшенную переносимость глюкозы (Johnen et al., *Nat. Med.* 2007, 13: 1333-1340; Macia et al., *PLoS One.* 2012, 7: e34868; Chrysovergis et al., *Int. J. Obesity.* 2014, 38: 1555-1564). Сообщалось об увеличении полного расхода энергии и окислительного метаболизма у трансгенных мышей с белком GDF15 (Chrysovergis et al., 2014, *Id.*). Это сопровождалось возрастанием экспрессии термогенных генов в бурой жировой ткани и возрастанием экспрессии липолитических генов в белой жировой ткани. Мыши, у которых не хватало гена GDF15, имели увеличенную массу тела и массу жировой ткани (Tsai et al., *PLoS One.* 2013, 8 (2): e55174). Было показано, что содержащий Fc гибридный белок с GDF15 вызывает уменьшение массы тела, а также улучшение переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину на модели яванских макаков,

страдающих ожирением, после еженедельного введения в период шести недель (WO 2013/113008).

[0006] Предполагается, что влияние белка GDF15 на массу тела достигается за счет сокращения потребления пищи и увеличения расхода энергии. GDF15 может улучшать регуляцию гликемии посредством зависимых и не зависимых от массы тела механизмов.

[0007] На основании этих вместе взятых наблюдений можно предполагать, что увеличение уровней GDF15 может оказаться полезным при терапии метаболических заболеваний. Таким образом, в данной области существует потребность в композициях на основе GDF15, которые можно применять для лечения или профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение удовлетворяет данную потребность, предлагая гибридные белки GDF15, которые демонстрируют повышенную растворимость/стабильность и проявляют признаки, указывающие на возможность их применения для лечения или профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний. Такие признаки включают, например, уменьшение массы тела, улучшение переносимости глюкозы, улучшение чувствительности к инсулину у субъекта, которому вводят гибридный белок в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0009] В одном общем аспекте настоящее изобретение относится к гибридному белку, содержащему: (a) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (c) белок GDF15, причем гибридный белок составлен от N-конца до С-конца в порядке (a) – (b) – (c).

[0010] В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления белок GDF15 содержит зрелый белок GDF15 или его функциональный вариант. В более конкретных вариантах осуществления белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную

последовательностям SEQ ID NO: 6-11. В других конкретных вариантах осуществления белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, такую как аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-11.

[0011] В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. В других конкретных вариантах осуществления белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

[0012] В одном варианте осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой гибкий линкер. В конкретных вариантах осуществления гибкий линкер содержит последовательность (GGGGS) n , где n составляет от 2 до 20, предпочтительно от 4 до 10. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения линкер гибридного белка представляет собой структурированный линкер. В конкретных вариантах осуществления структурированный линкер содержит последовательность (AP) n или (EAAAK) n , где n составляет от 2 до 20, предпочтительно от 4 до 10.

[0013] В вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70. В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

[0014] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение

относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок настоящего изобретения.

[0015] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения.

[0016] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения.

[0017] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования гибридного белка настоящего изобретения. При этом способ включает в себя этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок, и (2) выделяют гибридный белок, продуцированный клеткой-хозяином.

[0018] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

[0019] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0020] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему фармацевтическую композицию настоящего изобретения.

[0021] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния, причем способ включает введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции настоящего изобретения. В конкретном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно или внутривенно.

[0022] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения способ лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, содержит введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70, и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0023] Другие аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0024] Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения, будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми чертежами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0025] На чертежах показано следующее.

[0026] На Фиг. 1A и 1B показана кристаллическая структура GDF15, в которой дисульфидные мостики между первым и вторым остатками цистеина (C1-C2) образуют петлю на N-конце этого белка.

[0027] На Фиг. 2 показано влияние подкожного введения гибридных белков в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, например, гибридных белков FP1 (SEQ ID NO: 60) и 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 с гексагистидиновой меткой

(6xHis), присоединенной на N-конце), на потребление пищи мышами линии C57BL/6; показано суммарное потребление пищи за 24 часа после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)), $\pm$ SEM (стандартная погрешность средней величины); N=по 8 животных в группе во всех группах, за исключением группы с N=9, получавшей FP1, 16 нмоль/кг. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0028] На Фиг. 3 показано влияние подкожного введения FP1 и 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 с гексагистидиновой меткой (6xHis), присоединенной на N-конце), на потребление пищи крысами линии Спрег-Дули; показано суммарное потребление пищи за 48 часов после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (PBS) $\pm$ SEM; N=по 8 животных в группе. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0029] На Фиг. 4 показано изменение массы тела у мышей с алиментарным ожирением (DIO) во время введения FP1. Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (день 0); N=по 8 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0030] На Фиг. 5А и 5В показаны уровни глюкозы в крови мышей DIO, измеренные в пероральном тесте на переносимость глюкозы (OGTT), проведенном через 14 дней, в которые дозу FP1 вводили каждые 3 дня (q3d), причем уровни выражены в виде площади под кривой (AUC). N=по 8 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в

контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0031] На Фиг. 6 показаны уровни глюкозы в крови мышей DIO, измеренные после еды, во время введения FP1. $N=$ по 8 животных в группе. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0032] На Фиг. 7 показана оценка резистентности к инсулину на основе гомеостатической модели (HOMA-IR) у мышей DIO после 4 часов голодания, проведенная через 14 дней, в которые вводили FP1. $N=$ по 8 животных в группе. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0033] На Фиг. 8 показано изменение массы тела у мышей *ob/ob* во время введения FP1 каждые 3 дня (q3d). Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (день 0); $N=$ по 9 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0034] На Фиг. 9 показаны уровни глюкозы в крови мышей *ob/ob* во время введения FP1. Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (день 0); $N=$ по 9 животных в группе. * $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$ для группы с дозой FP1 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0035] На Фиг. 10 показана зависимость от времени средней ($\pm$ стандартное отклонение, CO) концентрации лекарственного средства

FP1 в сыворотке после внутривенного (в/в) и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг мышам линии C57Bl/6.

[0036] На Фиг. 11 показана зависимость от времени средней ($\pm$ CO) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после в/в и п/к введения 2 мг/кг крысам линии Спрег-Джули.

[0037] На Фиг. 12 показана зависимость от времени средней ($\pm$ CO) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после в/в и п/к введения 1 мг/кг яванским макакам, в соответствии с определениями иммунологическим методом.

[0038] На Фиг. 13 показана зависимость от времени концентрации FP1 (нг/мл) в виде интактного димера в сыворотке после однократного в/в введения яванским макакам, в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата (IA)/жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХМС).

[0039] На Фиг. 14 показана зависимость от времени концентрации FP1 (нг/мл) в виде интактного димера в сыворотке после однократного п/к введения яванским макакам, в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

[0040] На Фиг. 15 показана концентрация FP1, представленная в процентах (%) от исходной концентрации, через 0, 4, 24 и 48 часов после инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (Sub), в соответствии с определениями иммунологическим методом.

[0041] На Фиг. 16 показана средняя концентрация FP1 в виде интактного димера, представленная в процентах (%) от концентрации в момент времени 0, через 0, 4, 24 и 48 часов после инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (Sub), в соответствии с определениями интактного вещества методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

[0042] На Фиг. 17 показано быстрое потребление пищи перед и после однократного введения тощим мышам-самцам линии C57BL/6N белка GDF15 с различными вариантами N-концевой делеции (SEQ ID NO: 92, 111 и 112), по сравнению с диким типом гибрида без делеции (SEQ ID 26 с меткой 6x His, присоединенной на N-конце). N=по 8 животных в группе; * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в

контроле; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0043] На Фиг. 18 показано влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи мышами линии C57BL/6; в частности, показано суммарное потребление пищи за 24 часа после введения. Цифры, показанные внутри виде столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS (среднее $\pm$ SEM); N =по 8 животных в группе во всех группах, за исключением группы с $N=6$, получавшей 6xHis-FP1. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Даннетта для множественных сравнений.

[0044] На Фиг. 19 показано суммарное потребление пищи, измеренное у крыс линии Спрег-Доули за 24 часа после введения однократной дозы FP2. Цифры, показанные внутри виде столбцов, означают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS (среднее $\pm$ SEM); N =по 8 животных в группе. ** $p < 0,01$; значения p рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0045] На Фиг. 20 показано процентное изменение массы тела мышей DIO во время введения FP2 по схеме q3d. Стрелки указывают время подкожных инъекций FP2; N =по 6 животных в группе; * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0046] На Фиг. 21 А и 21 В показана площадь под кривой (AUC) для уровней концентрации глюкозы в крови, измеренных в тесте OGTT через 14 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений, N =по 8 животных в группе.

[0047] На Фиг. 22А показаны уровни инсулина в плазме, измеренные в тесте OGTT через 8 дней, в которые мышам DIO

вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, носитель в контроле, по сравнению с группами, получавшими FP2 (0,3 нмоль/кг); FP2 (10 нмоль/кг); и розиглитазон. # $p < 0,05$, по сравнению с группой, получавшей розиглитазон (10 мг/кг), с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

[0048] На Фиг. 22В показана AUC для уровней инсулина в плазме, измеренных в тесте OGTT через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$, по сравнению с группой, получавшей розиглитазон.

[0049] На Фиг. 23 показаны уровни глюкозы в крови, измеренные после еды, через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, N=по 8 животных в группе.

[0050] На Фиг. 24 показана оценка НОМА-IR у мышей DIO после 5 часов голодания, проведенная через 14 дней, в которые вводили FP2 по схеме q3d. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

[0051] На Фиг. 25 показаны концентрации FP2 в сыворотке после внутривенного (в/в) введения 2 мг/кг и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг мышам линии C57Bl/6. Значения представляют собой среднее $\pm$ CO (N=5 проб на каждый момент времени).

[0052] На Фиг. 26 показаны концентрации FP2 в сыворотке после внутривенного (в/в) введения 2 мг/кг и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули. N=5 проб на каждый момент времени.

[0053] На Фиг. 27 показана концентрация FP2 в плазме у яванских макак, в соответствии с определениями иммунологическим методом. Значения представляют собой среднее $\pm$ CO при N=3, за исключением N=2 при в/в введении, на день 22 (через 528 часов).

в/в – внутривенно, п/к – подкожно.

[0054] На Фиг. 28 показана концентрация FP2 в виде интактного димера в плазме у яванских макаков, в соответствии с определениями методом ЖХМС. Значения представляют собой среднее $\pm$ SEM при N=3, за исключением N=2 при подкожном (п/к) введении через 168 часов, N=1 при п/к введении через 120 часов и 432 часа. и N=1 при внутривенном (в/в) введении через 168 часов и 432 часа.

[0055] На Фиг. 29 показана стабильность *ex vivo* FP2 в человеческой плазме (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, в соответствии с определениями иммунологическим методом.

[0056] На Фиг. 30 показана стабильность *ex vivo* FP2 в человеческой плазме (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, в соответствии с определениями методом ЖХМС.

[0057] На Фиг. 31 показаны кривые зависимости от концентрации для FP2 и гетеродимера HSA-GDF15:GDF15, полученные с помощью анализа рАКТ в клетках SK-N-AS, экспрессирующих рекомбинантный человеческий рецептор GFRAL (N=3).

[0058] На Фиг. 32 показано суточное потребление пищи (г) яванскими макаками перед и после введения однократной дозы FP1. * $p < 0,05$, для группы с дозой FP1 10 мг/кг, по сравнению с носителем в контроле.

[0059] На Фиг. 33 показано изменение массы тела яванских макаков в процентах перед и после введения однократной дозы FP1. * $p < 0,05$, для группы с дозой FP1 10 мг/кг, по сравнению с носителем в контроле; # $p < 0,05$, для дозы 3 мг/кг, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

[0060] На Фиг. 34 показано суточное потребление пищи (г) яванскими макаками перед и после введения однократной дозы FP2. * $p < 0,05$, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных

в группе.

[0061] На Фиг. 35 показано изменение массы тела яванских макаков в процентах перед и после введения однократной дозы FR2. * $p < 0,05$, для группы с дозой FR2 10 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле, # $p < 0,05$, для дозы FR2 3 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле, & $p < 0,05$, для дозы FR2 1 нмоль/кг, по сравнению с носителем в контроле, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0062] В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

[0063] Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они полностью излагались в настоящем документе. Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0064] Настоящее изобретение относится к гибриднему белку, содержащему (a) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (c) белок GDF15, причем гибридный белок составлен от N-конца

до С-конца в порядке (a) – (b) – (c) .

[0065] Оказалось, что гибридный белок в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, содержащий белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок GDF15, продлевает период полужизни белка GDF15, причем гибридные белки настоящего изобретения показывают метаболические эффекты, которые демонстрируют пригодность их применения в качестве терапевтических средств для лечения и профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний. Подобные эффекты включают, без ограничения, снижение массы тела, улучшение переносимости глюкозы и улучшение чувствительности к инсулину у животных, которым вводили гибридные белки.

[0066] Используемый в настоящем документе термин «гибридный белок» относится к белку, имеющему две или более частей, ковалентно связанных вместе, при этом каждая из частей происходит от разных белков.

[0067] Гибридные белки в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения могут включать любой белок GDF15. Используемый в настоящем документе термин «белок GDF15» относится к любому природному белку дикого типа из семейства ростового фактора дифференцировки 15 или любому его функциональному варианту. Белок GDF15 может происходить от любого млекопитающего, такого как человек или другое приемлемое млекопитающее, такое как мышь, кролик, крыса, свинья, собака или примат. В конкретных вариантах осуществления белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант. В предпочтительных вариантах осуществления белок GDF15 представляет собой зрелый белок GDF15 или его функциональный вариант.

[0068] Используемый в настоящем документе термин «зрелый белок GDF15» относится к части пре-про-белка GDF15, которая отделяется от полноразмерного белка после внутриклеточного расщепления по сайту расщепления RXXR, подобному сайту расщепления фурина. Зрелые белки GDF15 секретируются как гомодимеры, связанные через дисульфидные мостики. В одном варианте осуществления настоящего изобретения зрелый белок

GDF15, кратко именуемый GDF15(197-308) (SEQ ID NO: 6), содержит аминокислоты 197-308 из полноразмерного человеческого белка GDF15.

[0069] Используемый в настоящем документе термин «функциональный вариант» относится к варианту родительского белка, имеющему существенную или значительную степень идентичности с родительским белком и сохраняющему по меньшей мере одну из биологических активностей родительского белка. Функциональный вариант родительского белка можно приготавливать способом, известным в данной области, в контексте настоящего описания. Функциональный вариант может включать одну или более модификаций аминокислотной последовательности родительского белка. Модификации могут изменять физико-химические свойства полипептида, например, улучшать термостабильность полипептида, изменять специфичность субстрата, изменять оптимум pH и т. п. Модификации также могут изменять биологические активности родительского белка при условии, что они не уничтожают или не подавляют все биологические активности родительского белка.

[0070] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения функциональный вариант родительского белка содержит замену, предпочтительно консервативную замену аминокислот родительского белка, которая не оказывает значительного влияния на биологическую активность родительского белка. Консервативные замены включают, без ограничения, замены аминокислот в пределах группы основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), кислых аминокислот (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота), полярных аминокислот (глутамин и аспаргин), гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин и валин), ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан и тирозин) и малых аминокислот (глицин, аланин, серин, треонин и метионин). Необычные или искусственные аминокислоты (такие, как 4-гидроксипролин, 6-N-метиллизин, 2-аминоизомасляная кислота, изовалин и альфа-метилсерин) также можно применять для замены стандартных аминокислотных остатков в родительском белке.

[0071] В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения функциональный вариант родительского

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

[0072] В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения функциональный вариант родительского белка содержит замену, предпочтительно консервативную замену аминокислот, и делецию и/или вставку, предпочтительно малую делецию и/или вставку аминокислот, в родительском белке.

[0073] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения гибридный белок изобретения содержит белок GDF15, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности зрелого белка GDF15, такой как GDF15(197-308) (SEQ ID NO: 6); или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности зрелого белка GDF15, усеченной на N-конце, такой как GDF15(200-308) (SEQ ID NO: 7), GDF15(201-308) (SEQ ID NO: 8), GDF15(202-308) (SEQ ID NO: 9), GDF15(203-308) (SEQ ID NO: 10) или GDF15(211-308) (SEQ ID NO: 11). Белок GDF15 может иметь по меньшей мере одну из замен, вставок и делеций в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11, при условии, что он сохраняет по меньшей мере одну из биологических активностей белка GDF15, таких как его влияние на потребление пищи, уровни глюкозы в крови, резистентность к инсулину, массу тела и т. п.

[0074] В конкретных вариантах осуществления гибридный белок настоящего изобретения содержит белок GDF15, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, включая, без ограничения, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11.

[0075] В гибридных белках в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно применять любой приемлемый белок, продлевающий период полужизни. Используемый в

настоящем документе термин «белок, продлевающий период полужизни» может обозначать любой белок или его фрагмент, о котором известно, что он продлевает период полужизни белков, с которыми его соединяют. Примеры таких белков, продлевающих период полужизни, включают, без ограничения, человеческий сывороточный альбумин (HSA), домен константной области (Fc) иммуноглобулина (Ig) или трансферрин (Tf). В вариантах осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит HSA или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит HSA или его функциональный вариант, в котором остаток цистеина в положении 34 молекулы HSA заменен серином или аланином.

[0076] В конкретных вариантах осуществления гибридный белок настоящего изобретения содержит белок, продлевающий период полужизни, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

[0077] В гибридных белках в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно применять любой приемлемый линкер. Используемый в настоящем документе термин «линкер» относится к связывающему компоненту, содержащему пептидный линкер. Предпочтительно, чтобы линкер помогал обеспечивать правильную укладку, минимизировать стерические препятствия и не нарушал существенным образом структуру каждого функционального компонента в пределах гибридного белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептидный линкер содержит 2-120 аминокислот. Например, пептидный линкер содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95,

96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 или 120 аминокислот.

[0078] В вариантах осуществления настоящего изобретения линкер повышает гибкость компонентов гибридного белка. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения линкер может представлять собой гибкий линкер, содержащий последовательность (GGGGS)_n, включая, без ограничения, GS-(GGGGS)_n или AS-(GGGGS)_n-GT, где n составляет от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

[0079] В других вариантах осуществления настоящего изобретения линкер структурирован. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения линкер может представлять собой структурированный линкер, содержащий последовательность (AP)_n или (EAAAK)_n, включая, без ограничения, AS-(AP)_n-GT или AS-(EAAAK)_n-GT, где n составляет от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В других вариантах осуществления настоящего изобретения линкер содержит последовательности (GGGGA)_n, (PGGGS)_n, (AGGGS)_n или GGS-(EGKSSGSGSESKST)_n-GGS, где n составляет от 2 до 20.

[0080] В вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 и 64-75. В более конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-56, 55-56, 59-60 и 70. В дополнительных более конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 26. Гибридный белок может также включать малое удлинение (удлинения) на аминном или карбоксильном конце белка, такое как метка, упрощающая очистку,

например, полигистидиновая метка, антигенный эпитоп или связывающий домен.

[0081] Описанный в настоящем документе гибридный белок можно характеризовать или оценивать по биологическим активностям GDF15, включая, без ограничения, влияние на потребление пищи, пероральные тесты на переносимость глюкозы, измерения уровней глюкозы в крови, анализ на резистентность к инсулину, изменения массы тела, фармакокинетический анализ, токсикокинетический анализ, иммунологические методы и масс-спектрометрический анализ уровня и стабильности полноразмерных гибридных белков, а также анализ стабильности *ex vivo* в плазме человеческой крови.

[0082] В настоящем изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок настоящего изобретения. В вариантах осуществления настоящего изобретения выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 и 64-75. В более конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-56, 59-60 и 70. В дополнительных более конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 76-91.

[0083] В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок, может представлять собой экспрессионный вектор. Экспрессионные векторы включают, без ограничения, векторы для экспрессии рекомбинантных белков и векторы для доставки нуклеиновых кислот в субъекте, для экспрессии в ткани субъекта, например, вирусные векторы. Примеры вирусных векторов, приемлемых для применения в настоящем изобретении, включают, без

ограничения, аденовирусные векторы, адено-ассоциированные вирусные векторы, лентивирусные векторы и т. п. Вектор также может представлять собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, без ограничения, плазмиды, искусственные хромосомы бактерий, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т. п. Вектор может включать любые элементы для выполнения обычной функции экспрессионного вектора, например, промотор, связывающий рибосомы элемент, терминатор, усилитель, селективный маркер или точку начала репликации.

[0084] В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок, может иметь оптимизированные кодоны с целью улучшения рекомбинантной экспрессии от желаемой клетки-хозяина, такой как человеческая эмбриональная клетка почек (НЕК) или клетка яичника китайского хомячка (СНО), с помощью известных в данной области способов в контексте настоящего описания.

[0085] В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует гибридный белок настоящего изобретения. Клетки-хозяева включают, без ограничения, клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных белков и клетки-хозяева для доставки нуклеиновой кислоты в субъекте для экспрессии в ткани субъекта. Примеры клеток-хозяев, приемлемых для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, клетки НЕК или СНО.

[0086] В еще одном общем аспекте настоящее изобретение относится к способу продуцирования гибридного белка настоящего изобретения. В общем аспекте способ содержит этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок, и (2) выделяют гибридный белок, продуцированный клеткой-хозяином. Гибридный белок можно дополнительно очистить с помощью способов, известных в данной области.

[0087] В некоторых вариантах осуществления гибридный белок экспрессируют в клетках-хозяевах и выделяют из них с помощью сочетания из одного или более стандартных методов очистки,

включая, без ограничения, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ультрафильтрацию и диализ. Предпочтительно, чтобы гибридный белок был полностью очищен от любых протеаз.

[0088] В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

[0089] В настоящем изобретении дополнительно предложена композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок настоящего изобретения, могут содержать носитель для доставки, для введения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку с целью экспрессии гибридного белка. Примеры носителей для доставки нуклеиновых кислот включают липосомы, биосовместимые полимеры, включая природные полимеры и синтетические полимеры, липопротеины, полипептиды, полисахариды, липополисахариды, искусственные вирусные оболочки, металлические частицы, бактерии, вирусы, такие как бакуловirus, аденовирусы и ретровирусы, бактериофаги, космиды, плазмиды, грибковые векторы и другие рекомбинантные носители, обычно используемые в данной области и описанные ранее для экспрессии в разных эукариотических хозяевах.

[0090] Фармацевтически приемлемый носитель может включать один или более из фармацевтически приемлемого эксципиента, буферного раствора, стабилизатора, а также других материалов, известных специалистам в данной области. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, один или более из воды, солевого раствора, буферного раствора, изотонических агентов, таких как сахара, многоатомных спиртов, вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консервантов, а также их сочетания. Такие материалы должны быть нетоксичными и должны не влиять на эффективность активного ингредиента в применяемых дозах и концентрациях. Определенные свойства носителя или другого материала могут зависеть от пути введения, например, внутримышечным, подкожным, пероральным, внутривенным, кожным, интрамукозальным (например, в слизистую

кишечника), интраназальным или внутрибрюшинным путем. Например, жидкие фармацевтические композиции по существу включают жидкий носитель, такой как вода, углеводороды, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также можно включать физиологический солевой раствор, раствор глюкозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в виде раствора, при этом их, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, такой как пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, выполненную с возможностью прокалывания иглой для подкожных инъекций.

[0091] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция может содержать один или более дополнительных компонентов, таких как другой активный ингредиент.

[0092] Настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим фармацевтическую композицию настоящего изобретения. Наборы могут содержать первый контейнер, в котором имеется высушенный гибридный белок настоящего изобретения, и второй контейнер, в котором имеется водный раствор, предназначенный для смешивания с высушенным гибридным белком перед введением субъекту, либо только один контейнер, содержащий жидкую фармацевтическую композицию настоящего изобретения. Набор может содержать блок введения на одну дозу фармацевтической композиции настоящего изобретения или блок введения на множество доз. Набор может также включать один или более предварительно заполненных шприцев (например, шприцев с жидкостью и шприцев с лиофилизатом). Набор может также содержать инструкцию по его применению. Такая инструкция может описывать применение и свойства материалов, предоставленных в наборе, и ее можно составлять в соответствии с конкретным метаболическим расстройством, подлежащим лечению.

[0093] Настоящее изобретение также относится к применению описанных в настоящем документе фармацевтических композиций для лечения или профилактики метаболического заболевания,

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

[0094] Используемый в настоящем документе термин «субъект» означает любое животное, конкретно млекопитающее, наиболее конкретно человека, которое будет или было подвергнуто лечению способом в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Используемый в настоящем документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов, кроме человека (NHP), таких как низшие и высшие обезьяны, и т. п., и более конкретно, человека.

[0095] «Метаболическое заболевание, расстройство или состояние» означают любое расстройство, связанное с аномальным метаболизмом. Примеры метаболических заболеваний, расстройств или состояний, которые можно лечить в соответствии со способом настоящего изобретения, включают, без ограничения, диабет 2-го типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемию, диабетическую нефропатию, ишемическое поражение миокарда, застойную сердечную недостаточность или ревматоидный артрит.

[0096] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» относятся к введению композиции субъекту для

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

[0097] Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество терапевтически активного соединения, необходимого для получения желаемого биологического или клинического эффекта. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, достаточное для обеспечения положительных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Терапевтически эффективное количество можно вводить за одну или более процедур введения. Применительно к болезненному состоянию, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для облегчения, стабилизации или задержки развития заболевания. В соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящего изобретения терапевтически эффективное количество представляет собой количество гибридного белка, необходимое для лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния, такого как диабет 2-го типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемия, диабетическая нефропатия, ишемическое поражение миокарда, застойная сердечная недостаточность или ревматоидный артрит.

[0098] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию настоящего изобретения можно вводить субъекту любым способом, известным специалистам в данной области в контексте настоящего описания, например, с применением внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, интрамукозального (например, в слизистую кишечника), интраназального или внутрибрюшинного пути введения.

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

[0099] Такие параметры, как величина дозы, частота введения и продолжительность введения фармацевтической композиции субъекту в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, не ограничены каким-либо конкретным образом. Оптимальные значения таких параметров могут зависеть от различных факторов, таких как особенности субъекта, подлежащего лечению, конкретное метаболическое заболевание, подлежащее лечению, степень тяжести заболевания, путь введения и т. п., при этом специалист в данной области сможет определить оптимальные значения для таких параметров с целью достижения желаемого терапевтического или клинического исхода. Например, фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или более одного раза в день, например, два раза, три раза, четыре раза и т. п. Обычная доза гибридного белка может варьировать в интервале от около 0,1 мкг/кг до около 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, таких как перечислены выше.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0100] Вариант осуществления 1 представляет собой гибридный белок, содержащий: (a) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (c) белок GDF15; причем гибридный белок составлен от N-конца до C-конца в порядке (a) – (b) – (c).

[0101] Вариант осуществления 2 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 1, в котором белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант.

[0102] Вариант осуществления 3 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 1, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-11.

[0103] Вариант осуществления 4 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 1, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

[0104] Вариант осуществления 5 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 4, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-11.

[0105] Вариант осуществления 6 представляет собой гибридный белок любого из вариантов осуществления 1-5, в котором белок, продлевающий период полужизни, содержит человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его функциональный вариант.

[0106] Вариант осуществления 7 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 6, в котором белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

[0107] Вариант осуществления 8 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 7, в котором белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

[0108] Вариант осуществления 9 представляет собой гибридный белок любого из вариантов осуществления 1-8, в котором линкер представляет собой гибкий линкер.

[0109] Вариант осуществления 10 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 9, в котором линкер содержит последовательность (GGGS) n , где n составляет от 2 до 20, например GS-(GGGS) $\times$ 8 или AS-(GGGS) $\times$ 8-GT.

[0110] Вариант осуществления 11 представляет собой гибридный белок любого из вариантов осуществления 1-9, в котором линкер представляет собой структурированный линкер.

[0111] Вариант осуществления 12 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 11, в котором линкер содержит последовательность (AP) n или (EAAAK) n , где n составляет от 2 до 20, например AS-(AP) n -GT или AS-(EAAAK) n -GT.

[0112] Вариант осуществления 13 представляет собой гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-60 или 64-75.

[0113] Вариант осуществления 14 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 13, содержащий

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-60 и 64-75.

[0114] Вариант осуществления 15 представляет собой гибридный белок варианта осуществления 14, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70.

[0115] Вариант осуществления 16 представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок любого одного из вариантов осуществления 1-15.

[0116] Вариант осуществления 17 представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 76-91.

[0117] Вариант осуществления 18 представляет собой экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты варианта осуществления 16 или 17.

[0118] Вариант осуществления 19 представляет собой клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты варианта осуществления 16 или 17.

[0119] Вариант осуществления 20 представляет собой способ продуцирования гибридного белка любого одного из вариантов осуществления 1-15, содержащий этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок; и (2) выделяют гибридный белок, продуцированный клеткой-хозяином.

[0120] Вариант осуществления 21 представляет собой способ варианта осуществления 20, в котором стадия выделения содержит очистку гибридного белка с удалением протеаз.

[0121] Вариант осуществления 22 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество гибридного белка любого одного из вариантов осуществления 1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0122] Вариант осуществления 23 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих

гибридный белок любого одного из вариантов осуществления 1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0123] Вариант осуществления 24 представляет собой набор, содержащий фармацевтическую композицию варианта осуществления 22 или 23.

[0124] Вариант осуществления 25 представляет собой способ лечения или профилактики метаболического расстройства, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции любого из вариантов осуществления 22 и 23.

[0125] Вариант осуществления 26 представляет собой способ варианта осуществления 25, в котором метаболическое расстройство выбрано из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита.

[0126] Вариант осуществления 27 представляет собой способ варианта осуществления 25 или 26, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту подкожно или внутривенно.

[0127] Вариант осуществления 28 представляет собой способ лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом способ включает подкожное или внутривенное введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-60 и 70, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0128] Вариант осуществления 29 представляет собой способ лечения метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии,

диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0129] Вариант осуществления 30 представляет собой способ любого одного из вариантов осуществления 25-29, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту внутривенно или подкожно.

[0130] Вариант осуществления 31 представляет собой гибридный белок любого одного из вариантов осуществления 1-15 для применения при лечении или профилактике метаболического расстройства, выбранного из группы, состоящей из диабета 2-го типа, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина, ожирения, дислипидемии, диабетической нефропатии, ишемического поражения миокарда, застойной сердечной недостаточности или ревматоидного артрита.

ПРИМЕРЫ

[0131] Для дополнительной иллюстрации характера настоящего изобретения предложены следующие примеры изобретения. Следует понимать, что следующие ниже примеры не ограничивают изобретение, и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

[0132] **Пример 1. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15 - влияние усечений GDF15**

[0133] Подобно другим членам семейства TGF β , белок GDF15 синтезируется как пре-про-белок, который образует димер в эндоплазматическом ретикулуме и подвергается фуриновому расщеплению с продуцированием секретируемого зрелого GDF15 (аминокислоты 197-308). Секретируемый зрелый гомодимер GDF15 имеет массу около 25 кДа, и каждый мономер способен образовывать до 4 внутримолекулярных дисульфидных связей с одним межмолекулярным дисульфидом, связывающим компоненты гомодимера.

[0134] Кристаллическая структура GDF15 определена в настоящем изобретении и показана на Фиг. 1A и 1B. Из кристаллической структуры видно, что С-конец зрелого GDF15 скрыт на границе раздела димеров, в то время как N-конец остается открытым. Этот открытый конец позволяет связывать гибридные белки, такие как белки, продлевающие период полужизни, с N-концом GDF15.

[0135] В кристаллической структуре также виден новый узор дисульфидных мостиков между цистеиновыми остатками GDF15. В то время как TGF β 1 имеет мостики C1-C3 и C2-C7 (т. е. мостики между его первым и третьим цистеиновыми остатками, а также между его вторым и седьмым цистеиновыми остатками), GDF15 имеет мостики C1-C2 и C3-C7 (см. Фиг. 1A и 1B). Эти уникальные дисульфидные мостики приводят к замыканию петли, образованной мостиком C1-C2, который расположен на N-конце белка и на удалении от цистеинового узла, который содержит другие дисульфидные связи. Исходя из структуры, можно предположить, что N-конец GDF15 может не быть критическим для образования димера или общего складывания белка, и что GDF15 и присоединенные молекулы на его N-конце могут быть толерантны к делециям на N-конце, которые удаляют остатки C1 и C2, остатки внутри петли C1-C2 и даже остатки на C-конце, связанные с C2.

[0136] Пример 2. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15 - влияние линкера

[0137] Были оценены различные линкеры между молекулой HSA и молекулой GDF15. Оценке подвергались как гибкие линкеры, содержащие последовательность (GGGS) $_n$, так и структурированные линкеры, содержащие последовательность (AP) $_n$ или (EAAAK) $_n$, где n составляет 2-20.

[0138] Гибридные белки, содержащие различные линкеры, сравнивали по их биофизическим свойствам, их влиянию на эффективность потребления пищи тощими мышами, их фармакокинетическим (ФК) параметрам у мышей, и их стабильности *ex vivo* в человеческой крови. Результаты испытаний вариантов линкеров показаны в табл. 1. Молекула, содержащая SEQ ID NO: 31,

которая содержала линкер (EAAAK)₈, по данным ВЭЖХ образовывала агрегаты. Оставшиеся семь вариантов линкеров по табл. 1 не образовывали агрегатов.

[0139] Таблица 1. Обобщенные данные анализа вариантов линкеров

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

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

[0140] Для этих вариантов также оценивалась стабильность линкеров по исследованиям *in vivo* у мышей, а также по исследованиям стабильности *ex vivo* в пробах человеческой цельной крови и плазмы. В анализе результатов, полученных в этих исследованиях, применяли две формы обнаружения. Оценку интактности линкера проводили методом иммуноанализа с парами антител, анти-GDF15 для захвата и анти-HSA для обнаружения, причем определяли наличие обеих молекул с какой-либо из сторон линкера. Более широкую картину целостности всей молекулы

анализировали методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХМС) с использованием различных суррогатных пептидных последовательностей из HSA и GDF15. Иммуноанализ показал стабильный ФК профиль для всех вариантов линкеров и отсутствие потери концентрации в пробах плазмы с добавками для любого из вариантов линкеров по результатам наблюдения в течение 48 часов. Результаты ЖХМС согласовывались с результатами иммуноанализа, подтверждая, что суррогатные пептиды из различных участков молекул HSA и GDF15 были интактными. ФК профиль вариантов линкеров, подвергнутых анализу методом ЖХМС с использованием суррогатных пептидов, показал аналогичные тенденции для различных вариантов линкеров, причем все они на 7-й день имели обнаруживаемые уровни. Все варианты, приведенные в табл. 1, за исключением SEQ ID 31, имели желаемые биофизические свойства и ФК параметры.

[0141] Варианты линкеров оценивали по их активности *in vivo* путем проведения исследований потребления пищи тощими мышами. В табл. 2 показано влияние вариантов линкеров на эффективность гибридного белка в отношении снижения потребления пищи. Показано явное влияние линкера на указанную эффективность. Что касается гибких линкеров (GGGGS)_n, увеличение длины линкера от 2 до 4–8 привело к существенному увеличению эффективности гибридного белка. Для более ригидных линкеров (AP)_n эта тенденция была менее очевидной, подтверждая, что решающую роль в эффективности гибридного белка играет степень свободы молекулы GDF15.

[0142] Таблица 2. Влияние линкера на эффективность *in vivo* гибридных белков HSA-GDF15 у тощих мышей

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

30	AS (EAAAK) ₄ GT	51,9
----	----------------------------	------

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

[0143] Пример 3. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15 - влияние мутаций HSA

[0144] Были составлены рекомбинантные белки, состоящие из белка, продлевающего период полужизни, человеческого сывороточного альбумина, присоединенного к N-концу GDF15 посредством линкер. Такая конфигурация будет обеспечивать целостность интерфейса димеризации GDF15 и допускать соединение через нативные межцепочечные дисульфидные мостики, приводя к образованию гомодимера GDF15, в котором из каждого плеча GDF15 выдвинут слитый с ним HSA. При таком подходе для создания гомодимера HSA-GDF15 требуется только один ген.

[0145] Нативный человеческий сывороточный альбумин содержит 35 цистеиновых (Cys, C) остатков, которые образуют 17 дисульфидных мостиков, при этом остаток Cys-34 является единственным свободным цистеином в молекуле. Было показано, что этот свободный остаток Cys-34 функционирует как акцептор свободных радикалов, улавливая множество активных форм кислорода (ROS) и активных форм азота (RNS). Поэтому свободный остаток Cys заменили так, чтобы минимизировать риск гетерогенности в результате окисления.

[0146] Свободный цистеин в положении 34 HSA заменили на серин либо аланин, и анализировали гибридные молекулы GDF15 с мутацией HSA (C34S) или HSA (C34A). Обе молекулы очищали с применением трехэтапного способа очистки: (i) ионообменная хроматография, (ii) гидрофобная хроматография и (iii) эксклюзионная хроматография. Сразу же после создания этих молекул анализ ВЭЖХ показал, что обе молекулы были чистыми и не содержали агрегатов (табл. 3).

[0147] Однако через две недели после создания гибридного белка с мутацией HSA (C34A) (содержащего SEQ ID NO: 48), анализ ВЭЖХ показал наличие в нем агрегатов, тогда как гибридный белок с мутацией HSA (C34S) (содержащий SEQ ID NO: 40) и через четыре недели не содержал агрегатов.

[0148] Таблица 3. Влияние мутации HSA C34 на агрегацию гибридного белка

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

[0149] Пример 4. Предрасположение к расщеплению протеазами в GDF15

[0150] Авторы изобретения наблюдали, что остаток аргинина в положении аминокислоты 198 GDF15 (R198) предрасположен к расщеплению протеазами в гибридных молекулах HSA-GDF15. Такое расщепление приводит к образованию гетерогенной популяции и нежелательно для терапевтических композиций. Это расщепление можно предотвратить с помощью смеси ингибиторов протеаз. Были проведены исследования способов очистки для удаления протеазы. В табл. 4 перечислены два типа колонок для проведения аффинной хроматографии HSA, которые испытывались для очистки гибридных белков HSA-GDF15, с определением методом ВЭЖХ. Сразу после очистки гибридные белки HSA-GDF15, очищенные обоими способами, были на 100% чистыми и интактными. При низких концентрациях (2–5 мг/мл) белки, очищенные обоими способами, оставались интактными в течение всего периода испытания 4 недели. Однако при высоких концентрациях (40–50 мг/мл) только смола с антителами к HSA (CaptureSelect) очищала от протеазы белки, которые затем оставались интактными в течение всего периода испытания 4 недели. Смола с лигандами HSA (Albupure) очищала белки, которые вначале были интактными, но затем во время хранения в высоких концентрациях подвергались расщеплению. Добавление смеси ингибиторов протеаз (PI) и ЭДТА полностью подавляло расщепление партии гибридного белка HSA-GDF15 в высокой концентрации, очищенной с помощью смолы Albupure. Таким образом, способ очистки играет решающую роль в создании стабильной терапевтической композиции. Соответствующая деградация не наблюдалась *in vivo* или *ex vivo*, подтверждая, что после очистки

терапевтической композиции от протеазы расщепление гибридных белков не является проблемой *in vivo*. Таким образом, способы очистки, позволяющие эффективно удалять возможные молекулы протеазы во время приготовления, например применение смолы CaptureSelect, играют ключевую роль в успешном производстве терапевтических препаратов GDF15, которые являются гомогенными, интактными и стабильными.

[0151] Таблица 4. Расщепление гибридных белков HSA-GDF15 протеазами можно предотвратить с помощью способов очистки проб

Условия			% расщепления в популяции HSA-GDF15 (SEQ ID 60)				
Концентрация	Смола	+ PI/ ЭДТА	НЕДЕЛЯ 0	НЕДЕЛЯ 1	НЕДЕЛЯ 2	НЕДЕЛЯ 3	НЕДЕЛЯ 4
Низкая	Capture Select	Нет	0	0	0	0	0
Низкая	Albupure	Нет	0	0	0	0	0
Высокая	Capture Select	Нет	0	0	0	0	0
Высокая	Albupure	Нет	0	3,04	9,47	11,57	13,89
Высокая	Capture Select	Да	0	0	0	0	0
Высокая	Albupure	Да	0	0	0	0	0

[0152] Пример 5. Варианты GDF15 с N-концевыми делециями

[0153] Кристаллическая структура GDF15, показанная на Фиг. 1A и 1B, позволяет предположить, что N-конец GDF15, затронутый в вариантах делеции, не является критическим для образования димера или общего складывания белка. Это также позволяет предположить, что такие N-концевые делеции не повлияют на взаимодействие с возможными рецепторами. Гибридные белки HSA-GDF15, содержащие различные делеции N-конца GDF15, были испытаны на активность *in vivo*.

[0154] Были запланированы варианты N-концевых делеций GDF15, которые удаляли сайт расщепления протеазами в GDF15 (R198). Непосредственно за остатком R198, у остатков N199-G200 имеется потенциальный сайт дезамидирования, а дезамидирование

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

[0155] Пример 6. Неактивные мутанты GDF15

[0156] В табл. 5 перечислены двенадцать мутантов GDF15, которые были созданы для подавления активности GDF15 *in vivo* и определения функционального эпитопа GDF15. Эти мутанты включают пять точечных мутантов, два двойных мутанта и пять тройных мутантов. Гибридные белки HSA-GDF15, содержащие эти мутации, были характеризованы по их биофизическим свойствам и активности (табл. 5). Из 12 мутантов один не экспрессировался, а четыре со временем образовывали агрегаты, указывая на то, что эти мутации нарушают складывание белков и их биофизические свойства. Четыре из оставшихся семи мутантов содержали точечную мутацию GDF15, и эти мутанты испытывали на мышах на предмет снижения потребления пищи по сравнению с диким типом. Три из этих точечных мутантов (I89R, I89W и W32A) утратили активность *in vivo*, а один мутант (Q60W) остался таким же активным, как дикий тип. Эти результаты показывают, что мутация I89R, I89W или W32A прерывает взаимодействие рецептора/корцептора с GDF15, подтверждая, что функциональные эпитопы GDF15 находятся возле остатков I89 и W32. Мутации пронумерованы на основе зрелого GDF15, вставленного в гибридный белок, т. е. «1» относится к 1-й аминокислоте зрелого GDF15 (SEQ ID NO: 6), а «89» относится к 89-й аминокислоте зрелого белка GDF15.

[0157] Таблица 5. Обобщенные данные биофизических свойств и активности гибридных белков, содержащих мутанты GDF15

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

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

[0158] Пример 7. Экспрессия и способы очистки

[0159] Экспрессия

[0160] Для экспрессии 20 мл и больше, экспрессию проводили в клетках HEK Expi293™, выращенных в среде экспрессии Expi293™. Клетки выращивали при температуре 37 °C, при встряхивании со

скоростью 125 об/мин, в среде с 8% CO₂. Клетки трансфицировали с плотностью $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, с использованием набора экспрессии Expi293™. На каждый литр трансфицированных клеток, 1 мг тотальной ДНК разводили в 25 мл Opti-MEM, и 2,6 мл реагента Expi293™ разводили в 25 мл Opti-MEM, и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Разведенную ДНК и разведенный реагент Expi293 объединяли и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем комплекс ДНК добавляли к клеткам. Клетки помещали на ночь во встряхиватель-инкубатор. На следующий день после трансфекции, 5 мл реагента Enhancer 1 из набора разводили в 50 мл реагента Enhancer 2 из набора, и весь объем из двух реагентов Enhancer добавляли к клеткам. Трансфицированные клетки помещали обратно в инкубатор на 4 дня до их отбора. Клетки концентрировали центрифугированием при 6000 g в течение 30 минут, а затем фильтровали через фильтр с ячейкой 0,2 мкм перед этапом очистки.

[0161] Экспрессию также проводили в клетках CHO. Плазмиду подвергали очистке и анализу. Перед трансфекцией 1 аликвоту в 200 мкг плазмидной ДНК, содержащей кодирующую область HSA-GDF15, линеаризовали путем расщепления рестрикционным ферментом Acl I. Расщепление данной рестрикционной эндонуклеазой обеспечивает удаление гена резистентности к ампициллину. Две линеаризованные аликвоты по 15 мкг ДНК трансфицировали в двух порциях по 1×10^7 клеток CHO (обозначены как пулы трансфекции А и В) с помощью электроманипулятора клеток BTX ECM 830 Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus, г. Холлистон, штат Массачусетс, США). Клетки подвергали 3-кратной электропорации под напряжением 250 вольт с длительностью импульсов 15 миллисекунд и интервалами между импульсами 5 секунд, в кювете с шириной зазора 4 мм. Трансфицированные клетки переносили во встряхиваемую колбу, содержащую MACH-1+L-глутамин, и инкубировали в течение 1 суток. Пул трансфекции А и пул трансфекции В центрифугировали, ресуспендировали в среде MACH-1+MSX и переносили во встряхиваемые колбы для инкубации в течение 6 суток. Трансфицированные клетки, продуцирующие HSA-гибридный белок, из

пула трансфекции А и пула трансфекции В объединяли и высевали в метилцеллюлозу на 8-й день после электропорации.

[0162] Очистка

[0163] Проводили двухэтапную очистку с применением смолы CaptureSelect и эксклюзионной хроматографии. Супернатанты над клетками от временно трансфицированных клеток Expi293™ загружали в предварительно уравновешенную (PBS, pH 7,2) колонку со смолой CaptureSelect для связывания HSA (Матрица аффинности к человеческому альбумину CaptureSelect от компании ThermoFisher Scientific) при приблизительной емкости 10 мг белка на 1 мл смолы. После загрузки несвязанные белки удаляли путем промывания колонки PBS с pH 7,2 в количестве 10 объемов колонки (CV). HSA-GDF15, который был связан в колонке, элюировали 10 объемами CV раствора 2 М MgCl₂ в 20 мМ трис, pH 7,0. Соответствующие пикам фракции отбирали, фильтровали (0,2 мкм) и диализировали против PBS с pH 7,2 при температуре 4 °C. После диализа белок повторно фильтровали (0,2 мкм) и концентрировали до подходящего объема перед загрузкой на колонку 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Фракции белка, элюированные из колонки эксклюзионной хроматографии (SEC) с высокой степенью чистоты (по определению методом SDS-PAGE), объединяли. Концентрацию белка определяли по поглощению света 280 нм на спектрофотометре BioTek Synergy HTTM. Качество очищенных белков оценивали методом SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC, система Dionex HPLC). Уровни эндотоксина измеряли методом LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

[0164] Также проводили двухэтапную очистку с применением смолы AlbuPure и эксклюзионной хроматографии. Гибридные белки HSA-GDF15 очищали при комнатной температуре с применением смолы AlbuPure (ProMetic BioSciences Ltd), в которой использован иммобилизованный синтетический триазиновый лиганд для селективного связывания HSA. К смоле AlbuPure добавляли супернатанты с экспрессией. Затем смолу промывали, сначала 4 объемами CV PBS с pH 7,2, а затем 4 объемами CV буферного раствора 50 мМ трис с pH 8,0, 150 мМ NaCl. HSA-GDF15, который

был связан в колонке, элюировали 4 объемами CV PBS с pH 7,2, содержащего 100 мМ октаноата натрия. Фракции, содержащие белок, концентрировали до объема 10 мл с помощью концентратора-центрифуги с отсечением по молекулярной массе 30 000 кДа (Amicon), а затем пропускали через колонку 26/60 Superdex S200pg (GE), уравновешенную PBS с pH 7,2. Фракции после эксклюзионной хроматографии, содержащие гомодимер HSA-GDF15, идентифицировали методом SDS-PAGE и объединяли для анализа. Степень чистоты белка оценивали методом SDS-PAGE и SE-HPLC.

[0165] Примеры 8-14 и 19 включают характеризацию примера гибридного белка настоящего изобретения, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. Этот гибридный белок представляет собой полностью рекомбинантный белок, который существует в виде гомодимерного гибрида HSA и зрелого человеческого GDF15, соединенных линкером, содержащим 42 аминокислоты и состоящим из глициновых и сериновых остатков, GS-(GGGGS)₈. Расчетная молекулярная масса этого гибридного белка составляет 162 696 дальтон, а единственный нативный свободный цистеин в положении 34 HSA был заменен серином. Далее в примерах этот конкретный гибридный белок HSA-GDF15 для простоты будет именоваться просто «FP1». Вариант FP1 с меткой 6x His (6xHis-FP1, SEQ ID NO: 26), содержащий линкер AS-(GGGGS)x8-GT, использовали для сравнения в некоторых из приведенных ниже примеров.

[0166] Пример 8. Влияние FP1 на потребление пищи мышами линии C57BL/6

[0167] Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать зависимость от дозы воздействие FP1 на ингибирование потребления пищи мышами линии C57BL/6.

[0168] Самцы мышей линии C57BL/6 в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ. Затем мышей на основании потребления пищи в предыдущие 24 часа разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композицию, содержащую FP1, путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в

течение 48 часов после инъекций. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6xHis-FP1.

[0169] Результаты (Фиг. 2 и табл. 6) представлены как среднее значение суммарного потребления пищи для заданного промежутка времени. Результаты показали, что подкожное введение FP1 мышам линии C57BL/6 существенно ингибировало потребление пищи по сравнению с животными, получавшими носитель, при всех дозах и во все моменты времени в ходе испытания. Введение 6xHis-FP1 вызывало снижение потребления пищи при дозе 8 нмоль/кг.

[0170] Таблица 6. Влияние подкожного введения FP1 на потребление пищи мышами линии C57BL/6; показано суммарное потребление пищи за 12, 24 и 48 часов после введения

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

Данные представлены как среднее ± SEM.

* $p \leq 0,05$, по сравнению с PBS; ** $p \leq 0,01$, по сравнению с PBS; *** $p \leq 0,001$, по сравнению с PBS; **** $p \leq 0,0001$, по сравнению с PBS

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

[0171] Пример 9. Влияние FP1 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули

[0172] Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать зависимое от дозы воздействие FP1 на ингибирование потребления пищи у крыс линии Спрег-Доули.

[0173] Самцы крыс линии Спрег-Доули в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ. Затем крыс на

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

[0174] Результаты представлены на Фиг. 3 и в табл. 7. Подкожное введение FP1 в дозах 2,5 нмоль/кг и 10 нмоль/кг ингибировало потребление пищи по сравнению с животными, получавшими носитель. Ингибирование достигало статистической значимости только при самой высокой испытанной дозе (10 нмоль/кг) через 24 и 48 часов после введения. Введение FP1 вызывало снижение потребления пищи при дозе 8 нмоль/кг, и этот эффект был значимым через 24 и 48 часов.

[0175] Таблица 7. Влияние подкожного введения FP1 на потребление пищи крысами линии Спрег-Дули; показано суммарное потребление пищи за 12, 24 и 48 часов после введения

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

Данные представлены как среднее ± SEM.

* $p \leq 0,05$, по сравнению с PBS; ** $p \leq 0,01$, по сравнению с PBS

Однофакторный дисперсионный анализ и критерий Тьюки для

множественных сравнений; $n=8$ на группу

[0176] Пример 10. Влияние FP1 на гомеостаз глюкозы и массу тела у мышей с алиментарным ожирением (DIO)

[0177] Цель настоящего эксперимента состояла в оценке влияния FP1 на потребление пищи, массу тела и гомеостаз глюкозы в течение двух недель введения у мышей DIO линии C57BL/6.

[0178] Самцов мышей DIO взвешивали и подкожно вводили им дозы FP1 2 мл/кг каждые три дня (q3d) в день 0, 3, 6, 9 и 12. Группам, получавшим носитель и розиглитазон, вводили PBS по аналогичной схеме. Животным контрольной группы розиглитазон добавляли в корм в количестве 0,015%, доступ к корму не ограничивали. Массы тела мышей и пищи регистрировали ежедневно. Уровни глюкозы измеряли с помощью глюкометра (One Touch® Ultra®, Lifescan, г. Милпитас, штат Калифорния, США). Массу жировой и нежировой ткани у мышей, находящихся в сознании, количественно измеряли методом ЯМР с разрешением по времени (TD-NMR), с помощью прибора Bruker Mini-Spec LF110. Пероральный тест на переносимость глюкозы (OGTT) у мышей проводили после 4 часов голодания. Глюкозу в крови измеряли через надрез на хвосте через 0, 30, 60, 90 и 120 минут после введения через желудочный зонд 2 г/кг глюкозы, 10 мл/кг. Инсулин измеряли через 0, 30 и 90 минут после введения глюкозы.

[0179] В конце исследования мышей умерщвляли посредством ингаляции CO₂ и отбирали посмертную пробу крови. Сыворотку помещали в планшет на 96 лунок на влажный лед, а затем хранили при температуре -80 °C. Извлекали печень и оценивали содержание жира по отношению к общей массе на срезах печени методом TD-NMR на приборе Bruker MiniSpec mq60, в соответствии с инструкцией производителя.

[0180] Рассчитывали оценку резистентности к инсулину натошак по гомеостатической модели (HOMA-IR) на основании произведения глюкозы натошак (в мг/дл) и инсулина (в мЕд/л), деленного на коэффициент 405.

[0181] Введение мышам DIO FP1 по схеме q3d в дозах 1 нмоль/кг и 10 нмоль/кг приводило к снижению массы тела (табл. 8)

и потребления пищи (табл. 9). Указанные снижения достигали статистической значимости только в определенные моменты времени, как описано ниже.

[0182] FP1 вызывал снижение массы тела при дозах 1 (со 2-го до 14-го дня) и 10 нмоль/кг (с 1-го до 14-го дня) у мышей DIO (табл. 8 и Фиг. 4). Значительное снижение потребления пищи наблюдали в 1-й и 2-й дни исследования при дозе 1 нмоль/кг и в 1, 8 и 9-й дни при дозе 10 нмоль/кг (табл. 9).

[0183] Таблица 8. Изменение массы тела (% от начальной) во время введения FP1 у мышей DIO

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

10	-0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	-4,4 ± 0,8*	-7,8 ± 1,2*	7,8 ± 1,1*
11	-0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,4	-4,4 ± 0,8*	-7,9 ± 1,4*	8,2 ± 1,2*
12	-0,8 ± 0,6	0,8 ± 0,5	-4,3 ± 1,0*	-7,9 ± 1,5*	8,5 ± 1,2*
13	-0,8 ± 0,6	0,5 ± 0,5	-3,9 ± 0,9*	-8,7 ± 1,6*	8,6 ± 1,3*
14	-1,7 ± 0,6	-0,4 ± 0,5	-4,6 ± 1,0*	-9,0 ± 1,7*	7,6 ± 1,3*
Данные представлены как среднее ± SEM. n=8 на группу.					
* p < 0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.					

[0184] Таблица 9. Суточное потребление пищи (г) во время введения FP1 у мышей DIO

Введение День	Носитель Н/П	FP1 (нмоль/кг)			Розиглитазон 10 мг/кг в день
		0,1	1	10	
-2	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
0	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1
1	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2*	1,5 ± 0,1*	3,6 ± 0,1*
2	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1*	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,2*
3	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,5 ± 0,1*
4	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1*
5	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,7 ± 0,2*
6	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2*
7	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,8 ± 0,2*
8	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*
9	3,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2*	4,3 ± 0,2*
10	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1*
11	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,1*
12	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2*
13	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1*
Данные представлены как среднее ± SEM. n=8 на группу.					
* p < 0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.					

[0185] По данным теста OGTT, выполненного на 14-й день исследования, FP1 существенно снижал уровни глюкозы по сравнению с животными, получавшими носитель, во все моменты времени после времени 0 и при всех трех дозах, применявшихся в испытании (табл. 10). Этот показатель дополнительно количественно определяли как полную площадь под кривой (AUC) и дельта AUC, которые были значительно меньше, по сравнению с животными, получавшими носитель, при всех трех дозах, применявшихся в испытании (табл. 10 и Фиг. 5А и 5В).

[0186] Таблица 10. Уровни глюкозы в крови (мг/дл) по данным теста OGTT, проведенного через четырнадцать дней, в которые мышам DIO вводили FP1 по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)					Полная AUC (мг/дл/ 120 мин)	Дельта AUC (мг/дл/ 120 мин)
		0	30	60	90	120		
Носитель	Н/П	209,6 ± 16,5	399,4 ± 46,4	338,5 ± 46,3	297,5 ± 38,0	269,3 ± 36,6	38 244,4 ± 4308,2	13 089,4 ± 3573,0
FP1	0,1	196,6 ± 7,6	319,0 ± 21,5*	241,6 ± 14,4*	196,0 ± 12,8*	184,0 ± 6,3*	28 408,1 ± 1236,1*	4885,5 ± 955,1*
	1	164,0 ± 7,2	251,4 ± 13,0*	227,6 ± 12,6*	191,9 ± 9,4*	180,6 ± 13,1*	25 295,6 ± 1026,7*	5615,6 ± 647,6*
	10	146,6 ± 5,9	195,6 ± 14,5*	197,1 ± 6,9*	172,1 ± 6,3*	174,9 ± 13,8*	21 768,8 ± 603,0*	4211,4 ± 425,8*
Розигли- зон	10 мг/кг в день	130,8 ± 6,0	199,1 ± 12,9*	204,4 ± 8,5*	184,1 ± 10,9*	169,1 ± 5,7*	22 115,6 ± 671,9*	6425,6 ± 599,6
Данные представлены как среднее ± SEM. n=8 на группу.								
* p < 0,05 по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.								

[0187] Уровни глюкозы после еды измеряли в начале (0-й день), на 7-й день и на 13-й день исследования (табл. 11 и Фиг.

6). FP1 вызывал снижение уровня глюкозы в крови статистически значимым образом при дозах 1 нмоль/кг и 10 нмоль/кг на 13-й день исследования.

[0188] Таблица 11. Уровни глюкозы в крови после еды во время введения FP1 у мышей DIO по схеме q3d

Введение	Доза (нмоль/кг)	Время после начала введения (дней)		
		0	7	13
Носитель	Н/П	177,6±10,9	173,6±10,6	225,3±23,0
FP1	0,1	174,1±8,5	171,8±16,3	196,4±8,1
	1	167,5±7,8	135,1±11,2	165,3±10,3*
	10	165,3±13,7	145,3±4,9	153,8±7,5*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	189,6±17,3	122,6±8,1*	154,8±6,5*
Данные представлены как среднее ± SEM. n=8 на группу.				
* $p < 0,05$ по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.				

[0189] Уровни инсулина в плазме, измеренные в тесте OGTT, были значительно выше в группе, получавшей FP1, чем в соответственной группе, получавшей носитель, для дозы 0,1 нмоль/кг через 30 минут, и ниже при дозах 1 и 10 нмоль/кг в тот же момент времени (табл. 12). Амплитуда уровня инсулина в тесте OGTT, измеренная по полной площади под кривой, была выше, чем у группы, получавшей носитель, для дозы 0,1 нмоль/кг FP1 (табл. 12), и ниже при дозах 1 и 10 нмоль/кг. В обоих случаях статистическая значимость была достигнута только при самой низкой дозе. В момент времени через 90 минут у мышей, получавших 1 и 10 нмоль/кг FP1, уровень инсулина был ниже; однако этот эффект не достиг статистической значимости. Измерения на основании модели НОМА-IR, как показателя чувствительности к инсулину, были проведены на 14-й день исследования. В этот момент времени введение FP1 привело к снижению НОМА-IR или к улучшенной чувствительности к инсулину при дозе 10 нмоль/кг (табл. 13 и Фиг. 7).

[0190] Таблица 12. Уровни инсулина в плазме (пг/мл),

измеренные в тесте OGTT, проведенном через четырнадцать дней, в которые мышам DIO вводили FP1 по схеме q3d

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

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

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

[0191] Таблица 13. Модель НОМА-IR после голодания у мышей DIO через четырнадцать дней, в которые им вводили FP1 по схеме q3d

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

Данные представлены как среднее ± SEM.

n=8 на группу.

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

[0192] Величина снижения веса, достигнутая к 13 дню, не

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

[0193] Таблица 14. Состав тела через тринадцать дней введения FP1 по схеме q3d у мышей DIO

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

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

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

[0194] Таблица 15. Масса печени через пятнадцать дней введения FP1 по схеме q3d у мышей DIO

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

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

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

[0195] Таблица 16. Содержание жира в печени, измеренное через пятнадцать дней введения FP1 по схеме q3d, у мышей DIO

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

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

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

[0196] Пример 11. Влияние FP1 на уровни глюкозы в крови и массу тела у мышей *ob/ob*

[0197] Цель этого эксперимента состояла в оценке влияния FP1 на массу тела и уровни глюкозы в крови через восемь дней введения мышей *ob/ob* с ожирением, гипергликемией и дефицитом лептина.

[0198] Самцов мышей *ob/ob* взвешивали и подкожно вводили им дозы FP1 2 мл/кг через каждые три дня (q3d) на 0, 3 и 6-й день. Массы тела мышей и пищи регистрировали ежедневно. Уровни глюкозы измеряли ежедневно с помощью глюкометра. В конце исследования мышей умерщвляли и отбирали посмертную пробу крови.

[0199] FP1 в дозе 1 нмоль/кг значительно снижал массу тела (выраженную в процентах от начальной массы тела) у мышей *ob/ob*,

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

[0200] Таблица 17. Изменение массы тела (% от начальной) во время введения FP1 по схеме q3d у мышей *ob/ob*

Введение	Носитель	FP1	
День	Н/П	1 нмоль/кг	10 нмоль/кг
-6	-2,5 ± 0,3	-2,8 ± 0,4	-3,6 ± 0,5
-5	-2,4 ± 0,3	-3,0 ± 0,5	-3,5 ± 0,5
-4	-1,9 ± 0,2	-2,5 ± 0,4	-2,8 ± 0,3
-1	-0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	-0,3 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,5 ± 0,2	-1,6 ± 0,2	-2,3 ± 0,5*
2	1,1 ± 0,2	-1,8 ± 0,4*	-2,0 ± 0,9*
3	1,3 ± 0,3	-2,5 ± 0,4*	-3,1 ± 1,1*
4	1,8 ± 0,3	-3,3 ± 0,5*	-4,2 ± 1,3*
5	1,8 ± 0,4	-3,5 ± 0,5*	-4,7 ± 1,5*
6	2,0 ± 0,5	-4,0 ± 0,7*	-5,7 ± 1,6*
7	2,8 ± 0,6	-4,8 ± 0,8*	-6,3 ± 1,7*
8	3,5 ± 0,8	-4,5 ± 1,0*	-6,1 ± 1,9*
Данные представлены как среднее ± SEM. n=8 на группу.			
* $p < 0,05$ по сравнению с таковыми в группе, получавшей носитель.			

[0201] FP1 в дозе 10 нмоль/кг снижал уровни глюкозы после еды у мышей *ob/ob* в 1-й и 2-й дни исследования, а также с 4-го дня по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель. Снижение уровня глюкозы в крови наблюдали при дозе 1 нмоль/кг; однако этот эффект не достиг статистической значимости (табл. 18 и Фиг. 9).

[0202] Таблица 18. Уровни глюкозы после еды у мышей *ob/ob* во время введения FP1 по схеме q3d

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

[0203] Пример 12. Фармакокинетика у различных видов животных

[0204] Фармакокинетика у мышей

[0205] FP1 внутривенно и подкожно вводили самкам мышей линии C57BL/6 в дозе 2 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 7 дней после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Концентрацию FP1 определяли методом иммуноанализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени сведена в табл. 19 и 20, и показана на Фиг. 10.

[0206] Таблица 19. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно самкам мышей линии C57BL/6

Момент времени	FP1, доза, подкожно						
	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Средний результат	Станд. откл.
	56 (нМ)	57 (нМ)	58 (нМ)	60 (нМ)	63 (нМ)	(нМ)	
4 ч.	32,299	50,735	42,766	32,407	23,018	36,245	10,698

24 ч.	88,822	106,418	88,648	103,841	80,346	93,615	11,093
72 ч.	33,563	38,473	32,473	33,625	32,769	34,181	2,451
96 ч.	20,639	24,988	21,247	19,356	20,771	21,400	2,124
День 7	5,399	6,919	7,234	5,994	5,637	6,237	0,803

[0207] Таблица 20. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно самкам мышей линии C57BL/6

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

[0208] Фармакокинетический анализ показал, что период терминальный полужизни FP1 у мышей линии C57BL/6 после подкожного и внутривенного введения составлял 1,67 и 1,57 дня, соответственно (табл. 21). Средняя биодоступность FP1 после подкожного введения составила ~ 71%.

[0209] Таблица 21. Среднее ($\pm$ CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 2 мг/кг самкам мышей линии C57BL/6

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

Примечание. * T_{max} (медиан.)

[0210] Фармакокинетика у крыс

[0211] FP1 внутривенно и подкожно вводили самкам крыс линии Спрег-Дули в дозе 2 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 7 дней после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Концентрацию FP1 определяли методом иммуноанализа. Зависимость

концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени сведена в табл. 22 и 23, и показана на Фиг. 11.

[0212] Таблица 22. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно самкам крыс линии Спрег-Доули

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

[0213] Таблица 23. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно самкам крыс линии Спрег-Доули

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

* Повторный анализ подтвердил результаты

[0214] Фармакокинетический анализ показал, что терминальный период полужизни FP1 у крыс линии Спрег-Доули после подкожного и внутривенного введения составлял 1,34 и 1,51 дня, соответственно (табл. 24). Средняя биодоступность FP1 после подкожного введения составила ~ 23%.

[0215] Таблица 24. Среднее ($\pm$ CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 2 мг/кг самкам крыс линии Спрег-Доули

Путь введен	$t_{1/2}$ (дни)	CL или CL/F (мл/день/кг)	Vss (мл/кг)	C _{max} (нг/мл)	T _{max} * (дни)	AUC _{0-посл.} (день*нг/	AUC _{0-inf} (день*нг/
-------------	-----------------	--------------------------	-------------	--------------------------	--------------------------	----------------------------------	--------------------------------

ия							мл)	мл)
Подкожно	Среднее	1,34	100,09		6987	1	19 250	20 112
	(CO)	(0,04)	(3,97)		(417)		(794)	(820)
Внутривенно	Среднее	1,51	24,75	53,41	59 000	0,04	83 028	86 525
	(CO)	(0,12)	(8,53)	(17,15)	(25 031)		(20 126)	(20 881)

Примечание. * Tmax (медиан.)

[0216] Фармакокинетика у обезьян

[0217] FP1 внутривенно и подкожно вводили новым самцам яванского макака (*Macaca fascicularis*) в дозе 1 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 21 дня после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства иммунологическим методом анализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени сведена в табл. 25 и 26, и показана на Фиг. 12.

[0218] Таблица 25. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно яванским макакам, в соответствии с определениями иммунологическим методом

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

[0219] Таблица 26. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно яванским макакам, в соответствии с определениями иммунологическим методом

	FP1 (доза, внутривенно)
--	-------------------------

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

[0220] Фармакокинетический анализ показал, что терминальный период полужизни FP_1 у яванских макак после подкожного и внутривенного введения составил 8,5 и 9,2 дня, соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~ 88% (табл. 27).

[0221] Таблица 27. Среднее ($\pm$ СО) значение фармакокинетических параметров FP_1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 1 мг/кг яванским макакам

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

Примечание. * T_{max} (медиан.)

[0222] Количественное определение концентрации интактного димера в сыворотке яванских макак после внутривенного и подкожного введения проводили методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС (табл. 28 и 29 и Фиг. 13 и 14). Концентрации,

определяемые данным методом, были близки к концентрациям, определяемым методом иммуноанализа (IA), доказывая, что в организме яванских макак FR1 циркулирует в виде интактного димера без заметной подверженности метаболическим изменениям.

[0223] Таблица 28. Зависимость концентрации FR1 в виде интактного димера в сыворотке (нг/мл) от времени после однократного внутривенного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

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

[0224] Таблица 29. Зависимость концентрации FR1 в виде интактного димера в сыворотке (нг/мл) от времени после однократного подкожного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

День	Интактный димер по данным масс-спектрометрии (объединенные пробы)	Данные иммуноанализа (средн.)
0,00	0	0
0,25	9625	8959
1,00	15 799	14 219
2,00	17 671	17 373
3,00	19 130	17 476
5,00	12 284	15 633

7,00	10 808	12 971
10,00	8910	10 143
14,00	5814	7034
18,00	4074	5054
22,00	2967	3694

[0225] Концентрацию аналитов в сыворотке яванских макак после внутривенного и подкожного введения также измеряли методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином/жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС) (табл. 30 и 31). Выбранные триптические пептиды, а именно: ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK), ASL (ASLEDLGWADWVLSR) и TDT (TDTGVSLQTYDDLAK), расположены внутри FP1 вблизи от N-конца области HSA, N-конца GDF15 и C-конца GDF15, соответственно. Пептиды отслеживали как суррогатные пептиды FP1. Концентрации всех суррогатных пептидов были близки друг другу и концентрациям, измеренным методом иммуноанализа, доказывая, что последовательность GDF15 в FP1 остается интактной и связана с полной последовательностью HSA *in vivo*.

[0226] Таблица 30. Зависимость концентрации в сыворотке (нг/мл) суррогатных пептидов, представляющих различные области FP1, от времени после однократного внутривенного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином /жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС)

Момент времени		FP1 в среднем (нг/мл)			Станд. откл.			Данные иммуноанализа (нг/мл)
День	Часы	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	< LLOQ	< LLOQ	< LLOQ	Н/П	Н/П	Н/П	0,0
0,04	1	32400,0	39766,7	33333,3	2623,0	3162,8	2722,7	34536,9
0,25	6	29100,0	27166,7	30600,0	3439,5	1006,6	2095,2	30328,1
1,00	24	24366,7	23300,0	23800,0	4215,8	3996,2	4100,0	24088,7
2,00	48	19433,3	17733,3	18700,0	1457,2	1193,0	854,4	19448,6
3,00	72	18100,0	17200,0	17166,7	360,6	871,8	1001,7	17271,6
5,00	120	15966,7	14033,3	14233,3	1001,7	642,9	1011,6	16282,3
7,00	168	13733,3	11800,0	12100,0	1115,0	600,0	300,0	13673,6

10,00	240	9303,3	8570,0	8570,0	2290,1	1682,2	1685,9	10973,0
14,00	336	5860,0	5890,0	6056,7	415,8	312,2	388,0	6878,9
18,00	432	4143,3	4400,0	4226,7	374,3	52,9	571,2	4628,6
22,00	528	2830,0	3256,7	2753,3	355,4	420,0	319,0	3984,0

[0227] Таблица 31. Зависимость концентрации в сыворотке (нг/мл) суррогатных пептидов, представляющих различные области FP1, от времени после однократного подкожного введения яванским макакам в соответствии с определениями методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином/жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС)

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

[0228] Анализ стабильности в человеческой плазме

[0229] Целью данного исследования был анализ стабильности FP1 в человеческой плазме *ex vivo*. Свежую незамороженную человеческую плазму получали из гепаринизированной крови двух субъектов (одного мужчины и одной женщины) путем центрифугирования. FP1 инкубировали в этой матрице при температуре 37°C с осторожным перемешиванием в течение 0, 4, 24 и 48 часов. Концентрацию FP1 определяли методом иммуноанализа. Среднее отличие в процентах от начальной концентрации (0 часов) варьировало в интервале от -4,1 до -12,9 и не увеличивалось со временем, что свидетельствует о стабильности FP1 в человеческой

плазме в течение до 48 часов *ex vivo* (табл. 32 и Фиг. 15).

[0230] Таблица 32. Концентрация FP1 (мкг/мл) через 0, 4, 24 и 48 часов (ч.) инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (Sub), в соответствии с определениями иммунологическим методом

Проба <i>ex vivo</i>	Конц. в плазме мужчины Sub 1 (мкг/мл)	% отлияния T0	Конц. в плазме женщины Sub 2 (мкг/мл)	% отлияния T0	Средняя конц. (мкг/мл)	% отлияния T0
Плазма, Т 0 ч. FP1	11,503	Н/П	12,649	Н/П	12,076	Н/П
Плазма, Т 4 ч. FP1	10,524	-8,5	10,521	-16,8	10,523	-12,9
Плазма, Т 24 ч. FP1	9,934	-13,6	12,402	-2,0	11,168	-7,5
Плазма, Т 48 ч. FP1	10,582	-8,0	12,575	-0,6	11,578	-4,1

[0231] Количественное определение концентрации интактного димера после инкубации в человеческой плазме проводили методом иммуноафинного захвата/ЖХМС. Концентрации, определенные данным методом, оставались стабильными с течением времени (0, 4, 24 и 48 часов), доказывая, что FP1 сохраняется в человеческой плазме *ex vivo* в виде интактного димера в течение до 48 часов (табл. 33 и Фиг. 16).

[0232] Таблица 33. Средняя концентрация FP1 (мкг/мл) в виде интактного димера и отличие (%) от начальной концентрации через 0, 4, 24, 48 часов инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов, в соответствии с определениями методом иммуноафинного захвата/ЖХМС

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

[0233] Пример 13. Стратегия иммунного ответа

[0234] Для обнаружения антилекарственного антитела (ADA) у животных и в клинических пробах будут разработаны методы анализа иммунного ответа (IR). Анализ иммунного ответа (IR) будет определять ADA-положительные пробы для сравнения статуса по ADA с результатами фармакокинетического/токсикокинетического (PK/TK) анализа, что позволит оценивать воздействие и фармакокинетические параметры FP1. Клинический анализ иммунного ответа будет применяться для просмотра проб сыворотки, подтверждения специфичности ADA-положительных проб и определения титра ADA для подтвержденных положительных проб. Затем будет разработан метод анализа нейтрализующих антител (NAb), применимый к положительным пробам от ADA-положительных субъектов, подтвержденным на стадии 1 программы. Далее будет выполнено определение перекрестной реактивности ADA в отношении эндогенного GDF15 для применения на стадии 2 программы. Перед выполнением первого исследования у человека (FIH) будет проведена оценка риска иммуногенности, а при надлежащем обосновании возможно проведение дополнительных анализов для характеристики иммунного ответа.

[0235] Пример 14. Токсикологический план

[0236] Поскольку эндогенный рецептор-мишень для GDF15 не выявлен, отсутствуют функциональные данные в отношении FP1, как и данные о связывании *in vitro*. Тем не менее, исследования фармакологических показателей и эффективности однократных и множественных доз, проведенные на крысах, мышах и яванских макаках, продемонстрировали активность FP1 у этих видов, что свидетельствует о его влиянии на снижение потребления пищи, снижение массы тела и модуляцию переносимости глюкозы в пероральном тесте. В качестве грызунов и не-грызунов в токсикологическом исследовании, на основании результатов по эффективности, приняты крыса и обезьяна, соответственно, учитывая однако тот факт, что собственное воздействие FP1 на рецептор у этих видов (в отличие от человека) охарактеризовано не полностью.

[0237] Примеры 15-19 включают характеристику другого примера гибридного белка настоящего изобретения, описанного в

примере 5, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (кодируемую последовательностями нуклеотидов SEQ ID NO: 92 (оптимизация кодонов 1) и 110 (оптимизация кодонов 2)). Этот гибридный белок представляет собой полностью рекомбинантный белок, который существует в виде гомодимера гибрида HSA (C34S) и варианта делеции зрелого человеческого GDF15 (201-308; SEQ ID NO: 8), соединенных содержащим 42 аминокислоты линкером, состоящим из глициновых и сериновых остатков GS-(GGGS)₈. Единственный нативный свободный цистеин в положении 34 HSA был заменен на серин. Далее в примерах этот конкретный гибридный белок HSA-GDF15 для простоты будет именоваться «FP2».

[0238] Пример 15. Влияние FP2 на потребление пищи мышами линии C57BL/6

[0239] Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи самцами мышей линии C57BL/6 после введения однократной дозы. В данном исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6 (в возрасте 10-12 недель), полученных от компании Taconic Biosciences (г. Хадсон, штат Нью-Йорк, США). Мышей размещали в клетках по отдельности, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты (6:00/18:00), и предоставляли им неограниченный доступ к воде и корму. Самцы мышей линии C57BL/6 в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ; затем мышей на основании потребления пищи за последние 24 часа разделяли на шесть групп, по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композиции путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 часов после введения композиции. Для сравнения в настоящем исследовании использовали препарат 6xHis-FP1.

[0240] FP2 оказывал значительное влияние на снижение потребления пищи через 12, 24 и 48 часов после введения при всех уровнях дозы, применявшихся в испытании (табл. 34). У мышей наблюдали снижение в процентном изменении потребления пищи по сравнению с PBS во все моменты времени и при всех уровнях дозы (табл. 35).

Таблица 34. Влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи в течение 48 часов мышами линии C57BL/6

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

Данные представлены как среднее ± SEM.

* $p \leq 0,05$, по сравнению с PBS

** $p \leq 0,01$, по сравнению с PBS

*** $p \leq 0,001$, по сравнению с PBS

**** $p \leq 0,0001$, по сравнению с PBS, соответственно

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

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

Таблица 35. Влияние однократной дозы FP2 на процентное снижение потребления пищи (по сравнению с носителем в контроле) в течение 48 часов у мышей линии C57BL/6

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

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

соответственно.

Данные представлены как среднее $\pm$ SEM.

* $p \leq 0,05$, по сравнению с PBS

** $p \leq 0,01$, по сравнению с PBS

*** $p \leq 0,001$, по сравнению с PBS

**** $p \leq 0,0001$, по сравнению с PBS, соответственно

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

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

[0241] Пример 16. Влияние FP2 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули

[0242] Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи и прирост массы тела у самцов крыс линии Спрег-Доули после введения однократной дозы. Животных получили от компании Charles Rivers Labs (г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США), они имели массу тела 200-225 г и были использованы в течение одной недели после доставки. Животных размещали в клетках по отдельности на подстилках Alpha Dry, и с пластиковой трубкой для подачи, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты. Им предоставляли неограниченный доступ к воде и кормили кормом для лабораторных грызунов; Корм для грызунов Irradiated Certified PicoLab® Rodent Diet 20, 5K75* (поставщик: Purina Mills, г. Сент-Луис, штат Миссури, через ASAP, г. Квакуертаун, штат Пенсильвания, США). Перед введением дозы каждую крысу взвешивали и регистрировали массу тела.

[0243] Животные в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ; затем крыс на основании потребления пищи за последние 24 часа разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композиции путем подкожной инъекции. Изменение массы корма для каждой клетки непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 часов после введения композиции. Для сравнения в настоящем исследовании использовали препарат 6xHis-FP1.

[0244] После введения однократной дозы FP2 измеряли

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

Таблица 36. Влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи в течение 48 часов крысами линии Спрег-Доули

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

Данные представлены как среднее ± SEM.

* $p \leq 0,05$, по сравнению с PBS

** $p \leq 0,01$, по сравнению с PBS

*** $p \leq 0,001$, по сравнению с PBS, соответственно

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

n=8 на группу

Таблица 37. Влияние однократной дозы FP2 на процентное снижение потребления пищи (по сравнению с носителем в контроле) в течение 48 часов крысами линии Спрег-Доули

Процент ингибирования по сравнению с PBS			
Введение	12 часов	24 часа	48 часов
PBS	0,0 ± 4,0	0,0 ± 4,6	0,0 ± 4,3
FP2, 0,3 нмоль/кг	10,0 ± 4,7	8,5 ± 4,1	8,8 ± 3,9

FP2, 1 нмоль/кг	19,3 ± 4,7*	20,8 ± 4,1	11,5 ± 5,5
FP2, 3 нмоль/кг	25,9 ± 6,1**	32,0 ± 4,7**	26,2 ± 6,5**
FP2, 10 нмоль/кг	27,4 ± 4,8***	33,8 ± 4,1**	31,2 ± 6,4**
6xHis-FP1, 8 нмоль/кг	30,8 ± 6,6***	37,0 ± 5,4**	29,9 ± 8,8**

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

Данные представлены как среднее ± SEM.

* $p \leq 0,05$, по сравнению с PBS

** $p \leq 0,01$, по сравнению с PBS

*** $p \leq 0,001$, по сравнению с PBS, соответственно

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

n=8 на группу.

[0245] Пример 17. Влияние FP2 на потребление пищи, массу тела и гомеостаз глюкозы у мышей с алиментарным ожирением (DIO) линии C57BL/6

[0246] Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи и массу тела, а также улучшать гомеостаз глюкозы при многократной дозе у самцов мышей DIO линии C57BL/6 в течение 8 дней. В данном исследовании использовали самцов мышей DIO линии C57BL/6 (в возрасте 21 недели, откормленные жиросодержащим кормом в течение 15 недель), полученные от компании Taconic Biosciences (г. Хадсон, штат Нью-Йорк, США). Мышей размещали в клетках по отдельности, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты (6:00/18:00), им предоставляли неограниченный доступ к воде и давали корм Research Diet D12492 (Research Diets, г. Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США). Перед экспериментом мыши больше 1 недели проходили акклиматизацию в виварии для мышей. Конечными результатами исследования являлись измерения потребления пищи, массы тела, состава тела и гликемических показателей (тест OGTT, уровень глюкозы в крови). За один день перед введением дозы животных взвешивали и разделяли на группы по массе тела (BW).

Дозу мышам вводили путем подкожной инъекции. Животные, которым вводили FP2, получали данную композицию на 0-й день, 3-й день, 6-й день, 9-й день и 12-й день. Группа, получавшая носитель, и группа, получавшая розиглитазон, в эти дни получали стерильный PBS подкожно. Розиглитазон добавляли в корм в количестве 0,015%, доступ к корму не ограничивали. Массу тела и потребление пищи регистрировали ежедневно в течение пятнадцати дней. Уровень глюкозы в крови измеряли на 0, 7 и 13-й дни. Пероральный тест на переносимость глюкозы (OGTT) проводили на 14-й день. Уровни инсулина измеряли в выбранные моменты времени в ходе проведения теста OGTT. На 15-й день мышей умерщвляли посредством ингаляции CO₂ и отбирали посмертные пробы крови через пункцию сердца для анализа воздействия. Отдельную ветвь ФК проводили в группах, состоящих из трех мышей на каждую дозу, всего 15 мышей.

[0247] Анализ зависимости воздействие-ответ (E-R) для FP2 у мышей DIO

[0248] Большинство животных в фармакодинамических (ФД) ветвях (эффективность) в последний день исследования, когда отбирали фармакокинетические (ФК) пробы, имели необнаружимые концентрации лекарственного средства, возможно из-за иммуногенности. Таким образом, при проведении анализа зависимости воздействие-ответ (на 3, 6 и 9-й дни, соответственно) средние профили ФК из ветвей ФК, вместо отдельных ФК из ветвей ФД, использовали для изменения массы тела (%) относительно исходного уровня в ветвях ФД при соответственном уровне дозы. Этот метод предполагает, что с точки зрения воздействия лекарственного средства ветви ФК ведут себя аналогично ветвям ФД.

[0249] Для корреляции между воздействием и данными ответа (логарифмически преобразованные концентрации лекарственных препаратов) использовали модель E_{max} ((GraphPad Prism 6, log (агонист) против ответа)). Угловый коэффициент Хилла был принят равным 1. Следует отметить, что подобранные моделью значения ЕС₁₀-ЕС₅₀ для 3, 6 и 9 дней отличались не более чем вдвое, несмотря на то, что оценки E_{max} были различными (E_{max}=-4,26%, -8,18% и -9,85%, соответственно). У некоторых животных на 9-й

день также наблюдали снижение воздействия лекарственного средства ввиду возможного образования ADA, и поэтому оценки параметра E-R на основании данных на 9-й день следует интерпретировать с осторожностью.

[0250] Влияние двухнедельного воздействия FP2 на потребление пищи, массу тела, гомеостаз глюкозы и содержание жира в печени оценивали у самцов у мышей с алиментарным ожирением (DIO) линии C57BL/6. В ветви ФК исследования до 9-го дня исследования, воздействие в группе введения, получавшей дозу 0,3 нмоль/кг, составило 1,7-3,3 нМ FP2, в группе введения, получавшей дозу 1,0 нмоль/кг - 7,1-14 нМ, в группе введения, получавшей дозу 3,0 нмоль/кг - 20,8-41,6 нМ, в группе введения, получавшей дозу 10 нмоль/кг - 28,5-112,9 нМ FP2 (n=2 или 3, табл. 49). После 9-го дня наблюдалось снижение уровней циркуляции у большинства животных, несмотря на постоянное введение препарата по схеме q3d (табл. 49). В согласии с этим ускоренным выведением, большинство животных в ветви ФД исследования на 15-й день имело необнаружимые уровни циркулирующего FP2 (табл. 50).

[0251] Введение FP2 мышам DIO по схеме q3d привело к снижению потребления пищи (табл. 38), массы тела (табл. 39, 40 и Фиг. 20) и уровня глюкозы в крови после еды, по сравнению с носителем в контроле (табл. 43 и Фиг. 23). Значительное снижение потребления пищи наблюдали на 2-й день, 5-й день, 8-й день при дозе 0,3 нмоль/кг, с 1-го дня по 7-й день при дозе 1,0 нмоль/кг, на 1-й день, 2-й день, с 4-го дня по 6-й день, и на 8-й день при дозе 3,0 нмоль/кг, а также на 1-й день, с 3-го дня по 6-й день, на 8-й день и на 9-й день при дозе 10,0 нмоль/кг. Процентное изменение массы тела было значительным с 5-го дня по 13-й день при дозе 0,3 нмоль/кг, с 3-го дня по 13-й день при дозах 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг, и с 4-го дня по 13-й день при дозе 3,0 нмоль/кг. Изменение массы тела в граммах было значительным с 8-го дня при дозе 0,3 нмоль/кг, с 6-го дня при дозе 1,0 нмоль/кг, с 7-го дня при дозе 3,0 нмоль/кг и с 5-го дня при дозе 10,0 нмоль/кг. Снижение уровней глюкозы в крови после еды было значительным на 7-й день у животных с уровнем дозы 3,0 нмоль/кг,

и было значительным на 13-й день у животных с уровнями дозы 3,0 и 10,0 нмоль/кг.

[0252] Мыши DIO, получавшие FP2 по схеме q3d, на 14-й день имели улучшенную переносимость глюкозы по сравнению с носителем в контроле, по данным теста с пероральным введением глюкозы (табл. 41; Фиг. 21A и 21B). Уровень глюкозы значительно снижался через 30 минут в группе, получавшей дозу 0,3 нмоль/кг, через 60 минут и 120 минут в группе, получавшей дозу 1,0 нмоль/кг, через 120 минут в группе, получавшей дозу 3,0 нмоль/кг, и через 30, 90 и 120 минут в группе, получавшей дозу 10,0 нмоль/кг. Полная площадь под кривой была значительной для всех групп по дозам. Уровни инсулина по данным теста переносимости глюкозы значительно снижались через 30 минут в группах, получавших дозы 0,3 и 10,0 нмоль/кг (табл. 42; Фиг. 22A и 22B). Кроме того, по сравнению с животными, получавшими носитель, наблюдали значительное снижение вычисленного значения HOMA-IR после голодания у мышей DIO через 14 дней, в которые им вводили FP2 по схеме q3d в дозе 10,0 нмоль/кг, что указывает на улучшенную чувствительность к инсулину (табл. 44 и Фиг. 24).

[0253] Состав тела измеряли методом MPT в -1-й день перед началом исследования и на 13-й день (табл. 47 и табл. 48). Введение FP2 в дозах 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг мышам DIO приводило к значительному снижению массы жировой ткани на 13-й день; при этом не наблюдалось изменений массы нежировой ткани во всех подопытных группах. На 13-й день подопытная группа, получавшая 10,0 нмоль/кг, имела значительное увеличение относительной (%) массы нежировой ткани и значительное относительное (%) снижение массы жировой ткани по сравнению с группой, получавшей носитель. С -1-го по 13-й день были значительными изменения массы нежировой ткани в подопытных группах, получавших 0,3 нмоль/кг, 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг, и были значительными относительные изменения (%) массы нежировой ткани в подопытных группах, получавших 1,0, 3,0 и 10,0 нмоль/кг. С -1-го по 13-й день были значительными изменения массы жировой ткани и относительные изменения (%) массы нежировой ткани во всех подопытных группах по сравнению с носителем в контроле.

[0254] Не наблюдали существенных отличий в уровнях эндогенного мышинового GDF15 в сыворотке между животными, получавшими носитель и получавшими FP2 по схеме q3d в течение 15 дней (табл. 46).

[0255] Заключение: результаты показывают, что повышение воздействия лекарственного средства по существу связано с большим (%) изменением массы тела относительно исходной на уровне популяции по всем подопытным группам в исследовании, в 3, 6 и 9-й дни.

[0256] Воздействие FP2 в течение двух недель приводило к снижению потребления пищи, снижению массы тела, снижению уровня глюкозы в крови, улучшению переносимости глюкозы и чувствительности к инсулину у мышей DIO. Значительное снижение потребления пищи за множество дней было достигнуто введением доз 1,0, 3,0 и 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. Масса тела существенно снижалась, начиная с третьего - пятого дня после начала исследования. Уровень глюкозы в крови после еды значительно снизился на 13-й день после введения FP2 в дозах 3,0 и 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. Чувствительность к инсулину, которую оценивали по значительному снижению значения НОМА-IR после голодания, была достигнута через 14 дней, в которые животным вводили FP2 в дозе 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. На 13-й день наблюдали значительное повышение процентной массы нежировой ткани и значительное снижение процентной массы жировой ткани у мышей DIO, получавших FP2 в дозе 10,0 нмоль/кг по схеме q3d.

Таблица 38. Влияние FP2 на суточное потребление пищи (г) после 13 дней введения

Введение День	Носитель Н/П	FP2 (нмоль/кг)				Розиглитазон 10 мг/кг в день
		0,3	1,0	3,0	10,0	
0	2,0±0,1	1,9±0,1	2,2±0,2	1,9±0,2	1,9±0,2	2,2±0,1
1	2,4±0,2	2,1±0,1	1,6±0,1*	1,5±0,1*	1,3±0,1*	2,7±0,1
2	2,5±0,1	1,8±0,1*	1,7±0,2*	1,9±0,1*	2,0±0,1	3,0±0,2
3	2,5±0,1	2,1±0,1	1,7±0,1*	1,9±0,1	1,8±0,1*	2,8±0,2
4	2,6±0,1	2,0±0,1	1,80,1*	1,9±0,1*	1,9±0,1*	2,9±0,2

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

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

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

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

Таблица 39. Влияние FP2 на процентное изменение массы тела после 13 дней введения

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

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

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

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

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

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

Введение	Носитель	FP2 (нмоль/кг)				Розиглитазон
День	Н/П	0,3	1,0	3,0	10,0	10 мг/кг в день
-1	44,6 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6	44,5 ± 0,6
0	44,6 ± 0,6	44,3 ± 0,6	44,6 ± 0,6	44,7 ± 0,6	44,6 ± 0,7	44,4 ± 0,6
1	44,5 ± 0,7	43,8 ± 0,6	43,6 ± 0,6	43,9 ± 0,7	43,5 ± 0,7	45,0 ± 0,7
2	44,5 ± 0,7	43,3 ± 0,7	43,1 ± 0,6	43,3 ± 0,7	43,2 ± 0,7	45,0 ± 0,7

3	44,5 ± 0,7	43,2 ± 0,7	42,7 ± 0,6	43,1 ± 0,7	42,6 ± 0,6	45,3 ± 0,7
4	44,5 ± 0,7	43,0 ± 0,7	42,2 ± 0,6	42,5 ± 0,7	42,0 ± 0,7	45,2 ± 0,7
5	44,5 ± 0,7	42,4 ± 0,7	41,8 ± 0,5	42,2 ± 0,7	41,5 ± 0,6*	45,2 ± 0,7
6	44,5 ± 0,7	42,0 ± 0,7	41,3 ± 0,6*	41,6 ± 0,7	40,7 ± 0,5*	44,9 ± 0,8
7	44,7 ± 0,7	42,0 ± 0,7	41,1 ± 0,6*	41,4 ± 0,7*	40,6 ± 0,5*	45,3 ± 0,8
8	44,7 ± 0,7	41,6 ± 0,7*	41,1 ± 0,7*	41,1 ± 0,7*	40,2 ± 0,6*	45,5 ± 0,8
9	44,8 ± 0,7	41,6 ± 0,8*	40,8 ± 0,7*	40,8 ± 0,8*	40,0 ± 0,8*	45,8 ± 0,7
10	45,1 ± 0,7	41,8 ± 0,8*	41,0 ± 0,8*	40,8 ± 0,8*	39,8 ± 0,8*	46,0 ± 0,8
11	45,2 ± 0,8	41,6 ± 0,8*	40,9 ± 0,7*	40,8 ± 0,9*	39,6 ± 0,9*	46,1 ± 0,8
12	45,3 ± 0,7	41,5 ± 0,9*	41,2 ± 0,7*	41,0 ± 0,9*	39,7 ± 0,9*	46,3 ± 0,9
13	45,4 ± 0,7	41,7 ± 0,9*	41,4 ± 0,8*	41,5 ± 0,9*	39,7 ± 0,9*	46,5 ± 0,9

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

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

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

Таблица 41. Влияние FP2 на уровни глюкозы в крови (мг/дл) в тесте OGTT, проведенном через 14 дней введения

Введение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)					Полная AUC (мг/дл/ 120 мин)	Δ AUC (мг/дл/ 120 мин)
		0	30	60	90	120		

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

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

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

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

однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки для AUC

Таблица 42. Влияние FP2 на уровни инсулина (нг/мл) в тесте OGTT, проведенном через 14 дней введения

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

	3,0	3,0 ± 0,3	8,4 ± 1,5	2,5 ± 0,3	498,6 ± 77,0
	10,0	2,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5*	2,1 ± 0,4	295,5 ± 32,0
Розиглитазон	10 мг/кг в день	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2*	0,8 ± 0,1	118,5 ± 9,6*

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

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

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

однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки для AUC

Таблица 43. Влияние FR2 на уровни глюкозы в крови (мг/дл) после еды

Введение	Доза (нмоль/кг)	Время после начала введения (дней)		
		0	7	13
Носитель	Н/П	162 ± 5	159 ± 6	180 ± 9
FR2	0,3	143 ± 5	150 ± 9	168 ± 9
	1,0	153 ± 12	135 ± 7	159 ± 7
	3,0	148 ± 3	127 ± 6*	151 ± 8*
	10,0	146 ± 6	136 ± 4	148 ± 3*
Розиглитазон	10 мг/кг в день	137 ± 7	117 ± 4*	134 ± 6*

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

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

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

Таблица 44. Значение HOMA-IR после голодания у мышей DIO

через 14 дней, в которые им вводили FP2 по схеме q3d

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 46. Уровни мышинового GDF15 (пг/мл) в сыворотке мышей

DIO через 15 дней введения FP2 по схеме q3d

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

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

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

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

Таблица 47. Влияние JNJ-64739090, вводимого мышам DIO по схеме q3d, на состав тела (г), по данным MPT

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

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных

в каждый момент времени и в каждой группе

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

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

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

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

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

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

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

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

		Время после введения начальной дозы (время после введения последней дозы)						
		День 3	День 6	День 9	День 12	День 14 (48 ч.)	День 15 (72 ч.)	День 17 (120 ч.)
0,1 нмоль/ кг	9	1,930	2,993	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	10	1,853	3,369	2,817	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	1,715	2,637	2,568	2,709	3,441	1,313	< LOQ
1,0	9	8,198	9,660	9,645	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

нмоль/ кг	10	7,073	10,595	8,966	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	6,689	13,967	10,802	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3,0 нмоль/ кг	9	20,802	26,329	27,863	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	10	23,563	32,020	41,576	1,168	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	21,704	30,101	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
10,0 нмоль/ кг	9	28,495	33,050	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	10	70,779	112,898	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	11	70,404	111,767	55,117	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Данные выражены в виде концентрации у каждого животного.

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

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

Таблица 50. Терминальные воздействия FP2 в сыворотке (нМ) у мышей D10 через 15 дней введения по схеме q3d

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

Данные выражены в виде концентрации у каждого животного.

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

[0257] Пример 18. Фармакокинетика FP2 у различных видов животных и иммунный ответ

[0258] Фармакокинетика у мышей

[0259] Фармакокинетические свойства FP2 оценивали путем подкожного введения самкам мышей линии C57BL/6. FP2 вводили подкожно (n=5 проб на каждый момент времени) и внутривенно (n=5 проб на каждый момент времени) самкам мышей линии C57BL/6 (Sage Laboratories, г. Сент-Луис, штат Миссури, США) при уровне дозы

2,0 мг/кг в PBS (рН 7,3–7,5). В последний момент времени отбирали пробы терминальной крови. В течение 168 часов отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Уровни FP2 измеряли методом иммуноанализа. Профили концентрации лекарственного средства в плазме сведены в табл. 51 и 52, и показаны на Фиг. 25.

[0260] Фармакокинетический анализ показал, что терминальный период полужизни FP2 у мышей линии C57BL/6 после внутривенного и подкожного введения составил ~ 1,51 и 1,76 дня, соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~ 61%.

Таблица 51. Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения подкожно (п/к) мышам линии C57BL/6

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

Таблица 52. Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения внутривенно (в/в) мышам линии C57BL/6

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

Таблица 53. Фармакокинетические параметры FP2 после введения внутривенно в дозе 2 мг/кг и подкожно в дозе 2 мг/кг мышам линии C57BL/6

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

[0261] Фармакокинетика у крыс

[0262] FP2 вводили подкожно (n=5 проб на каждый момент времени) и внутривенно (n=5 проб на каждый момент времени) самкам крыс линии Спрег-Дуули (Sage Laboratories, г. Сент-Луис, штат Миссури, США) при уровне дозы 2,0 мг/кг в PBS (pH 7,3-7,5). В последний момент времени отбирали пробы терминальной крови. В течение 168 часов отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Уровни FP2 измеряли методом иммуноанализа. Профили концентрации лекарственного средства в плазме сведены в табл. 54 и 55, и показаны на Фиг. 26. Фармакокинетические параметры, рассчитанные на основании этих данных, сведены в табл. 56.

[0263] Фармакокинетический анализ FP2 у крыс линии Спрег-Дуули показал, что терминальный период полужизни после внутривенного и подкожного введения составил ~ 1,46 и 1,37 дня, соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~ 28%.

Таблица 54. Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения подкожно (п/к) крысам линии Спрег-Дуули

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

Таблица 55. Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после

однократного введения внутривенно (в/в) крысам линии Спрег-Доули

Момент времени	FR2, доза, внутривенно						
	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Результат животного	Средний результат	Станд. откл.
	06 (нг/мл)	07 (нг/мл)	08 (нг/мл)	09 (нг/мл)	10 (нг/мл)	(нг/мл)	(нг/мл)
1 ч.	60 785,80	47 392,80	43 046,54	46 014,25	44 547,65	48 357,41	7134,5
24 ч.	25 470,36	24 729,88	21 157,29	20 497,32	21 459,71	22 662,91	2267,1
72 ч.	8208,46	9262,13	8866,76	8635,93	8843,83	8763,42	384,1
96 ч.	4433,18	4833,22	4995,63	4630,60	4604,13	4699,35	218,1
168 ч.	1083,14	1469,35	1614,61	1394,17	1053,89	1323,03	245,7

Таблица 56. Фармакокинетические параметры FR2 после введения внутривенно в дозе 2 мг/кг и подкожно в дозе 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули

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

[0264] Фармакокинетика у обезьян

[0265] FR2 вводили подкожно в дозе 1 мг/кг и внутривенно в дозе 1 мг/кг трем самцам яванского макака каждому, в PBS (pH 7,0-7,6). В течение 21 дня отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства.

[0266] Фармакокинетические (ФК) параметры FR2 характеризовали после введения яванским макакам однократной дозы внутривенно (1,0 мг/кг) и подкожно (1,0 мг/кг). Зависимость концентрации лекарственного средства в плазме от времени после введения подкожно, по данным иммуноанализа и ЖХМС, сведена в табл. 57 и 58, соответственно, а после введения внутривенно, по данным иммуноанализа и ЖХМС, сведена в табл. 59 и 60, соответственно. Данные иммуноанализа представлены в виде графика на Фиг. 27, а данные ЖХМС представлены на Фиг. 28.

[0267] Исходя из результатов иммуноанализа, среднее значение терминального периода полужизни ($t_{1/2}$) FR2 после

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

Таблица 57. Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макак после однократного введения подкожно, по данным иммуноанализа

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

Н/П – не применимо

Таблица 58. Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макак после однократного введения подкожно, по данным ЖХМС

ЖХМС					
Время (ч.)	Животное 704	Животное 705	Животное 706	Сред. , подкожное	SEM

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

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

#=неправильно маркированная пробирка, проба исключена из анализа

Н/П - не применимо

Таблица 59. Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макаков после однократного введения внутривенно, по данным иммуноанализа

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

528	< 80,0	2069,0	2416,2	2242,6	Н/П
-----	--------	--------	--------	--------	-----

Н/П – не применимо

Таблица 60. Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макак после однократного введения внутривенно, по данным ЖХМС

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

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

Н/П – не применимо

#=неправильно маркированная пробирка, проба исключена из анализа

Таблица 61. Среднее значение ($\pm$ CO) фармакокинетических параметров FP2 после внутривенного и подкожного введения яванским макакам в дозе 1 мг/кг

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

ФК параметры представляют собой средние значения ФК по

данным иммуноанализа, на основании NCA.

*Tmax (медиана)

[0268] Анализ стабильности в человеческой плазме

[0269] Стабильность FP2 исследовали в свежей гепаринизированной плазме *ex vivo* при 37°C в течение до 48 часов. Свежую незамороженную человеческую плазму получали из гепаринизированной крови двух субъектов (одного мужчины и одной женщины) путем центрифугирования. FP2 инкубировали в этой матрице при температуре 37°C с осторожным перемешиванием в течение 0, 4, 24 и 48 часов. Концентрацию FP2 определяли методом иммуноанализа. Количественное определение концентрации интактного димера в этой матрице при условиях анализа проводили методом независимого иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

[0270] По данным иммуноанализа коэффициент извлечения в процентах от исходной концентрации варьировал в интервале 104,8–94,1 и не уменьшался с течением времени, доказывая, что FP2 стабилен в человеческой плазме *ex vivo* в течение до 48 часов (Фиг. 29 и табл. 62). По данным ЖХМС, концентрация оставалась стабильной во времени, доказывая, что JNJ-64739090 остается в человеческой плазме *ex vivo* в виде интактного димера в течение до 48 часов (Фиг. 30 и табл. 63).

Таблица 62. Стабильность FP2 в человеческой плазме *ex vivo* (нг/мл) (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, по данным иммунологического анализа

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

		48	8912	94,1
--	--	----	------	------

Таблица 63. Стабильность FP2 в человеческой плазме ex vivo (нг/мл) (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, по данным интактной ЖХМС

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

[0271] **Пример 19. Эффективность FP1 и FP2 у яванских макак**

[0272] Были оценены влияния FP1 и FP2 на потребление пищи и массу тела после введения однократной дозы у новых яванских макак.

[0273] FP1 подкожно вводили группе новых яванских макак в трех разных уровнях доз: 1, 3 и 10 нмоль/кг. Также в исследование включили группу, получавшую носитель. Животным вводили препарат по слепому методу. Исследование продолжалось в целом 6 недель: в течение 2 недель измеряли исходные уровни потребления пищи и собирали данные, и в течение 4 недель собирали данные после одноразового введения композиции. Воздействия лекарственного препарата в плазме измеряли на 1, 7, 14, 21 и 28-й день после введения.

[0274] Введение яванским макакам однократной дозы FP1 приводило к снижению потребления пищи и массы тела, по сравнению с носителем в контроле (Фиг. 32-33). Значительное снижение суточного потребления пищи наблюдали на 4, 5, 6 и 8-12-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (Фиг. 32). Среднее суточное потребление пищи за неделю значительно снизилось на 2-й неделе после введения уровня дозы 10 нмоль/кг. При уровне дозы 3 нмоль/кг

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

[0275] FR2 подкожно вводили группе новых яванских макак в трех разных уровнях доз: 1, 3 и 10 нмоль/кг. Также в исследование включили группу, получавшую носитель. Животным вводили препарат по слепому методу. Исследование продолжалось в целом 11 недель: в течение 5 недель измеряли исходные уровни потребления пищи и собирали данные, в течение 1 недели вводили препарат, и в течение 5 недель собирали данные о стадии выведения. Воздействия лекарственного препарата в плазме измеряли на 1, 7, 14, 21, 28, 35 и 42-й дни после введения.

[0276] Введение яванским макакам однократной дозы FR2 приводило к снижению потребления пищи и массы тела, по сравнению с носителем в контроле (Фиг. 34-35). Значительное снижение суточного потребления пищи наблюдали на 3, 5-8, 10 и 12-й дни при уровне дозы 3 нмоль/кг, и на 3-38 и 40-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (Фиг. 34). Среднее суточное потребление пищи за неделю значительно снизилось на 1-й неделе после введения дозы 3 нмоль/кг, и значительно снизилось на 1-6-й неделях после введения дозы 10 нмоль/кг. При уровне дозы 3 нмоль/кг наблюдали значительное процентное снижение среднего суточного потребления пищи за неделю на 2-й неделе после введения дозы, по сравнению с потреблением до введения дозы, а при уровне дозы 10 нмоль/кг наблюдали значительное процентное снижение среднего суточного потребления пищи за неделю на 1-6-й неделях после введения дозы, по сравнению с потреблением до введения дозы. Значительное процентное изменение массы тела по сравнению с 0 днем наблюдали на 21-42-й дни при уровне дозы 1 нмоль/кг, на 14-42-й дни при уровне дозы 3 нмоль/кг, и на 7-42-й дни при уровне дозы 10

нмоль/кг (Фиг. 34).

[0277] Пример 20. Гетеродимер HSA-GDF15:GDF15

[0278] Было проведено исследование биоактивности гетеродимера HSA-GDF15:GDF15.

[0279] Для создания гетеродимера HSA-GDF15:GDF15 были разработаны два конструкта. Первый конструкт содержал HSA, соединенный с N-концом зрелого GDF15 (AA 203-308) посредством глицин-серинового линкера (SEQ ID NO: 93). Второй конструкт содержал меченный 6х гистидином HSA, соединенный с N-концом зрелого GDF15 (AA 197-308) посредством глицин-серинового линкера и сайта расщепления протеазы HRV3C (SEQ ID NO: 94). Эти плазмиды котрансфицировали в соотношении 1: 1 в системе Expi293™ Expression (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Пептиды секретировались как белки HSA-GDF15, включая гетеродимерную и гомодимерную формы, в которых мономеры связывались посредством дисульфидных мостиков.

[0280] Супернатанты с клеточных культур временно трансфицированных клеток Expi293™ собирали через 5 дней после трансфекции, осветляли центрифугированием и стерилизовали фильтрованием (0,2 мкм, мембрана PES, Corning). Осветленные супернатанты загружали в колонку HisTrap HP (GE Healthcare), уравновешенную раствором 20 mM фосфата натрия, 500 mM NaCl с pH 7,4. После загрузки несвязанный белок удаляли путем промывания колонки уравнивающим буферным раствором. Белки HSA-GDF15, включая гетеродимерную и гомодимерную формы, связывались в колонке и элюировались раствором 20 mM фосфата натрия, 150 mM имидазола с pH 7,4. Фракции элюата объединяли и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C в присутствии меченого 6х гистидином фермента HRV3C (компания Janssen) для получения гетеродимера HSA-GDF15:GDF15. После инкубации раствор белка диализовали в уравнивающим буферном растворе для удаления имидазола, а затем еще раз пропускали через колонку HisTrap HP. Гетеродимер HSA-GDF15:GDF15, элюировали раствором 20 mM фосфата натрия, 50 mM имидазола с pH 7,4 на этапе промывания, при этом меченные гистидином белки удерживались. Гетеродимер

дополнительно подвергали очистке методом эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare) уравновешенной в 1x DPBS, pH 7,2. Фракции элюата из колонки SEC, содержащие HSA-GDF15:GDF15 высокой чистоты (по данным SDS-PAGE) объединяли и фильтровали. Концентрации белка определяли по поглощению при 280 нм на спектрофотометре BioTek SynergyHTM. Качество очищенных белков оценивали методами SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Ultimate 3000). Уровни эндотоксина измеряли методом LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod). Очищенный белок хранили при 4 °C.

[0281] Клетки SK-N-AS (ATCC), стабильно экспрессирующие рецептор GDF15 (GFRAL), за 24 часа перед анализом высевали в среду для выращивания (10% FBS) в планшете на 96 лунок. Через 24 часа клетки истощали в течение 3 часов в инкубаторе при температуре 37 °C, для чего среду культивирования заменяли на 200 мкл эссенциальной среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с добавлением 1% лошадиной сыворотки HI. Затем среду с добавлением 1% лошадиной сыворотки HI заменяли на 200 мкл AB1 и дополнительно инкубировали в течение 2 часов в инкубаторе при температуре 37 °C. При проведении анализа из всех лунок аспирировали AB1, добавляли 100 мкл исследуемой композиции в разных концентрациях в AB2, после чего планшет инкубировали в течение 15 мин. в инкубаторе при температуре 37 °C. Через 15 минут исследуемый раствор извлекали и добавляли 30 мкл лизирующего буфера (содержится в наборе для обнаружения), планшет встряхивали на планшетном шейкере при комнатной температуре в течение 30 мин. Для обнаружения, 16 мкл лизированной пробы переносили в планшет для анализа на 384 лунки и добавляли 4 мкл детекторных антител HTRF pAKT. Планшет инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, а затем считывали сигнал HTRF на приборе Envision (Perkin Elmer).

[0282] Значения EC₅₀ рассчитывали методом нелинейной регрессии (подгонки кривой) с помощью программного приложения GraphPad Prism®. Данные представляли как среднее ± стандартная ошибка (CO) по трем отдельным экспериментам, с тремя

повторностями на каждую точку данных. Молекулярную идентичность гетеродимера HSA-GDF15:GDF15 подтверждали методом масс-спектрометрии. Сдвиг кривой гетеродимера влево указывает на то, что гетеродимер HSA-GDF15:GDF15 обладает большей мощностью в индуцировании pAKT по сравнению с соответствующей молекулой гомодимера с дополнительным альбумином.

[0283] Пример 21. Термостабильность линкера

[0284] Исследовали термостабильность для различных линкеров, соединяющих HSA и GDF15. Для оценки способности к фрагментированию и образованию агрегатов гибридные белки HSA-GDF15 с разными линкерами разводили до концентрации 10 мг/мл. После добавления ЭДТА и метионина пробы инкубировали при температуре 40°C в течение 14 дней. Затем пробы разводили до концентрации 1 мг/мл и оценивали методом эксклюзионной/высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-ВЭЖХ). В этих белках количественно определяли процентное содержание интактного белка, а также фрагментов и агрегатов. В табл. 64 показано, что белки HSA-GDF15 с линкерами, состоящими из повторов AP, наиболее устойчивы к фрагментированию в условиях тепловой нагрузки.

[0285] Чтобы оценить, влияют ли эти линкеры на взаимодействие GDF15 с его рецептором, проводили иммунный анализ, при котором на планшет наносили гибридный белок GFRA1-Fc и определяли анти-GDF15 или анти-HSA с использованием моноклональных антител к GDF15 (Janssen) и к HSA (Kerafast, Inc., г. Бостон, штат Массачусетс, США). Анализ показал, что все эти варианты линкеров, представленные в табл. 66, связываются с рецептором схожим образом.

Таблица 64. Результаты эксклюзионной/высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-ВЭЖХ) после тепловой нагрузки в течение 14 дней

SEQ ID NO	Линкер	Агрегаты (%)	Интактные (%)	Фрагменты (%)
113	GS (GGGGS) ₈	3,33	84,44	12,22
115	GA (GGGGA) ₈	3,51	87,98	8,5

117	(AP) ₁₀	1,64	98,36	0
119	(AP) ₁₂	2,36	97,64	0
121	GGG- (EGKSSGSGSESKST) ₃ - GGG	1,67	85,24	13,09
123	GS (PGGG) ₈	2,96	88,12	8,91
125	GS (AGGG) ₈	3,44	86,22	10,34
127	GGG- (EGKSSGSGSESKST) ₂ - GGG	1,71	91,17	7,12

[0286] Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации, без отступления от существа и объема настоящего изобретения.

[0287] Последовательности, на которые в настоящей заявке приводятся ссылки, представлены ниже в таблице:

WT - дикий тип

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	Человеческий сывороточный альбумин, WT (HSA)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQGLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAASQAAL GL
2	Вариант HSA, C34S	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQGLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC

		TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL
3	Вариант HSA, C34A	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVDFEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL
5	HSA (C34S) – GS (GGGS) ₄ – GDF15 (WT) гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVDFEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
6	Зрелый GDF15 (197–308)	ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFR AANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLA KDCHCI
7	Усеченный зрелый GDF15 (200–308)	GDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAAN MHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDC HCI
8	Усеченный зрелый GDF15 (201–308)	DHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANM HAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCH CI
9	Усеченный зрелый GDF15 (202–308)	HCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMH AQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHC I
10	Усеченный зрелый	CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA

	GDF15 (203-308)	QIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
11	Усеченный зрелый GDF15 (211-308)	CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
25	HSA (C34S) - AS (GGGGS) ₂ GT - -GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASGGGSGGGSGGTARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPR EVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQ KTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
26	HSA (C34S) - AS (GGGGS) ₈ GT - GDF15 (WT)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGTARNGDHC PLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
27	HSA (C34S) - AS (AP) ₅ GT - GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLNGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLASAPAPAPAPAPGTARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
28	HSA (C34S) AS (AP) ₁₀ GT – GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGTARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
29	HSA (C34S) – AS (AP) ₂₀ GT – GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPGTARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
30	HSA (C34S) – AS (EAAAK) ₄ GT – GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLASEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGTARNGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDL GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
31	HSA (C34S) - AS (EAAAK) ₈ GT- GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLASEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKGTARNGDHC PLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
36	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 гибрид (мутант, делеция 13)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSCSRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVT MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGT VSLQTYDDLLAKDCHCI
37	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 гибрид (мутант, делеция 14)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVDMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTM CIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVS SLQTYDDLLAKDCHCI
40	HSA (C34S) – GS (GGGS) ₄ – GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI
48	HSA (C34A) – GS (GGGS) ₄ –GDF15 гибрид	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGVS LQTYDDLLAKDCHCI
55	HSA (C34A) – GS (GGGS) ₈ – GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVAAPAEVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
67	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (V87A, I89A, L98A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMALAQKTDGTGVSAQTYDDLLAKDCHCI
68	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (L34A, S35A, I89A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVAAPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLAQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
69	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (V87A, I89A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMALAQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
70	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (Q60W)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
71	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (W32A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGW ADAVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
72	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELF EQLG EYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
73	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (Q60A, S64A, R67A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAAIKTALHALKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
74	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A, Q60A, I61A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA ADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAAAKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI
75	HSA (C34S) - GS (GGGGS) ₄ - GDF15 (W29A, W32A)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL

		GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGA ADAVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPAS YNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
76	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 5	gacgcccacaagagcgaggtggcccaccgggttcaaggacctgggagagagaa cttcaaggccctggtgctgacgcttcgcccagtagctgcagcagctccccct tcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagacctgcacacctgttcgg cgacaagctgtgcacctgtggccacctgcgggagacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacgagtgcttctctgcagcacaag gacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggcccgaggtggacgtgatgtg caccgccttcacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgaga tcgcccggcgccacctacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaag cgggtacaaggccgccttcaccgagtgctgccaggccgcccagacaaggccgcctg cctgctgcccagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgcca agcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagttcgggcagcgggccttcaag gcctggggcctggcccggctgagccagcgggttccccaaaggccgagttcgccga ggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacg gcgacctgctggagtgcgccgacgaccgggcccagacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgcgagaagccccct gctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgcgg acctgcccagcctggccgcccgaacttctgaggagcaaggacgtgtgcaagaac tacgccgaggccaaggacgtgttctggtcatgttctgtacgagtagccccg gcggcacccccgaactacagcgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacg agaccacctggagaagtgtgcgccgcccgcgacccccacgagtgctacgcc aaggtgttcgacgagttcaagccccctggtggaggagccccagaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccc tgctggtgcggtacaccaagaaggtgccccaggtgagcacccccacctggtg gaggtgagccggaacctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcaccgccga ggccaagcggatgccctgcgccgaggactacctgagcgtggtgctgaaccagc tgtgcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgacccgggtgaccaagtgtgc accgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggagggtggacga gacctacgtgcccagaggttcaacgccgagaccttcaccttccacgccgaca tctgcacctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgccctggtg gagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgat ggacgacttcgcccgccttctgaggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgcccagggagggaagaagctggtggccgcccagccaggccgcctg ggcctgggcagcggcgggcgccgagcggcgggcgggatctggtggagggtgg cagtgaggaggggggatccgctcgcaacgggtgacctgacctctgggtcctg gtcgctgctgccgcctgcacaccgttcgcgcttctctggaagacctgggttg gctgactgggttctgtctcctcgcaagttcagggttaccatgtgcacggtgc ttgcccttctcagttccgcgctgctaactgcacgctcagatcaaacctctc tgcaccgcctgaaacctgacaccgttctctgctccttgctgcgttctctgcttct

		tacaaccctatggttctgatccagaaaaccgacaccggtgtttctctgcagac ctacgacgacctgctggctaaagactgccactgcatc
77	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 25	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcggagaagaaaa ttttaaggccctcgctgttatcgcttcgcccataacctccagcagtcctcggt tcgaggaccacgtgaagctcgctgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgcccagaaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgctcgctgggtccgcccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcttccacgacaacgaggaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgctgggagggcacccttattttctacgccccgaactgttggttcttcgccaag cgggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgcccagataaggcggcttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctgctgatgaggggaaggcgctcctccgcta agcagcggctgaaatgtgctgagcctccagaagtccggggagcgcgcttcaag gcctgggcccgtggcgcgctgtctcaacgggtcccgaaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctgggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgttgctacg gctgctgctggaatgcgcccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttctgctcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctcccgctccctggccgcccgatcttctgtggagtgcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgccacccggactactcggtcgctgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaaccactctggagaagtgcctgcgcccgcgaggaccgcacgagtgctacgca aagggtgttcgacgagttcaagccacttgctcaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgcgctacaccaagaagggtccccaggtgtccactccgacctgggtg gaagtgtccaggaacctgggaaagggtcggctccaagtgttgcaagcatcccga ggctaagcgcgatgccctgcgcccaggactacttgctcgtggtgctgaatcagc tgtgcgtgctccatgaaaagaccccagtgctccgacagagtgaaccaagtgtgt accgaatcgctcgctgaaccggcgccgctgcttttccgactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttccacgcccgaca tctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctgggtg gagcttgtaaacacaagcctaaggccaccaaagagcagctgaaggccgctcat ggatgatttccgggccttcgtggaaaagtgttgtaaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgcccgaagaaggaaagaagctcgtagcagctcacaggccgctctg ggcctcgctagcgggtggagggggcagcgggtggaggatccggtaaccgcgcg caacggggaccactgtccgctcgggcccggggttgctgccgtctgcacacgg tccgcgcgtcgctggaagacctgggctgggcccgattgggtgctgtcgccacgg gaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgcgtgcccagagccagttccgggccc aaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacacgg tgccagcgcctgctgcgtgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaa aagaccgacaccggggtgtcgtccagacacctatgatgacttgtagccaaaga

		ctgccactgcata
78	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 26	gatgctcataagtcgaagtcgcccacagattcaaggacctcggagaagaaaa ttttaaggccctcgtgcttatcgcttcgcccatacctccagcagtcctcgt tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggtgaatccgcccagaaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgctcgcctggctcgccctgaggtcgacgtgatgtg caccggttccacgacaacgaggaaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgcgcgaggacccttatttctacgccccgaactgttggttcttcgccaag cgggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgcccagataaggcggttg cctgctgccgaagctcgacgagttgcgcatgaggggaaggcgctcctccgcta agcagcggtgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgcgcttcaag gcctggggcggtggcgcgctgtctcaacgggtcccgaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgttgacg gcgatctgctggaatgcgcccgatgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctcccgctccctggccgcccatttcgtggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttcctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgccacccggactactcggtcgtgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaaccactctggagaagtgtgcgcccgcgcccggaccgcacgagtgctacgca aaggtgttcgacgagttcaagccacttgctcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgcgctacaccaagaagggtccccagggtgtccactccgacctgggtg gaagtgtccaggaacctgggaaaggctcggtccaagtgttgcaagcatcccgga ggctaagcgcatgccctgcgcccaggactacttgctccgtgggtgctgaatcagc tgtgcgtgctccatgaaaagaccccgagtgctccgacagagtgaccaagtgtgt accgaatcgctcgtgaaccggcgccgctgcttttcgcactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttccacgcccagaca tctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctgggtg gagcttggtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcggggccttcgtggaaaagtgttgtaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgcccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgctcacaggccgctctg ggcctcgctagcggaggtggcggtatcaggtggcgaggttagcggtggaggcg ctctggcgaggtggatcaggcgaggaggttccggtggaggaggtcaggag gaggaggaagtggaggaggggatccggtaccgcgcgcaacgggggaccactgt ccgctcgggccggcggttgctgcccgtctgcacacgggtccgcgctcgctgga agacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacca tgtgcatcggcgctgcccagagccagttccggggcggaacatgcacgcgcag atcaagacgagcctgcaccgcctgaagcccgcacgggtgccagcgccctgctg cgtgcccgcagctacaatcccatgggtgctcattcaaaagaccgacaccgggg

		tgtcgctccagacctatgatgacttggttagccaaagactgccactgcata
79	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 27	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagaagaaaa ttttaaggccctcgtgcttatcgcttcgcccataacctccagcagtgccccgt tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggtatgaatccgcccagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgctcgcctgggtccgacctgaggtcgacgtgatgtg caccggttccacgacaacgaggaaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgcgcgaggacccttattttctacgccccgaactgttggttcttcgccaag cgggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgcccagataaggcggttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctgcatgaggggaaggcgctcctccgcta agcagcgggtgaaatgtgctgagcctccagaagttcggggagcgcgcttcaag gcctggggcggtggcgcgctgtctcaacgggtcccgaaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatggtgtcacg gcatctgctggaatgctgcccagatgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctcccgctccctggccgcccatttcgtggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttcctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgccacccggactactcggtcgtgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaaccactctggagaagtgtgctgcccgcgcccggaccgcacgagtgctacgca aagggtgttcgacgagttcaagccacttgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgctacaccaagaagggtccccagggtgtccactccgacctgggtg gaagtgtccaggaacctgggaaagggtcggtccaagtgttgcaagcatcccgga ggctaagcgcatgccctgcccggaggactacttgctccgtgggtgctgaatcagc tgtgctgctccatgaaaagaccccagtggtccgacagagtgaccaagtgtgtg accgaatcgctcgtgaaccggcgccgctgcttttccgactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaaccttcactttccacgcccagaca tctgcactctgtccgagaaggagcgccagattagaagcagactgccctgggtg gagcttggtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcggggccttcgtggaaaagtgttgtaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgcccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggcctcgctagcgcacctgccccgctccagctcctgcaccaggtaccgcgcg caacggggaccactgtccgctcgggcccggggttgctgcccgtctgcacacgg tccgcgctcgtggaagacctgggctgggcccagattgggtgctgtcgccacgg gaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgcccagagccagttccgggcccgc aaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcaccgctgaagcccgcacacgg tgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaatcccatggtgctcattcaa aagaccgacacgggggtgtcgctccagacctatgatgacttggttagccaaaga ctgccactgcata

80	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 28	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcggagaagaaaa ttttaaggccctcgtgcttatcgcttcgcccatacctccagcagtcctcgt tcgaggaccacgtgaagctcgtgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggtgaatccgcccagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgctcgctgggtccgacctgaggtcgacgtgatgtg caccgcttccacgacaacgaggaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgctggaggacccttattttctacgccccgaactgttggttcttcgccaag cgggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgcccagataaggcggcttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctgcatgaggggaaggcgctcctccgcta agcagcgggtgaaatgtgctgagcctccagaagttcggggagcgcgcttcaag gcctgggcccgtggcgcgctgtctcaacgggtcccgaaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatggtgtcacg gcatctgctggaatgcgcccgtgacagagccgatttgccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttctgtaaaagtgaaggaatgctgcaaaaagccctt gctggaaaagtccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctcccgctccctggccgcccgtttctgtaggtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgccaccggaactactcggtcgtgctcctgctgagactggcaaaagacctacg aaaccactctggagaagtgtgctgcccgcgcccggaccgcacgagtgctacgca aagggtgttcgacgagttcaagccacttgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgtgctacaccaagaagggtccccaggtgtccactccgacctggtg gaagtgtccaggaacctgggaaagggtcggtccaagtgttgcaagcatcccg ggctaagcgcgtgacctgcccgcgaggactacttgtccgtggtgctgaatcagc tgtgctgctccatgaaaagaccccgagtgctccgacagagtgaaccaagtgtgt accgaatcgctcgtgaaccggcgccgctgttttccgactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttccacgcccaca tctgcaactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgcccgttctggtgaaaagtgttgtaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgcccgaagaaggaaagaagctcgtggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgttagcgcacctgccccgctccagcaccgcgcccagccccgtctcc cgcaccagctcctgcaccaggtaccgctcgcaacggtgacctgacctctgg gtccctggctgctgctgccgctgcacaccgttcgctgttctctggaagacctg ggttgggctgactgggttctgtctcctcgcaagttcagggttaccatgtgcat cgggtgcttgcccttctcagttccgctgctaacatgcacgctcagatcaaaa cctctctgcaccgctgaaacctgacaccgttctgctccttctgctgcttct gcttcttacaacctatgggttctgatccagaaaaccgacaccgggtgtttctct gcagacctacgacgacctgctggctaagactgccactgcatc
81	Нуклеиновая	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcggagaagaaaa

	кислота, кодирующая SEQ ID NO: 29	ttttaaggccctcgctgcttatcgccctcgcccaatacctccagcagtcctcgt tcgaggaccacgtgaagctcgctgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgcccagaaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgccctcgccctggctcgccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcggtccacgacaacgaggaaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgcgcgaggacccttattttctacgccccgaactgttggttcttcgccaag cgggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgcccagataaggcggcttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctgcgatgaggggaaggcgtcctccgcta agcagcgggtgaaatgtgcgagcctccagaagttcggggagcgcgccttcaag gcctggggcgtggcgcgccctgtctcaacgggtcccgaaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgttgtcacg gcgatctgctggaatgcgcccgatgacagagccgattttggccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctcccgctccctggccgcccatttcgtggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttcctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgccaccggaactactcggtcgctgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaaccactctggagaagtgcctgcgcccgcgggacccgcacgagtgctacgca aagggtgttcgacgagttcaagccacttctcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgctgcgctacaccaagaaggtccccaggtgtccactccgaccttggtg gaagtgtccaggaacctgggaaaggtcggctccaagtgttgcaagcatcccgga ggctaagcgcgatgccttgcgcccaggactacttgtccgtgggtgctgaatcagc tgtgctgctccatgaaaagacccagtgctccgacagagtgaccaagtgtgtg accgaatcgctcgctgaaccggcgccgctgcttttccgactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaaccttcactttccacgcccga tctgcaactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccttggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgggccttcgtggaaaagtgttgtaaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgccaagaaggaaagaagctcgctggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgctagcgcacctgccccgctccagccccagctcctgcacctgctcc agcaccagctcctgcaccagctccagccccctgcacctgcaccgctccagccc cagctcctgcacctgctccagcaccaggtaccgcgcgcaacggggaccactgt ccgctcgggcccggcggttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgctgga agacctgggctgggcccattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgaacca tgtgcatcggcgcgctgcccagagccagttccggggcggaacatgcacgcgcag atcaagacgagcctgcaccgctgaagcccgcacgggtgccagcgccttgcctg cgtgcccgcagctacaatcccattgggtgctcattcaaaagaccgacaccgggg tgtcgctccagacctatgatgacttgtagccaaagactgccactgcata
82	Нуклеиновая	gatgctcataagtccgaagtcgcccacagattcaaggacctcgagagaagaaaa

	кислота, кодирующая SEQ ID NO: 30	ttttaaggccctcgctgcttatcgccctcgcccaatacctccagcagtcctcgt tcgaggaccacgtgaagctcgctgaacgaagtgaccgagtttgccaagacttgt gtggcggatgaatccgccgagaactgcgacaagagcctccacacgctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtcgccacgctgagagaaacttacggagagatggccg actgctgcgcaaagcaggagccggaacggaacgaatgcttcctgcaacataag gacgataaccctaacttgccctcgccctgggtccgcccctgaggtcgacgtgatgtg caccgcggtccacgacaacgaggaaacctttcttaagaagtacctgtacgaga ttgcgcgaggacccttattttctacgccccgaactgttggttcttcgccaaag cgggtacaaggctgcctttaccgaatgctgccaggccgcccagataaggcggcttg cctgctgccgaagctcgacgagttgctgcgatgaggggaaggcgtcctccgcta agcagcgggtgaaatgtgctgagcctccagaagttcggggagcgcgccttcaag gcctggggcgtggcgcgccctgtctcaacgggtcccgaaaggccgagttcgccga agtgtcgaagctgggtcaccgacctgacgaaagtgcacaccgaatgttgtcacg gcgatctgctggaatgcgcccgatgacagagccgattttggccaagtacatctgc gaaaaccaggacagcatttcgtcaaagctgaaggaatgctgcgaaaagccctt gctggaaaagtcccactgcatcgcggaagtggagaacgacgagatgcccgccg acctcccgctccctggccgcccatttcgtggagtcgaaggatgtgtgcaagaac tacgcagaagccaaggacgtgttcctgggaatgtttctgtatgagtacgcccg ccgccaccggaactactcggtcgctgctcctgctgcgactggcaaagacctacg aaaccactctggagaagtgcctgcgcccgcgggacccgcacgagtgctacgca aagggtgttcgacgagttcaagccacttgtcgaggagcctcagaacctgatcaa gcagaactgcgaactgttcgagcagctgggagagtacaaattccagaacgcgc ttctcgctgcgctacaccaagaaggtcccccagggtgtccactccgaccttggtg gaagtgtccaggaacctgggaaagggtcggctccaagtgttgcaagcatcccga ggctaagcgcgatgccttgcgcccaggactacttgtccgtgggtgctgaatcagc tgtgctgctccatgaaaagaccccagtggtccgacagagtgaccaagtgtgtg accgaatcgctcgctgaaccggcgccgtgcttttccgactggaggtggacga aacctacgtgccgaaggagttcaacgcagaaaccttcactttccacgcccga tctgcactctgtccgagaaggagcggcagattaagaagcagactgccctgggtg gagcttgtgaaacacaagcctaaggccaccaaaagagcagctgaaggccgtcat ggatgatttcgggccccttcgtggaaaagtgttgtaaaagcggacgacaaggaga cttgcttcgccgaagaaggaaagaagctcgctggcagcgtcacaggccgctctg ggctcgctagcgaagcagcagccaaagaagcagccgcaaaagaagcagccgc taaggaggccgcagcaaagggtaccgcgcgcaacggggaccactgtccgctcg ggcccgggcggttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgctggaagacctg ggctggggcgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcat cggcgctgcccagaccagttccggggcgcaaacatgcacgcgcagatcaaga cgagcctgcaccgctgaagcccgacacgggtgccagcgcctgctgctgccc gccagctacaatcccatgggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgtcgct ccagacctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcata
83	Нуклеиновая кислота,	gacgcccacaagagcgaggtggccaccgggttcaaggacctgggcgaggagaa cttcaaggccctgggtgctgatcgcccttcgccagctacctgcagcagtcctcct

	кодирующая SEQ ID NO: 40	tcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacctgttcgg cgacaagctgtgcaccggtggccacctgcgggagacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacgagtgtcttctgcagcacaag gacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggccccgaggtggacgtgatgtg caccgccttccacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgaga tcgccccggcgccacctacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaag cgggtacaaggccgccttcaccgagtgtgtccaggccgcccagacaaggccgcctg cctgctgcccgaagctggacgagctgcgggacgaggggcaaggccagcagcgcca agcagcgggtgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagcgggccttcaag gcctggggcctggccccggctgagccagcgggttccccaaaggccgagttcgccga ggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacg gcgacctgtggagtgcgccgacgaccgggcccagacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgtgtcgagaagccct gctggagaagagccactgcctcgcgaggtggagaacgacgagatgcccgcg acctgcccagcctggccgcccacttctgtggagagcaaggacgtgtgcaagaac tacgccgaggccaaggacgtgttctgggcatgttctgtacgagtacgcccg gcggcacccccgactacagcgtggtgctgctgctgcgggtggccaagacctacg agaccacctggagaagtgtgcgcgcgcgcgacccccacgagtgctacgcc aaggtgttcgacgagttcaagccccctggtggaggagccccagaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccc tgctggtgcggtacaccaagaaggtgccccaggtgagcacccccacctggtg gaggtgagccggaacctgggcaaggtgggcagcaagtgtgtcaagcaccgccga ggccaagcggatgcctgcgcgaggactacctgagcgtggtgtgaaccagc tgtgcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgacccgggtgaccaagtgtgc accgagagcctggtgaaccggcgggccctgcttcagcgccctggaggtggacga gacctacgtgccaaggagttcaacgccgagaccttcaccttccacgccgaca tctgcacctgtagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgccctggtg gagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgat ggacgacttcgccgccttcgtggagaagtgtgtcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgccgaggagggaagaagctggtggccgcccagccaggccgcctg ggccctgggcagcggcgggcggcgagcggcgggcgggcgatctggtggaggtgg cagtggaggagggggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccg ggcgttgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgg gccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacatgtgcctcggcgc gtgcccagccagttccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcc tgcaccgcctgaagcccagacgggtgccagcgcctgtgtcgtgcccgcagc tacaatcccatggtgtctattcaaaagaccgacaccgggggtgtcgtccagac ctatgatgacttgttagccaaagactgccactgcata
84	Нуклеиновая кислота, кодирующая	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagatttgaggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcaggccccc ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt

	SEQ ID NO: 55	g t t g c t g a t g a g t c a g c t g a a a a t t g t g a c a a a t c a c t t c a t a c c c t t t t t g g a g a c a a a t t a t g c a c a g t t g c a a c t c t t c g t g a a a c c t a t g g t g a a a t g g c t g a c t g c t g t g c a a a c a a g a a c c t g a g a g a a t g a a t g c t t c t t g c a a c a c a a a g a t g a c a a c c c a a a c c t c c c c c g a t t g g t g a g a c c a g a g g t t g a t g t g a t g t g c a c t g c t t t t c a t g a c a a t g a a g a g a c a t t t t t g a a a a a t a c t t a t a t g a a a t t g c c a g a a g a c a t c c t t a c t t t t a t g c c c c g g a a c t c c t t t t c t t t g c t a a a a g g t a t a a a g c t g c t t t t a c a g a a t g t t g c c a a g c t g c t g a t a a a g c t g c c t g c c t g t t g c c a a g c t c g a t g a a c t t c g g g a t g a a g g g a a g g c t t c g t c t g c c a a a c a g a g a c t c a a g t g t g c c a g t c t c c a a a a t t t g g a g a a a g a g c t t t c a a a g c a t g g g c a g t a g c t c g c c t g a g c c a g a g a t t t c c c a a a g c t g a g t t t g c a g a a g t t t c c a a g t t a g t g a c a g a t c t t a c c a a a g t c c a c a c g g a a t g c t g c c a t g g a g a t c t g c t t g a a t g t g c t g a t g a c a g g g c g g a c c t t g c c a a g t a t a t c t g t g a a a a t c a a g a t t c g a t c t c c a g t a a a c t g a a g g a a t g c t g t g a a a a c c t c t g t t g g a a a a t c c c a c t g c a t t g c c g a a g t g g a a a t g a t g a g a t g c c t g c t g a c t t g c c t t c a t t a g c t g c t g a t t t t g t t g a a a g t a a g g a t g t t t g c a a a a c t a t g c t g a g g c a a a g g a t g t c t t c c t g g g c a t g t t t t t g t a t g a a t a t g c a a g a a g g c a t c c t g a t t a c t c t g t c g t g c t g c t g a g a c t t g c c a a g a c a t a t g a a c c a c t c t a g a g a a g t g c t g t g c c g c t g c a g a t c c t c a t g a a t g c t a t g c c a a a g t g t t c g a t g a a t t t a a c c t c t t g t g g a a g a g c c t c a g a a t t t a a t c a a a c a a a a t t g t g a g c t t t t t g a g c a g c t t g g a g a g t a c a a a t t c c a g a a t g c g c t a t t a g t t c g t t a c a c c a a g a a g t a c c c c a a g t g t c a a c t c c a a c t c t t g t a g a g g t c t c a g a a a c c t a g g a a a g t g g g c a g c a a a t g t t g t a a a c a t c c t g a a g c a a a a g a a t g c c c t g t g c a g a a g a c t a t c t a t c c g t g g t c c t g a a c c a g t t a t g t g t g t t g c a t g a g a a a c g c c a g t a a g t g a c a g a g t c a c c a a a t g c t g c a c a g a a t c c t t g g t g a a c a g g c g a c c a t g c t t t t c a g c t c t g g a a g t c g a t g a a a c a t a c g t t c c c a a g a g t t t a a t g c t g a a a c a t t c a c c t t c c a t g c a g a t a t a t g c a c a c t t t c t g a g a a g g a g a g a c a a a t c a g a a a c a a a c t g c a c t t g t t g a g c t c g t g a a a c a a g c c c a a g g c a a c a a a a g a g c a a c t g a a a g c t g t t a t g g a t g a t t t c g c a g c t t t t g t a g a a a g t g c t g c a a g g c t g a c g a t a a g g a g a c c t g c t t t g c c g a g g a g g g t a a a a a a c t t g t t g c t g c a a g t c a a g c t g c c t t a g g c t t a g g c a g c g g c g g c g g c g g c a g c g g c g g c g g a t c t g g t g g a g g t g g c a g t g g a g g a g g g g a t c c g g c g g c g g c g g c a g c g g c g g c g g a t c t g g t g g a g g t g g c a g t g g a g g a g g g g a t c c g c g c g c a a c g g g g a c c a c t g t c c g c t c g g g c c c g g g c g t t g c t g c c g t c t g c a c a c g g t c c g c g c t c g c t g g a a g a c c t g g g c t g g g c c g a t t g g g t g c t g t c g c c a c g g g a g g t g c a a g t g a c c a t g t g c a t c g g c g c g t g c c c g a g c c a g t t c c g g g c g g c a a a c a t g c a c g c g c a g a t c a a g a c g a g c c t g c a c c g c c t g a a g c c c g a c a c g g t g c c a g c g c c c t g c t g c g t g c c c g c c a g c t a c a a t c c c a t g g t g c t c a t t c a a a a g a c c g a c a c c g g g g t g t c g c t c c a g a c c t a t g a t g a c t t g t t a g c c a a a g a c t g c c a c t g c a t a
85	Нуклеиновая кислота, кодирующая	g a t g c a c a c a a g a g t g a g g t t g c t c a t c g g t t t a a g a t t t g g g a g a g a a a a t t t c a a a g c c t t g g t g t t g a t t g c c t t t g c t c a g t a t c t t c a g c a g g c c c c a t t t g a a g a t c a t g t a a a a t t a g t g a a t g a a g t a a c t g a a t t t g c a a a a c a t g t

	SEQ ID NO: 56	gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataccctttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttccttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttctttgctaaa aggtataaagctgcttttacagaatggttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgcc aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgaga agtttccaagttagtgaacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctct gttgaaaaatcccactgcattgcccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctg acttgcttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaggatgtcttctgggcatgtttttgtatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctcttggtggaagagcctcagaatttaatcaa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagaggtacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtcaactccaactcttgta gaggtctcaagaaacctaggaaaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggctcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgaacagagtcaccaaagtctgc acagaatccttggtgaacaggcgacctgcttttcagctctggaagtgcgatga aacatacgttcccaaagagtttaagtctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggt gagctcgtgaaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagctttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcccaggagggtaaaaaacttggtgctgcaagtcaagctgcctta ggcttagcacctgccccgctccagcaccgccccagccccctgctcccgacc agctcctgcaccagcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccgggcgtt gctgccgtctgcacacggtccgcgctgctggaagacctgggctgggcccgat tgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgctgccc gagccagttccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcacc gcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat cccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgtcgctccagacctatga tgacttggttagccaaagactgccactgcata
86	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 40	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagatttgaggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctcat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataccctttttgg

	(ОПТИМИЗАЦИЯ КОДОНОВ 1)	agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttccttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttctttgctaaa aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgcca aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagaaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgaga agtttccaagttagtacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaagggaatgctgtgaaaaacctct gttgaaaaatcccactgcattgccaagtggaagtgaatgatgagatgcctgctg acttgcttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgtttttgtatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctcttggtggaagagcctcagaatttaatcaa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagaggtacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtggtcaactccaactcttgta gaggtctcaagaaacctaggaagtggtgagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgccctgtgcagaagactatctatccgtggctcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtacagaggtcaccaaatgctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtogatga aacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggt gagctcgtgaaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcccaggagggtaaaaaacttggtgctgcaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcggcgggcggcagcggcgggcgggatctggtggaggtgg cagtggaggagggggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccg ggcgttgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacctgggctgg gccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgc gtgcccagaccagttccggggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcc tgaccgcctgaagcccagacgggtgccagcgcctgctgctgcccgcagc tacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgctgctccagac ctatgatgacttggttagccaaagactgccactgcata
87	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 40 (ОПТИМИЗАЦИЯ	gacgcccacaagagcgaggtggccacagattcaaggacctgggagagaaaa cttcaaggccctggtgctgatcgcttcgcccagtagctgcagcagagccct tcgaggaccacgtgaagctggtcaacgaagtgaccgagttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtggccaccctgcgggaaacctacggcgagatggccg

	КОДОНОВ 2)	actgctgcgccaagcaggaaccccgagcggaacgagtgcttccctgcagcacaaag gacgacaacccccaacctgccagactcgtgcgcccgaggtggacgtgatgtg caccgccttcacgacaacgaggaaaccttctgaagaagtacctgtacgaga tcgccagacggcaccctacttctacgcccccgagctgctgttcttcgccaag cgggtacaaggccgccttcaccgagtgctgccaggccgcccagataaggccgcctg cctgctgcccagctggacgagctgagagatgagggcaaggccagctccgcca agcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagttcgggcagcgggcctttaag gcttgggctgtggcccggtgagccagagattcccaaggccgagtttgccga ggtgtccaagctggtcaccgacctgaccaagggtgcacaccgagtggtgtcacg ggcacctgctggaatgcgccgacgacagagccgacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaagagtgctgcgagaagccct gctggaaaagagccactgtatcgccgaggtggaaaacgacgagatgcccgctg acctgccagcctggccgcccacttcgtggaaagcaaggacgtgtgcaagaac tacgccgagggccaaggatgtgttctgggcatgttctgtatgagtacgcccg cagacaccccgactacagcgtggtgctgctgctgctgctgctgctgctgctg agacaaccctggaaaagtgcgcccgcctgcccacccccacgagtgctacgcc aagggtgttcgacgagttcaagcctctggtggaagaaccccagaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccc tgctcgtgcggtacaccaagaaagtgtcccaggtgtccacccccaccctggtc gaagtgtcccggaacctgggcaaagtgggcagcaagtgcgcaagcacccctga ggccaagcggatgccctgcgccgaggactacctgtccgtggtgctgaaccagc tgtgctgctgctgcacgagaaaaacccccgtgtccgacagagtgaccaagtgcgt accgagagcctggtcaacagacggccctgcttcagcgccttggaagtggacga gacatacgtgcccaaagagttcaacgcgcgagacattcaccttcacgcgcgaca tctgcaccctgagcgagaaagagcggcagatcaagaagcagaccgcccctggtc gagctggtcaagcacaagcccaaggccaccaaaagaacagctgaaggccgtgat ggacgacttcgcccgccttcgtcgagaagtgttgcaaggccgacgacaaagaga catgcttcgccgaagaggggaagaaactggtggccgcctctcaggccgccttg ggactgggatctggcgccgaggaagcggaggcggaggatctgggggaggcg ctctggcgagggggatccgccagaaatggcgaccactgtcccctgggcccctg gccggtgttcgagactgcacacagtgccggccagcctggaagatctgggctgg gccgattgggtgctgagccccagagaagtgcaggtcacaatgtgcatcggcgc ctgccccagccagttcagagccgccaacatgcacgcccagatcaagaccagcc tgcaccggctgaagcccagacaccgtgcctgccccttggttgctgcccgcagc tacaaccccatggtgctgattcagaaaaccgacaccggcgctgtccctgcagac ctacgacgatctgctggccaaggactgccactgcatc
88	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 48	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaaagatttgaggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcaggccccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataccctttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa

		gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatttttgaaaaataacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttctttgctaaa aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaagggaaggcttcgtctgcca aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagaaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgcaga agtttccaagttagtgacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctct gttggaataatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctg acttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgttttgtatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctcttgtggaagagcctcagaatttaatcaa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagaggtacaaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtcaactccaactcttgta gaggtctcaaaaaacctaggaaggtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgcctgtgcagaagactatctatccgtggctcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgcagaggtcaccaaatgctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatga aacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaaatcaagaaacaaactgcacttggt gagctcgtgaaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgccgaggagggtaaaaaacttggtgctgcaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcggcgggcggcagcggcgggcgggcggtctggtggagggtgg cagtgaggaggaggggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccg ggcgttgctgccgtctgcacacggtccgcgcgtcgctggaagacctgggctgg gccgattgggtgctgtcgccacgggaggtgcaagtgacctgtgcatcggcgc gtgcccagaccagttccgggcggcaaacatgcacgcgcagatcaagacgagcc tgcaccgcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgcgtgcccgcagc tacaatcccatggtgctcattcaaaagaccgacacccgggtgtcgctccagac ctatgatgacttggttagccaaagactgccactgcata
89	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 59	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagatttgaggagaagaaaa tttcaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcacttcataccctttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg

		cactgcttttcatgacaatgaagagacatTTTTGAAAAatacttatatgaaa ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttctttgctaaa aggtataaagctgcttttacagaatgttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaaggggaaggcttcgtctgcca aacagagactcaagtgtgccagtctccaaaaatttgagaaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgccaga agtttccaagttagtgcagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctct gttggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctg acttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaac tatgctgaggcaaaggatgtcttcctgggcatgttttgtatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgcccgtgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctcttgtggaagagcctcagaatttaacaa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagagtacaaattccagaatgcgc tattagttcgttacaccaagaaagtacccaagtgtcaactccaactcttgta gaggtctcaaaaaacctaggaaaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgcctgtgcagaagactatctatccgtggctcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtgcagagtcaccaaagtctgc acagaatccttggtgaacaggcgaccatgcttttcagctctggaagtcgatga aacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggt gagctcgtgaaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagcttttgtagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcccaggagggtaaaaaacttggtgctgcaagtcaagctgcctta ggcttagcacctgccccgctccagcaccgccccagccccctgctcccgacc agctcctgcaccagcgcgcaacggggaccactgtccgctcgggcccggcggtt gctgccgtctgcacacggtccgcgctgctggaagacctgggctgggccgat tgggtgctgtgccacgggaggtgcaagtgaccatgtgcatcggcgctgccc gagccagttccgggcggaacatgcacgcgcagatcaagacgagcctgcacc gcctgaagcccgacacggtgccagcgccctgctgctgcccgcagctacaat cccatggtgctcattcaaaagaccgacacccgggtgtcgtccagacctatga tgacttggttagccaaagactgccactgcata
90	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 60 (оптимизация кодонов 1)	gatgcacacaagagtgaggttgctcatcggtttaagatttgggagaagaaaa tttaaagccttggtgttgattgcctttgctcagtatcttcagcagtcctccat ttgaagatcatgtaaaattagtgaatgaagtaactgaatttgcaaaaacatgt gttgctgatgagtcagctgaaaattgtgacaaatcattcataacctttttgg agacaaattatgcacagttgcaactcttcgtgaaacctatggtgaaatggctg actgctgtgcaaaacaagaacctgagagaaatgaatgcttcttgcaacacaaa gatgacaacccaaacctccccgattggtgagaccagaggttgatgtgatgtg cactgcttttcatgacaatgaagagacatTTTTGAAAAatacttatatgaaa

		ttgccagaagacatccttacttttatgccccggaactccttttcttttgctaaa aggtataaagctgcttttacagaatggttgccaagctgctgataaagctgcctg cctgttgccaaagctcgatgaacttcgggatgaaggggaaggcttcgtctgcc aacagagactcaagtgtgccagctctccaaaaatttgagaaagagctttcaaa gcatgggcagtagctcgctgagccagagatttcccaaagctgagtttgcaga agtttccaagttagtacagatcttaccaaagtccacacggaatgctgccatg gagatctgcttgaatgtgctgatgacagggcggaaccttgccaagtatatctgt gaaaatcaagattcgatctccagtaaaactgaaggaatgctgtgaaaaacctct gttggaaaaatcccactgcattgccgaagtggaaaatgatgagatgcctgctg acttgccttcattagctgctgattttgttgaaagtaaggatgtttgcaaaaac tatgctgaggcaaggatgtcttctgggcatgtttttgtatgaatatgcaag aaggcatcctgattactctgtcgtgctgctgctgagacttgccaagacatatg aaaccactctagagaagtgtgtgccgctgcagatcctcatgaatgctatgcc aaagtgttcgatgaatttaaacctcttgttggaagagcctcagaatttaataa acaaaattgtgagctttttgagcagcttgagagagtacaaattccagaatgctg tattagttcgttacaccaagaaagtaccccaagtgtcaactccaactcttgta gaggtctcaagaaacctaggaaaagtgggcagcaaatgttgtaaacatcctga agcaaaaagaatgcctgtgcagaagactatctatccgtggctcctgaaccagt tatgtgtgttgcatgagaaaacgccagtaagtacagagtcaccaaatgctgc acagaatccttgggtgaacaggcgacctgcttttcagctctggaagtcatga aacatacgttcccaaagagtttaatgctgaaacattcaccttccatgcagata tatgcacactttctgagaaggagagacaaatcaagaaacaaactgcacttggt gagctcgtgaaacacaagcccaaggcaacaaaagagcaactgaaagctgttat ggatgatttcgcagctttttagagaagtgtgcaaggctgacgataaggaga cctgctttgcccaggagggtaaaaaacttgttgctgcaagtcaagctgcctta ggcttaggcagcggcgggcggcagcggcgggcgggcgatctggtggagggtgg cagtggaggagggggatccggcggcggcggcagcggcgggcgggcgatctggtg gaggtggcagtgaggagggggatccgcgcgcaacggggaccactgtccgctc gggcccgggcggttctgctgccgtctgcacacgggtccgcgcgtcgtggaagacct gggctgggcccattgggtgctgtgcgcacgggaggtgcaagtgaacctgtgca tcggcgctgcccagaccagttccggcgggcaaacatgcacgcgcagatcaag acgagcctgcaccgcctgaagcccgacacgggtgccagcgccctgctgcgtgcc cgccagctacaatcccattggtgctcattcaaaagaccgacacgggggtgtcgc tccagacctatgatgacttggttagccaaagactgccactgcata
91	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 70	gacgcccacaagagcgaggtggccaccgggtcaaggacctgggcgaggagaa cttcaaggccctggtgctgatgccttcgccagtaacctgcagcagtcacct tcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgc gtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacacctgttcgg cgacaagctgtgcaccgtggccacctgcgggagacctacggcgagatggccg actgctgcgccaagcaggagcccgagcggaacgagtgttctctgcagcacaag gacgacaaccccaacctgccccggctggtgcggccccgaggtggacgtgatgtg caccgccttcacgacaacgaggagaccttctgaagaagtacctgtacgaga

		tcgccccggcgccacccctacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaag cggtagaaggccgccttcaccgagtgctgccaggccgcgacaaggccgcctg cctgctgcccagctggacgagctgcgggacgagggcaaggccagcagcgcca agcagcggctgaagtgcgccagcctgcagaagttcgggcagcgggccttcaag gcctgggcccgtggccccggctgagccagcgggttccccaaaggccgagttcgccga ggtgagcaagctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacg gcgacctgctggagtgcgccgacgaccggggccgacctggccaagtacatctgc gagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgtgagagaagccct gctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgcg acctgcccagcctggccgcccacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaac tacgccgaggccaaggacgtgttcttggcatgttctgtacgagtacgcccg gcggcaccgccactacagcgtggtgctgctgctgcggctggccaagacctacg agaccacctggagaagtgtgcgccgcccgcgacccccacgagtgctacgcc aaggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggagccccagaacctgatcaa gcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccc tgctggtgcggtacaccaagaaggtgccccaggtgagcaccgccacctggtg gaggtgagccggaacctgggcaaggtgggcagcaagtgtgcaagcaccgccga ggccaagcggatgccctgcgccgaggactacctgagcgtggtgctgaaccagc tgtgcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgaccgggtgaccaagtgtgc accgagagcctggtgaaccggcgccctgcttcagcgccctggaggtggacga gacctacgtgcccgaaggagttcaacgccgagaccttcaccttccacgccgaca tctgcacctgagcgagaaggagcggcagatcaagaagcagaccgccctggtg gagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgat ggacgacttcgccccttcgtggagaagtgtgcaaggccgacgacaaggaga cctgcttcgccgaggaggggaagaagctggtggccgcccagccaggccgcctg ggcctgggcagcggcgggcgccgagcggcgggcgggcggtctggtggaggtgg cagtgaggaggggggatccgctcgcaacggtgacctgcccctctgggtcctg gtcgctgctgccgcctgcacaccgttcgcgcttctctggaagacctgggttg gctgactgggttctgtctcctcggaagttcaggttaccatgtgcatcggtgc ttgcccttctcagttccgcgctgctaactgcacgcttgatcaaaacctctc tgcaccgctgaaacctgacaccgttctgctccttgcgttctctgcttct tacaacctatggttctgatccagaaaaccgacaccggtgtttctctgcagac ctacgacgacctgctggctaagactgccactgcatc
92	HSA (C34S) - GS- (GGGS) 8 -GDF15 (делеция 4)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVREVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTkvHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLNLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC

		TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
93	HSA (C34S) – GS- (GGGS) 8- GDF15 (делеция 5)	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHCPLGPGR CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
94	бх-гистидиновая метка- HSA (C34S) – GS- (GGGS) 8- Сайт HRV3C белка GDF15	EFHHHHHDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNE VTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPER NECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYA PELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQ KFGERAFAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAA ADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVP QVSTPTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPV SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQ IKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHCPLGPGR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
95	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 92 (оптимизация кодонов 1)	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTTTTCTTTGCTAAA

		AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTGCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGGAAGCGGCGGAGGGGGGAGTGGCGGCGGTGGCTCCGGGGGGGGCGG ATCCGGCGGAGGGGGGAGCGGGGGTGGAGGGAGTGGCGGGGGAGGATCAGGGG GAGGAGGATCAGGAGGGGGCGGAAGTGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGG TGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGATGGGCCGA CTGGGTGCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCCTGCC CCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAAACAGCCTGCAC CGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAA TCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATG ATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
96	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 7	GGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGG TGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAAAC ATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCC AGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGA CCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGC CACTGCATA
97	Нуклеиновая кислота,	GACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGC GTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGC

	кодирующая SEQ ID NO: 8 (оптимизация кодонов 1)	AAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATG CACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGC GCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCG ACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCAC TGCATA
98	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 8 (оптимизация кодонов 2)	GATCATTGCCCTCTCGGGCCCGACGGTGTTGCCGCCTCCACACTGTGAGGGC TTCACCTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTAC AAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATG CACGCCCAGATAAAAACCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGC GCCCTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCG ACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCAC TGCATA
99	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 8 (оптимизация кодонов 3)	GATCATTGTCCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGC TTCACCTGGAGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGC AAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCCTTCGCAATTCCGGGCGCGAATATG CACGCCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGC TCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCG ATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCAT TGCATC
100	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 9 (оптимизация кодонов 1)	CACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTC GCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAG TGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCAC GCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCC CTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACA CCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGC ATA
101	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 9 (оптимизация кодонов 2)	CATTGCCCTCTCGGGCCCGACGGTGTTGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTC ACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAG TCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCAC GCCCAGATAAAAACCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCC CTGCTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTTCAAAGACCGACA CCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGC ATA
102	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 9 (оптимизация кодонов 3)	CATTGTCCCCTTGGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTC ACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAG TGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCCTTCGCAATTCCGGGCGCGAATATGCAC GCCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCC ATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATA CCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGC ATC
103	Нуклеиновая кислота,	TGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCT GGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCGCCACGGGAGGTGCAAGTGA

	кодирующая SEQ ID NO: 10 (оптимизация кодонов 1)	CCATGTGCATCGGCGCGTGCCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCG CAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTG CTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCG GGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
104	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 10 (оптимизация кодонов 2)	TGCCCTCTCGGGCCCGACGGTGTTGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACT TGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCA CAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCC CAGATAAAAACCAGCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTG CTGCGTGCCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCG GGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
105	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 10 (оптимизация кодонов 3)	TGTCCCCTTGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACT GGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGA CCATGTGCATCGGCGCCTGTCTTCGCAATTCCGGGCGCGCAATATGCACGCC CAGATCAAGACCTCCCTGCATCGCCTCAAGCCCGACACTGTGCGCTGCTCCATG CTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCG GCGTCAGCCTGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
106	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 11 (оптимизация кодонов 1)	TGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTG GGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCGTGCCCGA GCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGC CTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATG ACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
107	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 11 (оптимизация кодонов 2)	TGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTG GGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCA GCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCAGATAAAAACCAGCCTGCACCGC CTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATG ACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
108	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 11 (оптимизация кодонов 3)	TGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGACTG GGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTCTTT CGCAATTCCGGGCGCGAATATGCACGCCCAGATCAAGACCTCCCTGCATCGC CTCAAGCCCGACACTGTGCGCTGCTCCATGCTGTGTGCCGGCCTCCTATAACCC CATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATGATG ATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
109	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 60 (оптимизация кодонов 2)	GATGCGCACAAGTCGGAAGTGGCCCATCGCTTTAAGGACCTGGGAGAAGAGAA CTTCAAGGCCCTGGTCCTGATCGCGTTTCGCCAGTACCTCCAGCAGTCCCCGT TTGAGGACCACGTCAAGCTTGTGAACGAAGTGACCGAGTTCGCAAAGACTTGT GTGGCCGATGAGTCCGCCGAAAACCTGCGACAAGTCCCTGCACACCTTGTTCCGG AGACAAGCTGTGCACCGTCGCGACTTTGCGGGAGACTTACGGCGAAATGGCGG ACTGCTGCGCAAAGCAGGAGCCCGAAAGGAACGAGTGCTTCTTGCAACACAAG GACGACAACCCGAACCTTCCGAGACTCGTGCGGCCTGAGGTGACGTGATGTG CACTGCATTCCATGATAACGAAGAAACATTCTGAAGAAGTACCTGTATGAAA

		TTGCCAGACGCCACCCGTA CTCTACGCCCCGAACTGCTGTTCTTCGCCAAG AGATACAAGGCCGCCTTTACCGAATGTTGTCAAGCCGCCGATAAGGCAGCGTG CCTGCTGCCGAAGTTGGACGAGCTCAGGGACGAAGGAAAGGCCTCGTCCGCCA AGCAGAGGCTGAAGTGC GCGTCGCTCCAGAAGTTTGGAGAGCGGGCTTTTAAG GCCTGGGCAGTGGCTAGGTTGAGCCAGAGGTTCCCCAAGGCGGAGTTTGCCGA AGTGTCCAAGCTCGTGACTGACCTGACTAAAGTCCATACCGAATGCTGCCACG GCGATCTGCTCGAATGCGCAGATGACCGGGCGGATTTGGCCAAGTACATTTGC GAAAACCAAGACTCCATAAGCTCCAAGCTGAAGGAGTGCTGTGAAAAGCCTCT GCTCGAGAAGTCCCCTGTATCGCCGAGGTGGAGAACGACGAAATGCCGGCAG ACCTCCCTAGCCTGGCAGCCGACTTCGTGCAATCCAAGGACGTGTGCAAGAAC TACGCCGAAGCGAAGGACGTGTTCTGCGGAATGTTCTGTACGAGTACGCCAG ACGGCATCCAGACTACTCCGTGGTGCTTCTCTTGCGGCTGGCCAAGACTTATG AAACGACCCTGGAGAAATGTTGCGCTGCTGCTGACCCACACGAGTGCTACGCC AAAGTGTTGACGAGTTTAAGCCTCTCGTGGAGGAACCCGAGAACCTCATCAA GCAGAACTGCGAACTTTTCGAGCAGCTCGGGGAGTACAAGTTCCAAAACGCGC TGCTTGTCGCTACACCAAGAAAGTGCCGCAAGTGTCACACCGACCCCTCGTG GAAGTGTCAGGAACCTGGGCAAAGTCGGAAGCAAATGTTGCAAGCACCCCGA AGCCAAGCGCATGCCGTGCGCAGAGGACTACCTTTCCGTGGTGTTGAACCAGC TCTGCGTCCTGCACGAAAAGACCCCGGTGTCAGACCGCGTGACCAAGTGCTGT ACCGAAAGCCTCGTGAATCGGCGCCCCTGCTTCTCGGCCCTGGAGGTGGACGA AACTTACGTGCCGAAAGAGTTCAACGCGGAAACCTTCACCTTTCATGCCGATA TCTGCACCCTGTCCGAGAAGGAGCGGCAGATCAAGAAGCAGACCGCCCTGGTG GAGCTTGTTGAAACACAAGCCGAAGGCCACTAAGGAACAGCTGAAGGCCGTCAT GGACGATTTGCTGCCTTCGTGAGAAGTGCTGCAAGGCCGACGACAAGGAGA CTTGCTTCGCTGAAGAAGGGAAGAAGCTTGTTGGCCGCTAGCCAGGCTGCACTG GGACTGGGTAGCGGTGGAGGGGGATCAGGGGGTGGTGGATCGGGAGGAGGAGG ATCAGGAGGTGGCGGCTCAGGAGGAGGCGGATCAGGCGGTGGAGGATCCGGAG GCGGAGGATCGGCTGGAGGAGGCTCAGCGAGGAACGGGGATCATTGTCCCCTT GGACCGGGTAGATGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCT CGGCTGGGCTGACTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCA TCGGCGCCTGTCCTTCGCAATTCCGGGCCGCAATATGCACGCCCAGATCAAG ACCTCCCTGCATCGCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATGCTGTGTGCC GGCCTCCTATAACCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATAACCGGCGTCAGCC TGCAGACGTATGATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
110	Нуклеиновая кислота, кодирующая SEQ ID NO: 92 (оптимизация кодонов 2)	GATGCGCACAAGTCGGAAGTGGCCCATCGCTTTAAGGACCTGGGAGAAGAGAA CTTCAAGGCCCTGGTCCTGATCGCGTTTCGCCCAGTACCTCCAGCAGTCCCCGT TTGAGGACCACGTCAAGCTTGTGAACGAAGTGACCGAGTTCGCAAAGACTTGT GTGGCCGATGAGTCCGCCGAAAACCTGCGACAAGTCCCTGCACACCTTGTTCCG AGACAAGCTGTGCACCGTCGCGACTTTGCGGGAGACTTACGGCGAAATGGCGG ACTGCTGCGCAAAGCAGGAGCCCGAAAGGAACGAGTGCTTCTGCAACACAAG GACGACAACCCGAACCTTCCGAGACTCGTGCGGCCTGAGGTGACGTGATGTG CACTGCATTCCATGATAACGAAGAAACATTCTGAAGAAGTACCTGTATGAAA

		TTGCCAGACGCCACCCGTA CTTCTACGCCCCGAACTGCTGTTCTTCGCCAAG AGATACAAGGCCGCCTTTACCGAATGTTGTCAAGCCGCCGATAAGGCAGCGTG CCTGCTGCCGAAGTTGGACGAGCTCAGGGACGAAGGAAAGGCCTCGTCCGCCA AGCAGAGGCTGAAGTGC GCGTCGCTCCAGAAGTTTGGAGAGCGGGCTTTTAAG GCCTGGGCAGTGGCTAGGTTGAGCCAGAGGTTCCCCAAGGCGGAGTTTGCCGA AGTGTCCAAGCTCGTGACTGACCTGACTAAAGTCCATACCGAATGCTGCCACG GCGATCTGCTCGAATGCGCAGATGACCGGGCGGATTTGGCCAAGTACATTTGC GAAAACCAAGACTCCATAAGCTCCAAGCTGAAGGAGTGCTGTGAAAAGCCTCT GCTCGAGAAGTCCCCTGTATCGCCGAGGTGGAGAACGACGAAATGCCGGCAG ACCTCCCTAGCCTGGCAGCCGACTTCGTGCAATCCAAGGACGTGTGCAAGAAC TACGCCGAAGCGAAGGACGTGTTCTGGAATGTTCTGTACGAGTACGCCAG ACGGCATCCAGACTACTCCGTGGTGCTTCTCTTGCGGCTGGCCAAGACTTATG AAACGACCCTGGAGAAATGTTGCGCTGCTGCTGACCCACACGAGTGCTACGCC AAAGTGTTGACGAGTTTAAGCCTCTCGTGGAGGAACCCCAAGACCTCATCAA GCAGAACTGCGAACTTTTCGAGCAGCTCGGGGAGTACAAGTTCCAAAACGCGC TGCTTGTCGCTACACCAAGAAAGTGCCGCAAGTGTCACACCGACCCCTCGTG GAAGTGTCAGGAACCTGGGCAAAGTCGGAAGCAAATGTTGCAAGCACCCCGA AGCCAAGCGCATGCCGTGCGCAGAGGACTACCTTTCCGTGGTGTTGAACCAGC TCTGCGTCCTGCACGAAAAGACCCCGGTGTCAGACCGCGTGACCAAGTGCTGT ACCGAAAGCCTCGTGAATCGGCGCCCCTGCTTCTCGGCCCTGGAGGTGGACGA AACTTACGTGCCGAAAGAGTTCAACGCGGAAACCTTCACCTTTCATGCCGATA TCTGCACCCTGTCCGAGAAGGAGCGGCAGATCAAGAAGCAGACCGCCCTGGTG GAGCTTGTAACACAAGCCGAAGGCCACTAAGGAACAGCTGAAGGCCGTCAT GGACGATTTGCTGCCTTCGTGAGAAGTGCTGCAAGGCCGACGACAAGGAGA CTTGCTTCGCTGAAGAAGGGAAGAAGCTTGTTGGCCGCTAGCCAGGCTGCACTG GGACTGGGTAGCGGTGGAGGGGGATCAGGGGGTGGTGGATCGGGAGGAGGAGG ATCAGGAGGTGGCGGCTCAGGAGGAGGCGGATCAGGCGGTGGAGGATCCGGAG GCGGAGGATCGGCTGGAGGAGGCTCAGATCATTGTCCCCTTGACCGGGGTAGA TGCTGTGCGCTGCACACTGTGCGGGCTTCACTGGAGGACCTCGGCTGGGCTGA CTGGGTGCTGTCCCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGCGCCTGTC CTTCGCAATTCGGGGCCGCAATATGCACGCCAGATCAAGACCTCCCTGCAT CGCCTCAAGCCCGACACTGTGCCTGCTCCATGCTGTGTGCGGCCTCCTATAA CCCCATGGTGCTGATCCAGAAAACCGATAACCGGCGTCAGCCTGCAGACGTATG ATGATCTGCTGGCCAAGGACTGCCATTGCATC
111	HSA (C34S)-GS- (GGGS) ₈ - (делеция 5) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLV

		EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSHCPLGPGRC CRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR LKPDTVPAAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI
112	HSA (C34S)-GS- (GGGGS) ₈ - (делеция 14) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCRLHTVRAS LEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAAP CCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI
113	(Делеция 2) HSA (C34S)-GS- (GGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	HKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDD NPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAW AVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICEN QDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKV FDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVEL VKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCC RLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRL KPDTVPAAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDILLAKDCHCI
114	ДНК для SEQ ID NO: 113 (делеция 2) HSA (C34S)-GS- (GGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	CACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAA AGCCTTGTTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCATTTGAAG ATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAA ATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCT GTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGAC AACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGC TTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCA

		GAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTTGCTAAAAGGTAT AAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTT GCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGA GACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGG GCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTC CAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATC TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAAAT CAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGA AAAATCCCCTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGC CTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACCTATGCT GAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCA TCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGAAACCA CTCTAGAGAAGTGTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTG TTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAA TTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGCTATTAG TTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTAGAGGTC TCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAA AAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAGTTATGTG TGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAA TCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATA CGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATATATGCA CACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTTGAGCTC GTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGA TTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCT TTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGCTTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAGGGCTT GGAAGCGGCGGAGGGGGGAGTGGCGGCGGTGGCTCCGGGGGGGGCGGATCCGG CGGAGGGGGCAGCGGGGTGGAGGGAGTGGCGGGGGAGGATCAGGGGGAGGAG GATCAGGAGGGGGCGGAAGTGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGACGGTGTTGC CGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGT GCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCC AGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCAGATAAAAACCAGCCTGCACCGCCTG AAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCAT GGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACT TGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
115	HSA (C34S)-GA- (GGGGA) ₈ - (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVPRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERA FK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQLG EYK FQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV

		EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGAGGGGADHCPLGPGR CCLRHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI
116	ДНК для SEQ ID NO: 115 HSA (C34S)-GA- (GGGGA) ₈ - (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAGCTCGATGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGA AAAATCCCCTGCAATTGCCGAAGTGGA AAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAATTTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTACCAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTGCGAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAATTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGGTGCTGGAGGAGGCGGGCGGGCGGGGGTGGCGGTGGGGGTGG CGCAGGGGGAGGTGGTGCGGGTGGTGGTGGGGCTGGTGGGGGAGGTGCAGGCG GTGGCGGTGCCGGGGGGGGTGGCGCGGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGG

		TGTTGCCGCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCGCA CTGGGTGCTGTCCCCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCCTGCC CCAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCCAGATAAAAACCAGCCTGCAC CGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAA TCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATG ATGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
117	HSA (C34S) – (AP) ₁₀ – (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPR LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGEYKFQNAL LVRYTKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLAPAPAPAPAPAPAPAPAPADH CPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS PREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVL IQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
118	ДНК для SEQ ID NO: 117 HSA (C34S) – (AP) ₁₀ – (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAGCTCGATGAACCTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATT CGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAGATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTT CGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA

		ACAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAATTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGCACCAGCCCCTGCCCCTGCACCTGCACCTGCTCCCGCACCGGCTCC AGCCCCAGCTCCGGATCATTGCCCTCTCGGGCCCGGACGGTGTTGCCGCTCC AACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGACTGGGTGCTGTCC CCAAGAGAGGTACAAGTCACAATGTGTATTGGCGCCTGCCCCAGCCAGTTTCG CGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAACCAGCCTGCACCGCTGAAGCCCG ACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTC ATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGC CAAAGACTGCCACTGCATA
119	HSA (C34S) – (AP) ₁₂ – (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELFELGEYKFQ NALLVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVL NQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD DKETCF AE EGKKLVAASQAAL GLAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPAPADH CPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWAD WVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIK TSLHRLKPDTPAPCCVPASYN PMVLIQKTD TGVS LQTYDDLLAKDCHCI
120	ДНК для SEQ ID NO: 119 HSA (C34S) – (AP) ₁₂ – (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTTTTTCTTTGCTAAA

		AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGC ACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATA TATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTT GAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTAT GGATGATTTGCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGTGCAAGGCTGACGATAAGGAGA CCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAAGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA GGGCTTGCAACAGCCCCTGCCCCTGCACCTGCACCTGCTCCCGCACCGGCTCC AGCCCCAGCTCCGGCTCCAGCTCCTGATCATTGCCCTCTCGGGCCCCGACGGT GTTGCCGCCTCCACACTGTGAGGGCTTCACTTGAAGACCTTGGATGGGCCGAC TGGGTGCTGTCCCAAGAGAGGTACAAGTACAATGTGTATTGGCGCCTGCCC CAGCCAGTTTCGCGCCGCTAACATGCACGCCAGATAAAAACAGCCTGCACC GCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAAT CCCATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTGCTCCAGACCTATGA TGACTTGTTAGCCAAAGACTGCCACTGCATA
121	HSA (C34S)- GGS- (EKSSSGSGSESKST) ₃ -GGS- (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHK DDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV

		ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAASQAAL GLGGSE GKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSDHC PLGPGRCCRLHTV RASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ IKTSLHRLKPDTV P APCCPV P ASYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI
122	ДНК для SEQ ID NO: 121 HSA (C34S) - GGS- (EGKSSGSGSESKST) 3-GGS- (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCCTGCAATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACAAAATGCTGT ACTGAGAGCTTGGTCAACAGGCGGCCGCTGCTTCAGCGCCCTCGAGGTGGATGA GACTTATGTCCCAAAGGAGTTTAATGCGGAAACTTTTACTTTCCACGCAGACA TTTGACCTTGTCTGAAAAGGAAAGACAGATTAAGAAACAGACTGCTCTTGTG GAACTGGTAAAACATAAACCAAAAGCTACGAAGGAGCAGCTTAAGGCTGTTAT GGATGATTTGCGCGCGTTTGTGCGAGAAGTGCTGCAAAGCGGACGATAAGGAAA CTTGCTTTGCAGAGGAAGGTAAGAACTCGTAGCGGCAAGTCAGGCTGCGCTT GGCCTTGGAGGCAGTGAAGGCAAATCCTCTGGGAGTGGCTCTGAAAGTAAATC CACCGAGGGCAAATCCAGTGGATCTGGGTCTGAATCTAAGTCTACCGAGGGGA AGTCTTCTGGCAGTGGGTGAGAATCTAAATCTACAGGCGGCTCTGACCATTGC CCGTTGGGACCAGGACGCTGCTGTGCGCTTCATACAGTGCGAGCGAGTTTGGA AGACCTGGGCTGGGCTGACTGGGTGCTTAGCCCTCGGGAGGTCCAGGTCACAA

		TGTGCATTGGCGCGTGTCCCAGTCAATTTAGAGCAGCAAATATGCACGCCCCAA ATAAAAACCTCCCTGCATAGGCTTAAGCCAGATACTGTCCCCGACCATGCTG TGTGCCTGCTTCTTACAATCCTATGGTACTCATCCAGAAGACCGACACGGGAG TTAGCCTCCAGACTTATGACGACCTCTTGGCTAAAGATTGCCATTGTATT
123	HSA (C34S)-GS- (PGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFK AWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFELGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSPGGGSDHCP L GPR CCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLH RLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTD TGVSLQTYDDLLAKDCHCI
124	ДНК для SEQ ID NO: 123 HSA (C34S)-GS- (PGGGS) ₈ - (делеция 4) GDF15	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAGTATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGAGAGGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTA

		CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAAAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTGA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCAGT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACTAAATGTTGT ACCGAGTCTCTTGTTAATAGGCGGCCATGCTTCAGTGCATTGGAAGTCGACGA AACCTATGTACCAAAGGAGTTCAACGCAGAAACATTTACATTCCATGCTGATA TCTGCACATTGAGCGAGAAAGAGAGACAGATTAAGAAACAGACAGCGCTTGTT GAACTGGTTAAACACAAACCAAAAGCTACCAAGGAGCAGCTTAAGGCAGTAAT GGATGACTTCGCGGCCTTTGTGAGAAATGTTGTAAAGCGGATGATAAAGAGA CATGCTTCGCCGAAGAGGGCAAAAACCTTGTAGCGGCAAGCCAGGCCGCACTG GGTCTCGGTAGTGCGGGCGGTGGTTCAGCGGGGGGAGGATCTGCAGGTGGTGG CTCAGCGGGTGGCGGTAGCGCTGGGGGGGGCTCCGCAGGTGGGGGATCAGCAG GCGGCGGATCAGCCGGCGGTGGATCCGACCACTGTCCTCTCGGGCCTGGTCTGG TGTTGCCGCTCCATACTGTGCGCGCTCTCTTGAGGATCTGGGGTGGGCTGA TTGGGTTCTCTCTCCCGCGAAGTGCAGGTGACCATGTGTATTGGTGCTTGCC CAAGTCAATTCGAGCAGCTAACATGCACGCCAGATCAAGACTAGCCTGCAT CGGCTTAAGCCCGACACTGTTCTGCCCCTTGCTGTGTTCTGCTATCTTATAA TCCAATGGTCCTGATCCAGAAAACCGATACGGGTGTATCATTGCAAACATACG ACGACTTGCTTGCCAAAGATTGCCATTGCATT
127	HSA (C34S)- GGS- (EKGSSGSGSESKST)₂ -GGS- (делеция 4) GDF15	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTC VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK DDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAK RYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFFK AWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKN YAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYA KVFEDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLV EVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLVHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALV

		ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GLGGSEKSSSGSGSESKSTEGKSSSGSGSESKSTGGSDHCPLGPGRCRLHTVR ASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPV APCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLAKDCHCI
128	ДНК для SEQ ID NO: 127	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAA TTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTCCCCAT TTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGT GTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGG AGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTG ACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAA GATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTG CACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAA TTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAACCTTTTCTTTGCTAAA AGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTG CCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCA AACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAA GCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGA AGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATG GAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGT GAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCT GTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATGATGAGATGCCTGCTG ACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTGGGCATGTTTTTGTATGAATATGCAAG AAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATG AAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC AAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTCAGAATTTAATCAA ACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTCAGAATGCGC TATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTTGTA GAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGA AGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGTCTGAACCACT TATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACGAAATGCTGT ACAGAATCCCTCGTGAATAGAAGGCCCTGCTTCTCTGCCCTTGAGGTGGACGA GACTTACGTCCCTAAGGAGTTTAACGCCGAGACCTTTACTTTTCATGCTGATA TTTGCACCCTTTCCGAAAAGGAGCGGCAGATCAAGAAACAAACAGCCTTGGTG GAACTCGTAAACATAAACCCAAAGCCACCAAGGAACAACCTTAAAGCTGTTAT GGATGACTTCGCAGCCTTCGTGAGAAATGTTGCAAGGCGGATGATAAGGAAA CGTGTTTTGCTGAGGAAGGGAAGAAGTTGGTTGCTGCCTCTCAAGCGGCTCTG GGGCTTGGCGGATCAGAGGGGAAGTCCTCCGGGTCCGGTAGCGAGTCCAAATC TACGGAAGGGAAGTCATCCGGTTCTGGGTGAGAGTCCAAATCCACAGGAGGAT CAGACCATTGCCATTGGGACCAGGACGATGTTGTGCCTGCATACGGTAAGA GCGTCTCTGGAGGATCTCGGCTGGGCCGATTGGGTTCTCTCACCACGAGAAGT ACAGGTCACAATGTGCATAGGAGCTTGTCCGAGCCAATTCCGGGCGGCTAATA

		TGCACGCACAGATCAAGACCTCTTTGCACCGCTTGAAGCCCGATAACCGTGCCA GCACCGTGTTGCGTCCCAGCATCTTACAACCCTATGGTTTTGATACAGAAAAC TGACACAGGTGTGAGCCTCCAGACATATGATGATTTGCTGGCTAAGGATTGCC ACTGTATA
--	--	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный белок, содержащий:

а. белок, продлевающий период полужизни,

б. линкер, и

с. белок GDF15;

причем гибридный белок составлен от N-конца до С-конца в порядке (а)-(б)-(с).

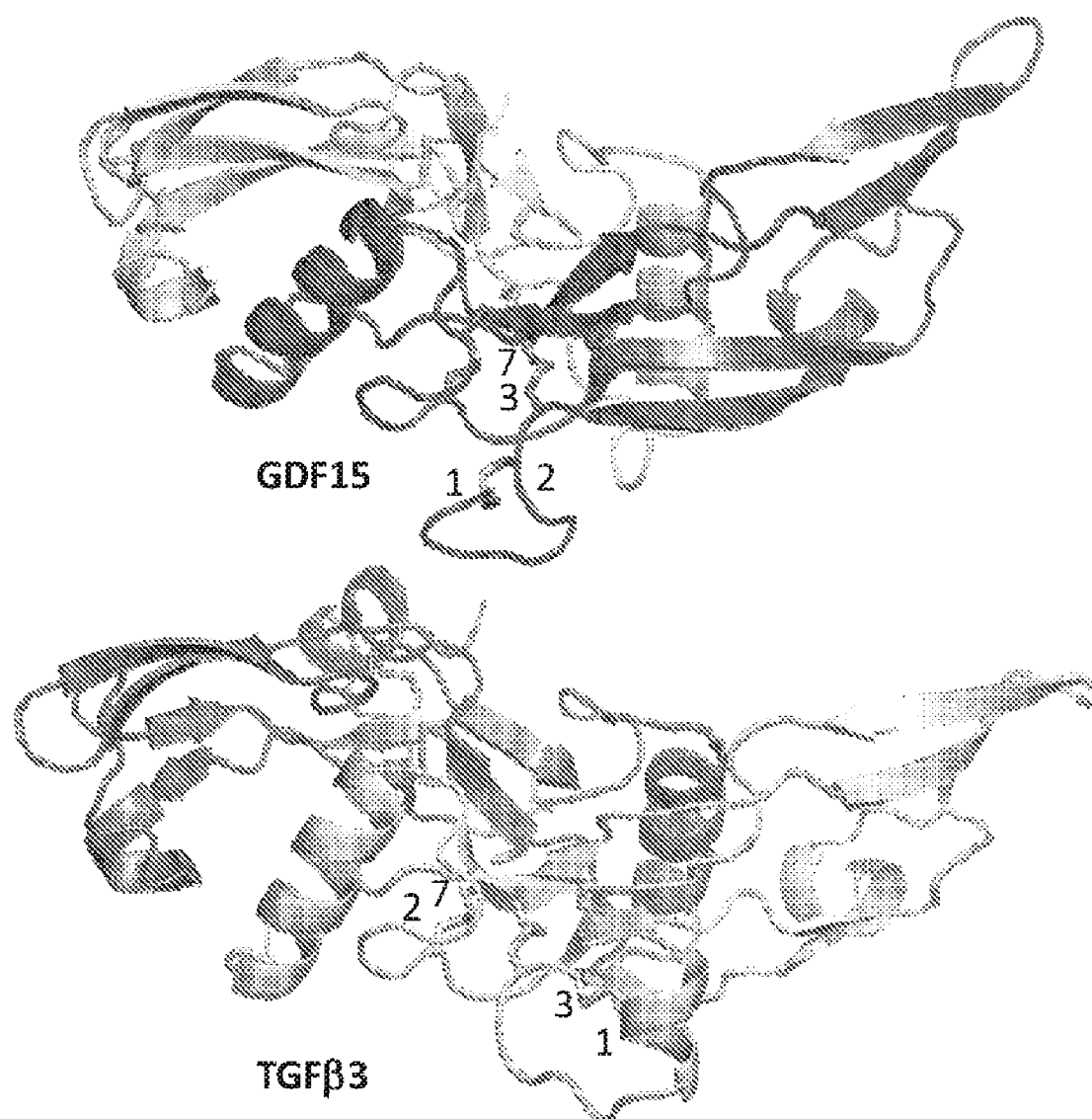
2. Гибридный белок по п. 1, в котором белок GDF15 представляет собой зрелый белок GDF15 или его функциональный вариант.

3. Гибридный белок по п. 1, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11.

4. Гибридный белок по п. 3, в котором белок GDF15 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 и 11.

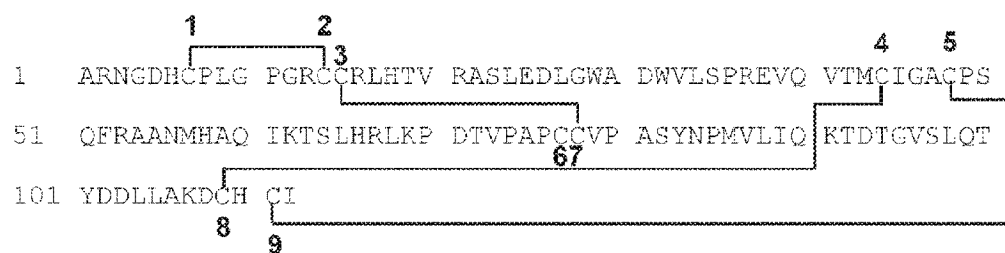
5. Гибридный белок по п. 1, в котором белок, продлевающий период полужизни, представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA) или его функциональный вариант.

Фиг. 1А

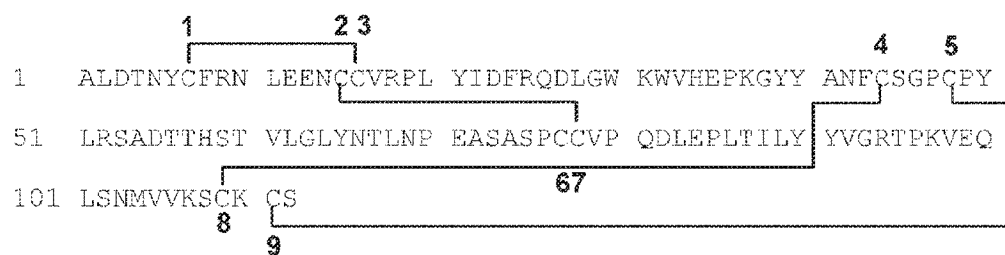


Фиг. 1В

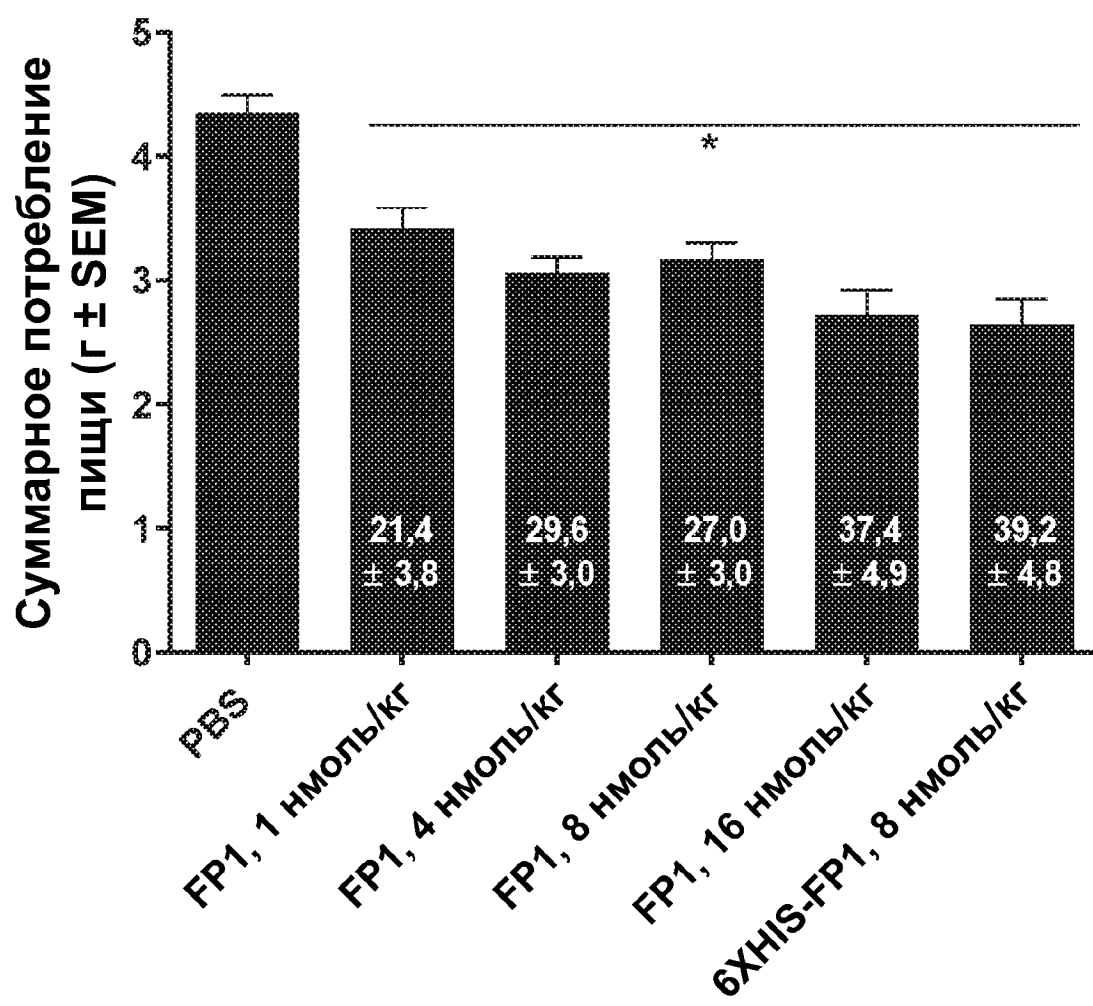
GDF15



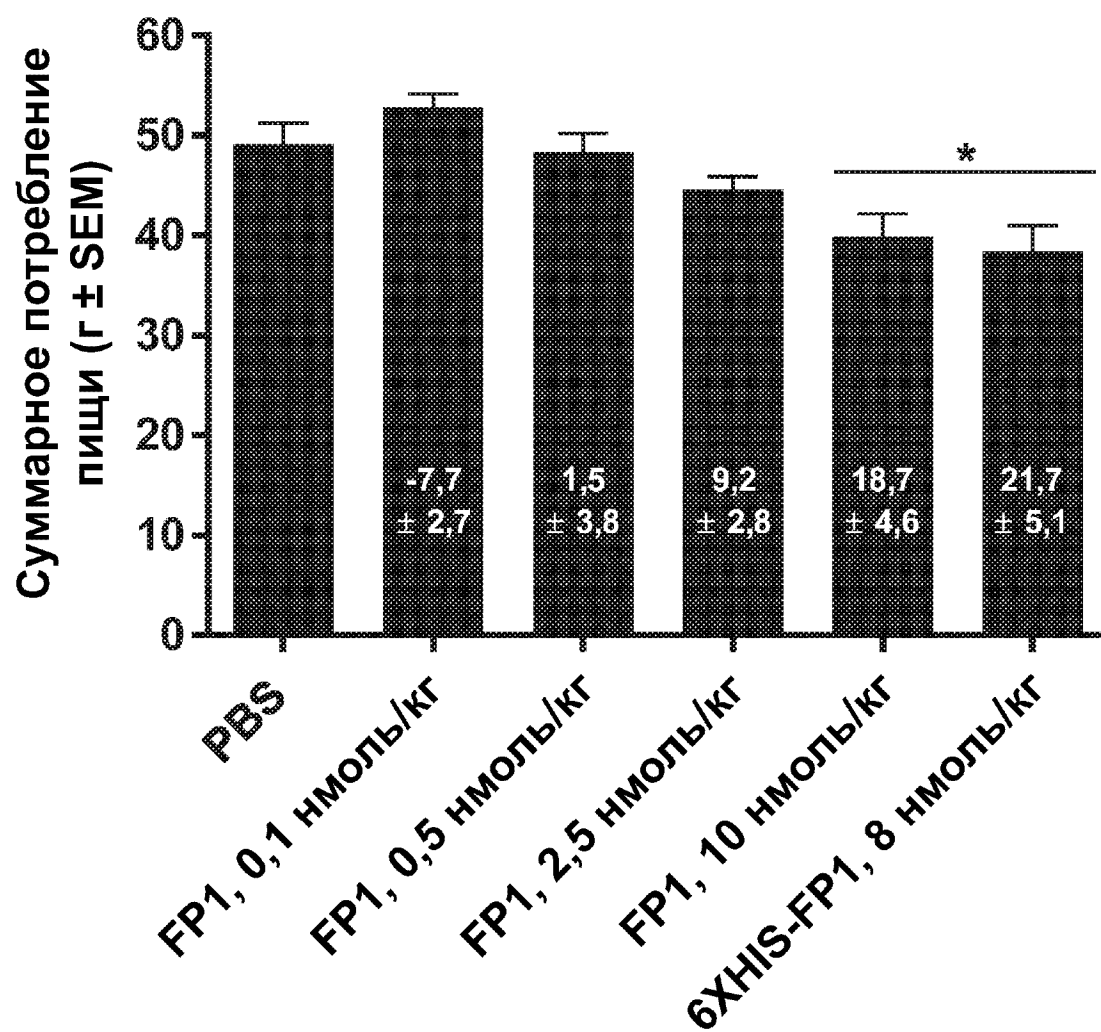
TGFB3



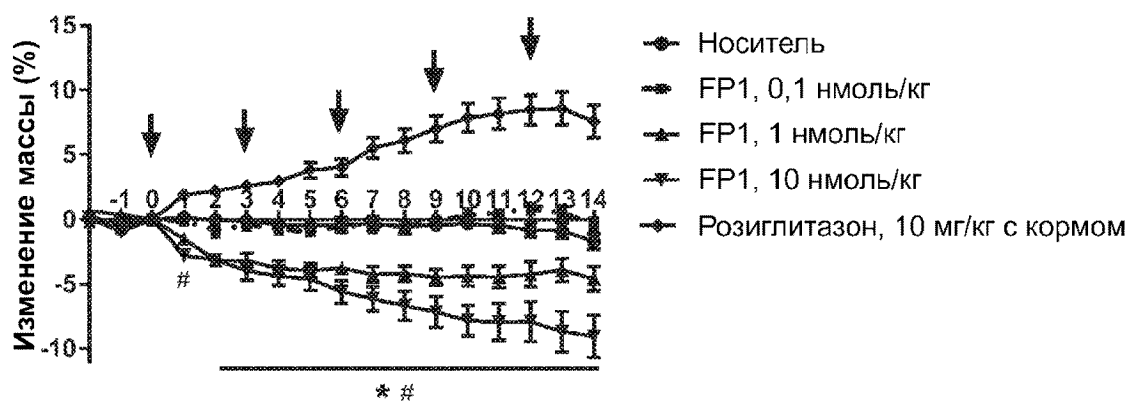
Фиг. 2



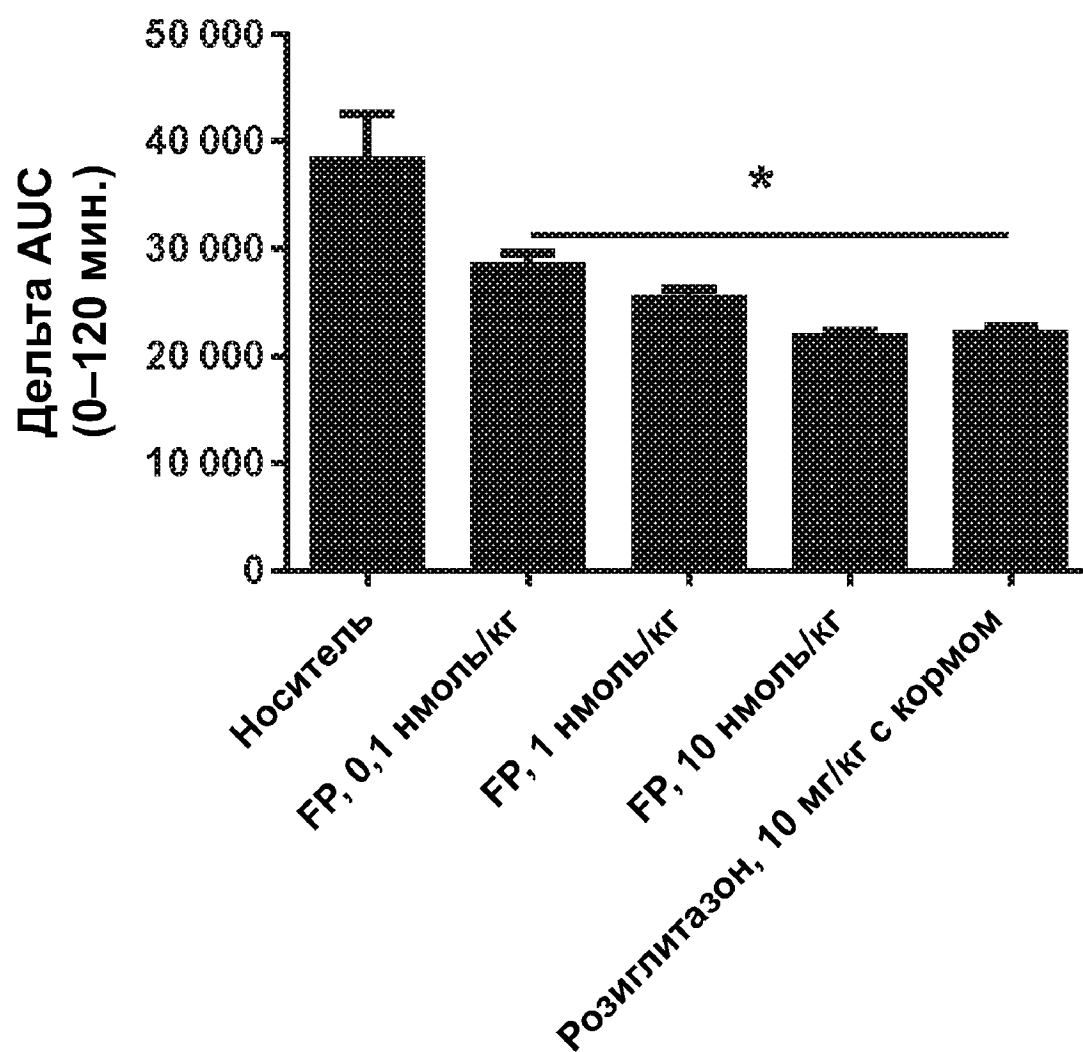
Фиг. 3



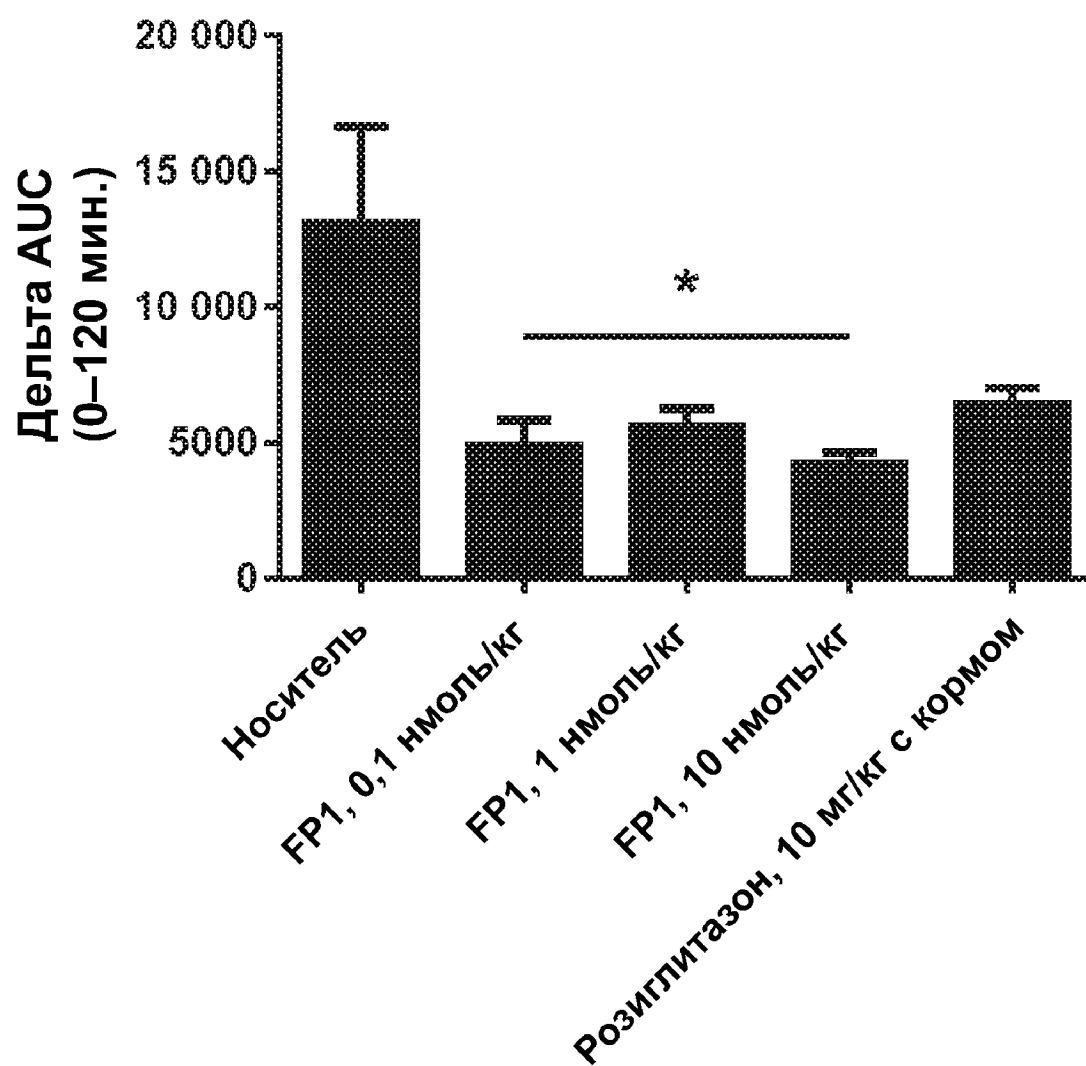
Фиг. 4



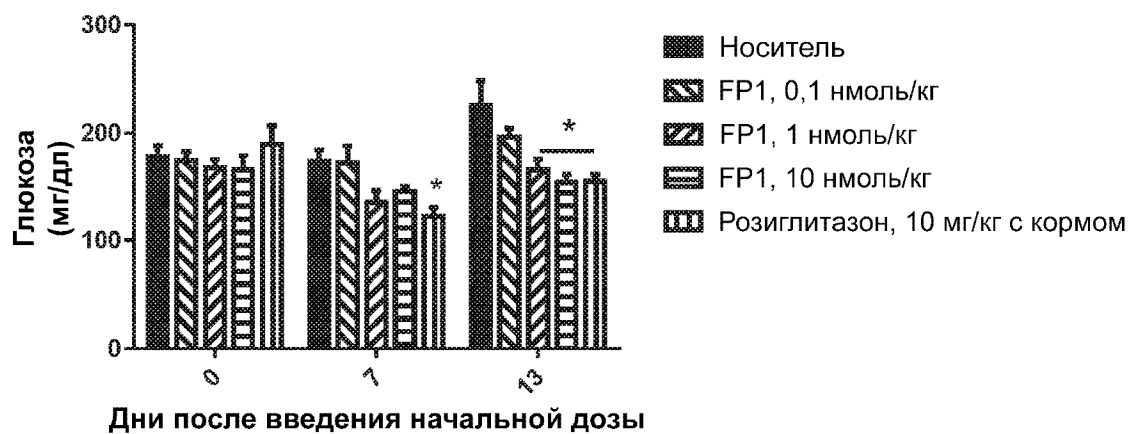
Фиг. 5А



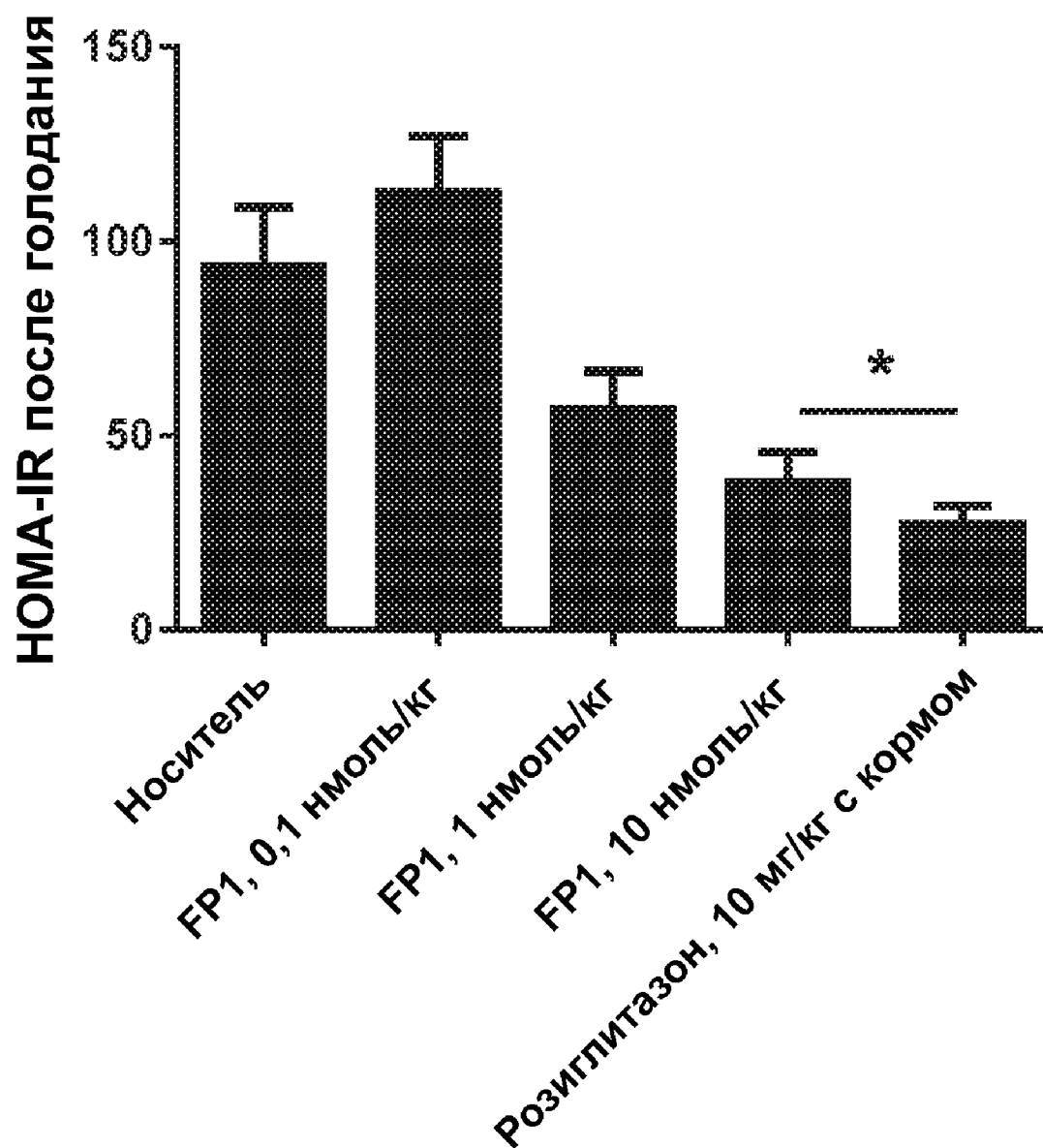
Фиг. 5В



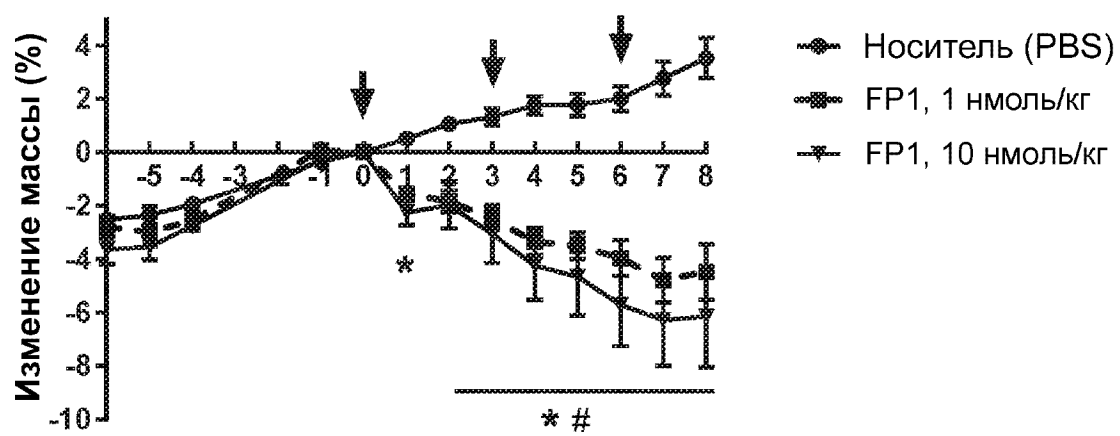
Фиг. 6



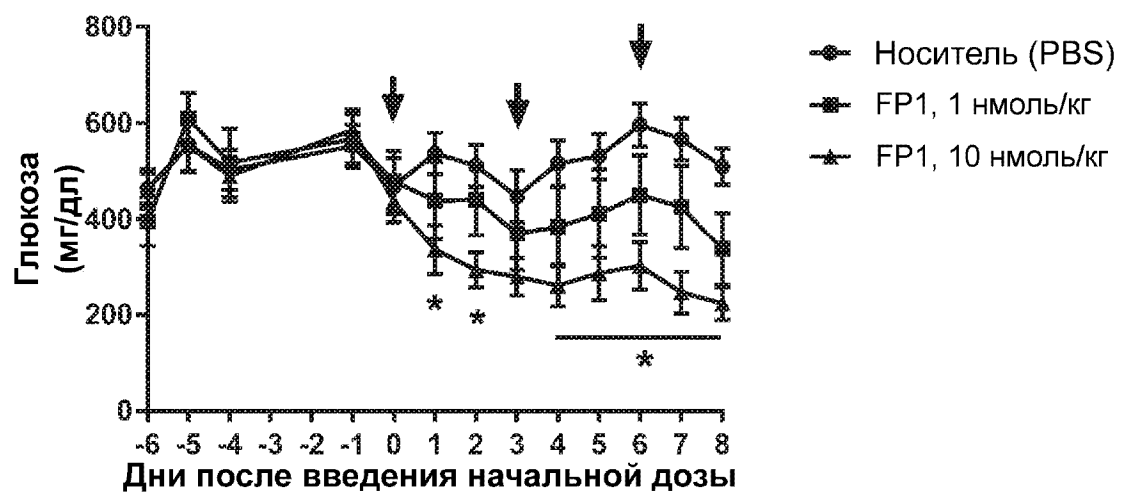
Фиг. 7



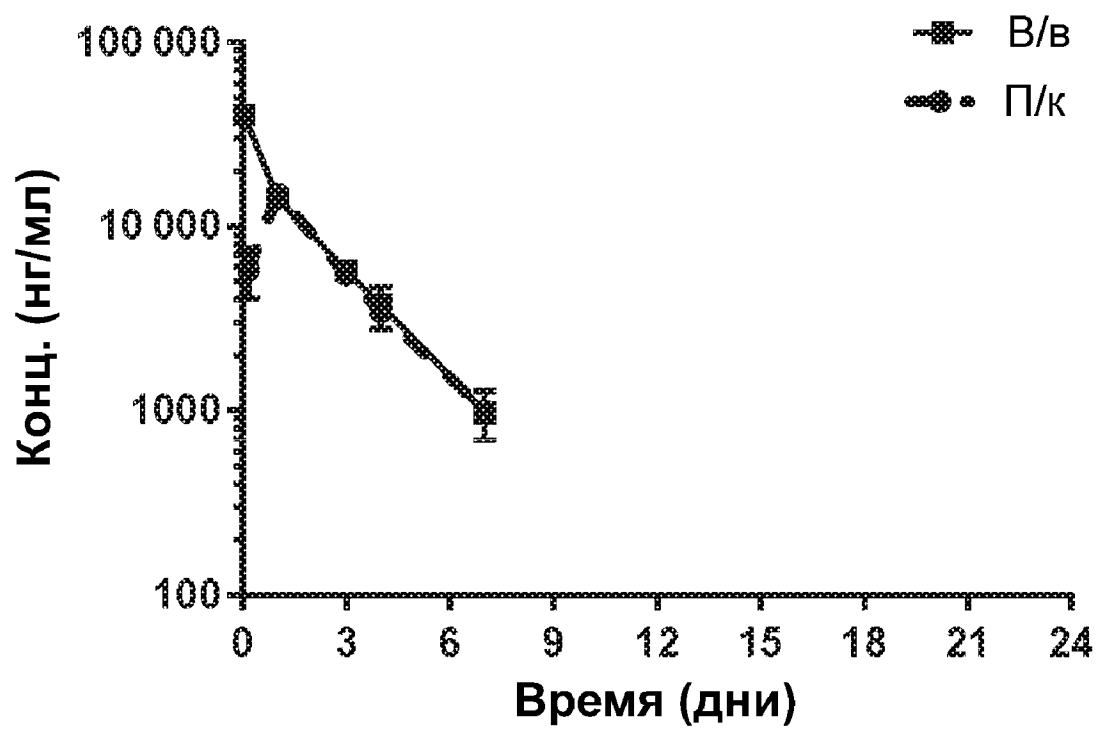
Фиг. 8



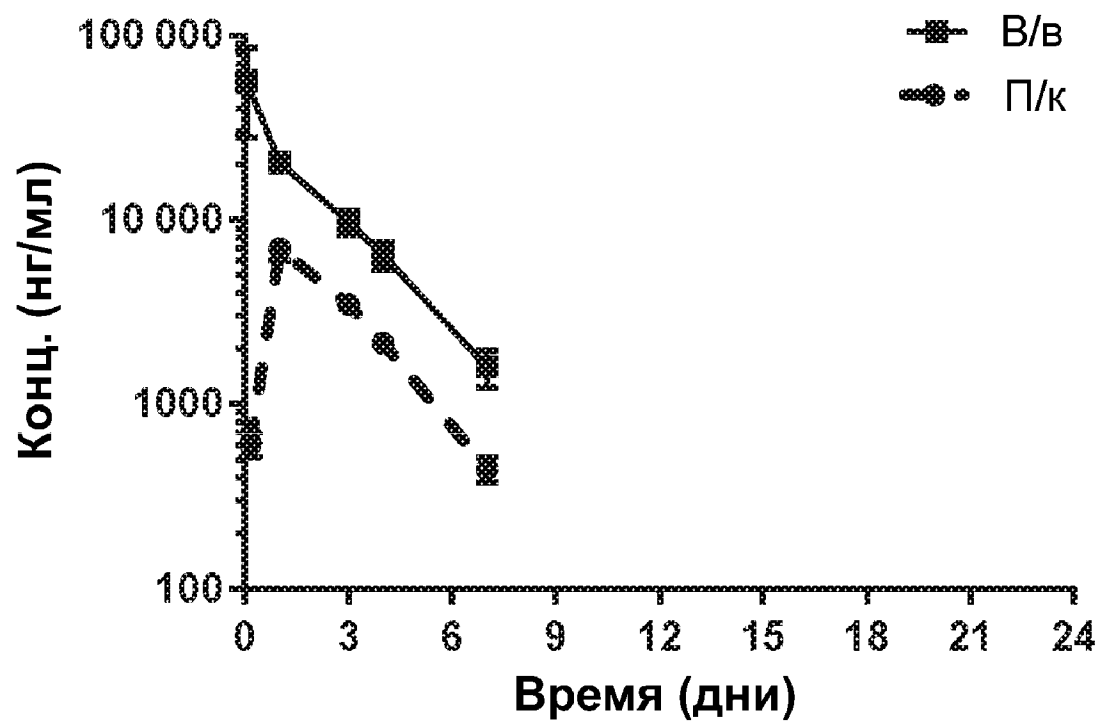
Фиг. 9



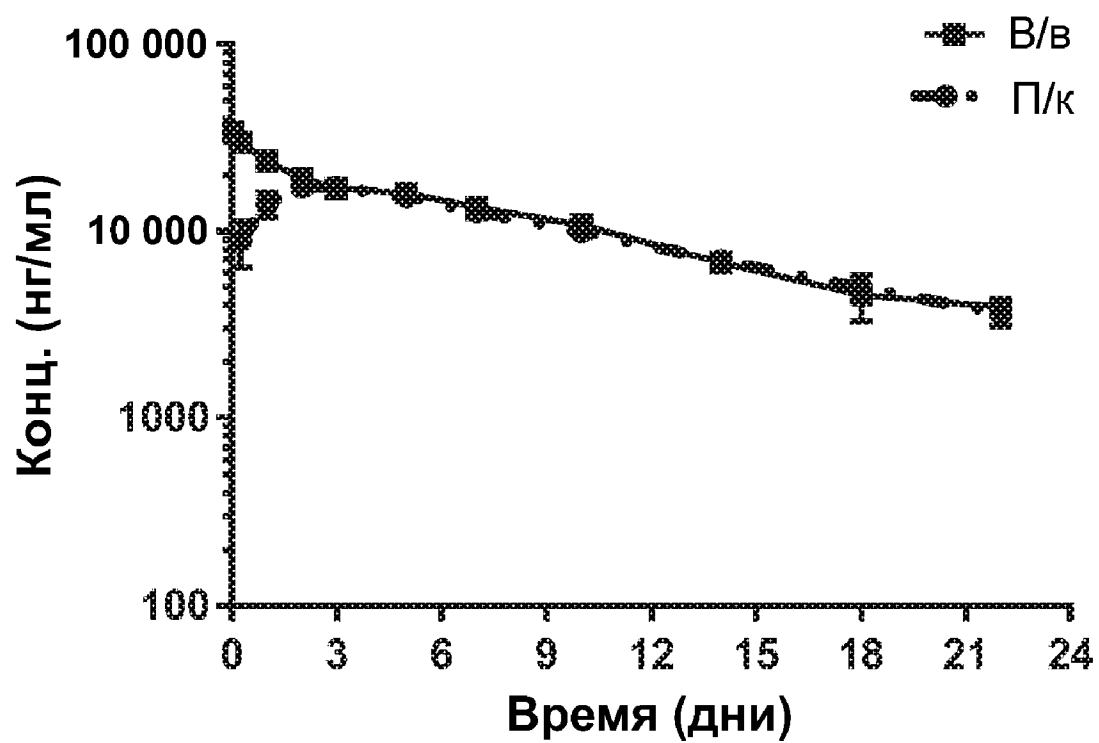
Фиг. 10



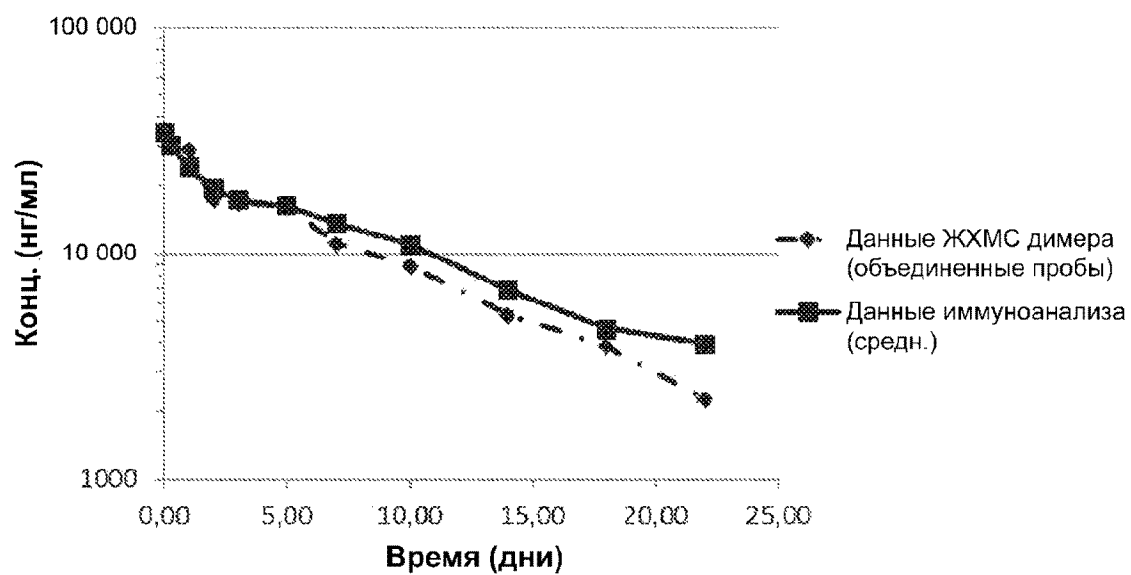
Фиг. 11



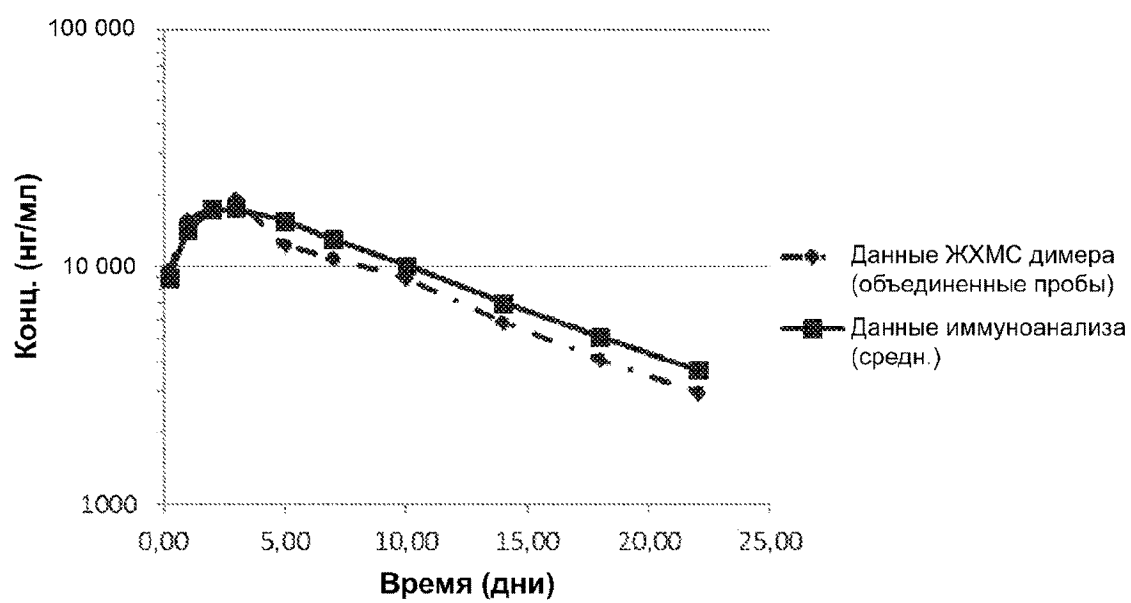
Фиг. 12



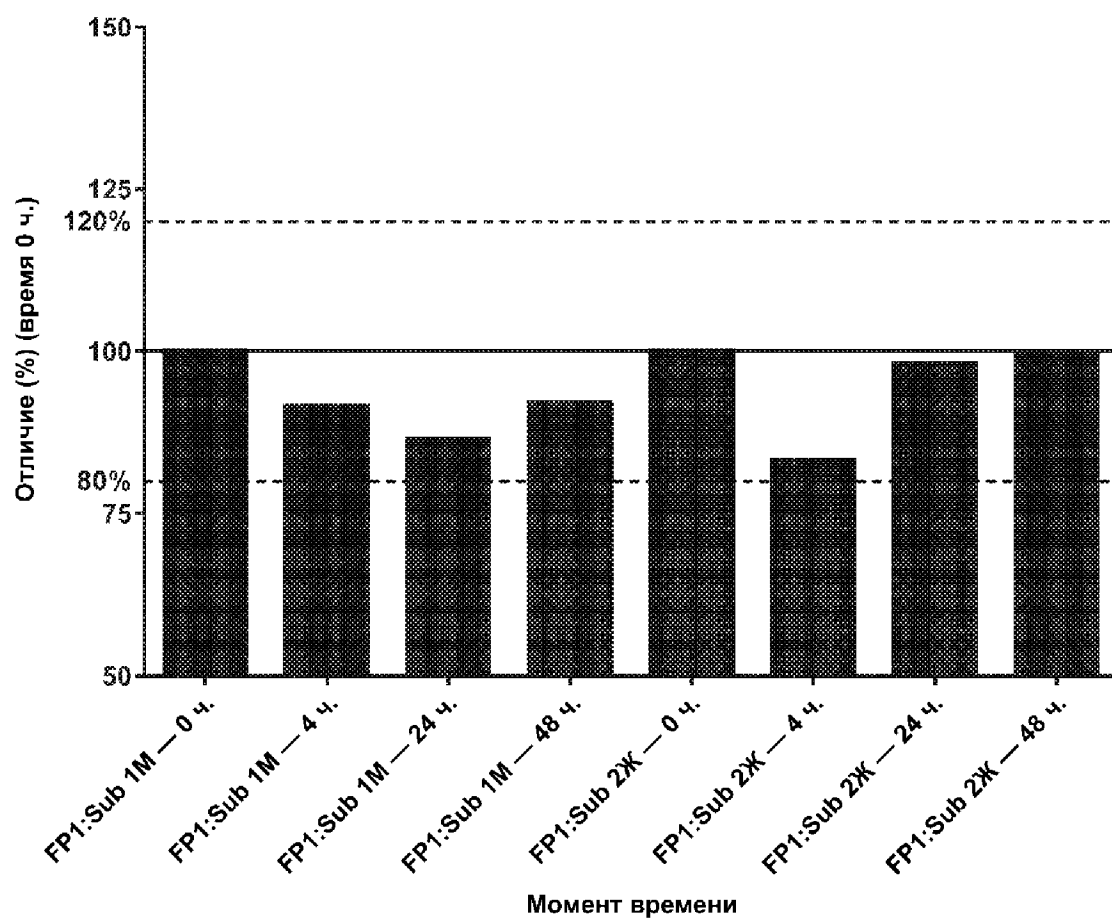
Фиг. 13



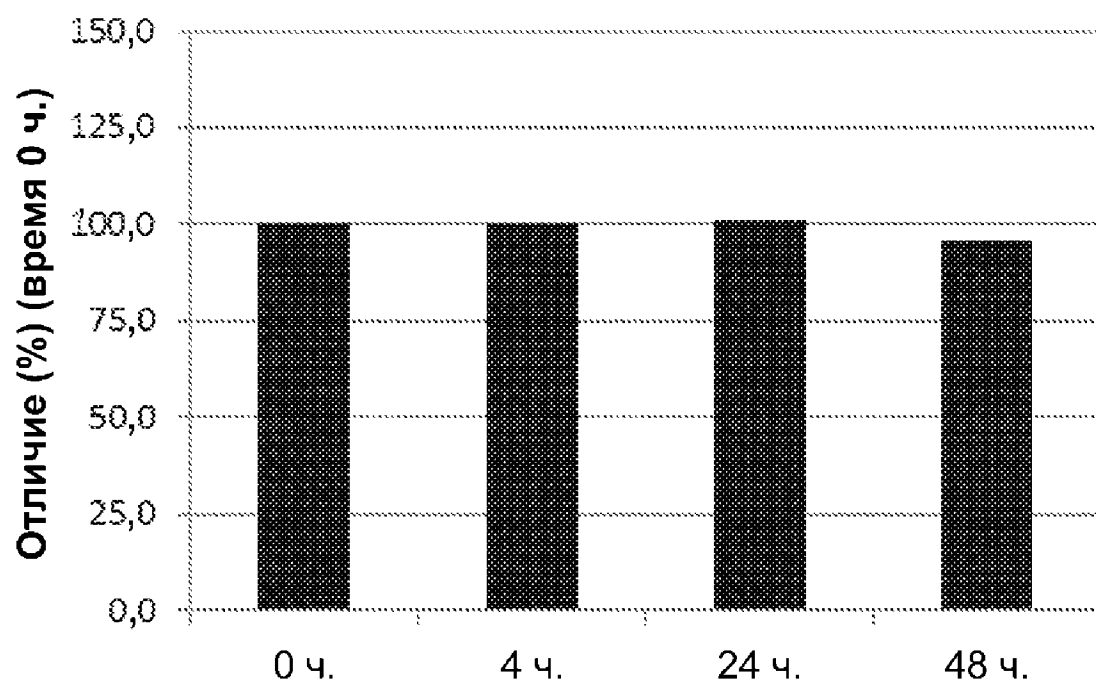
Фиг. 14



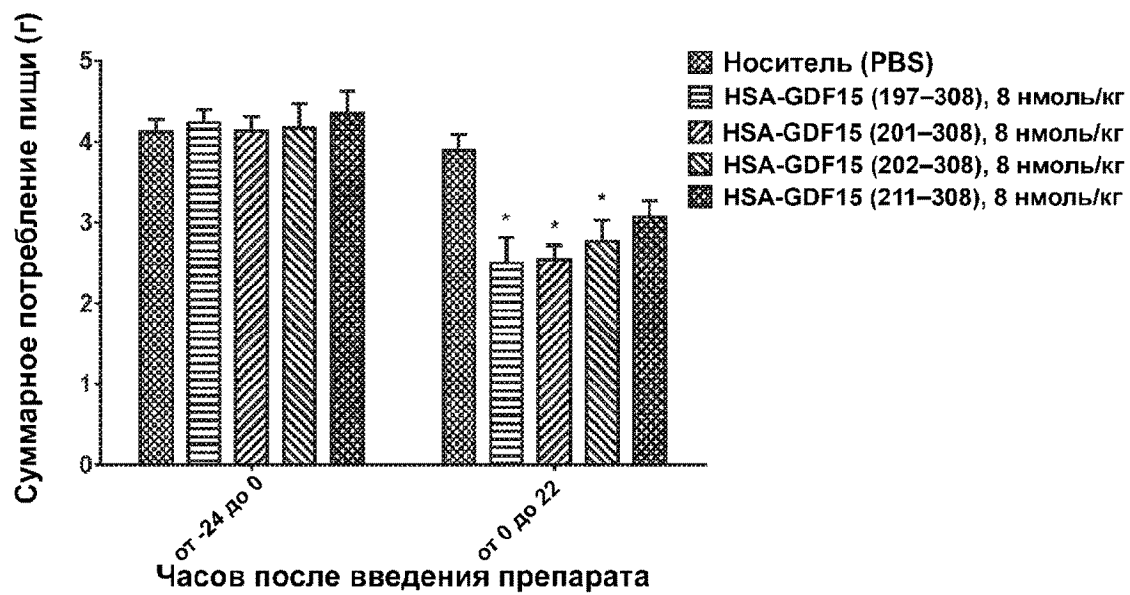
Фиг. 15



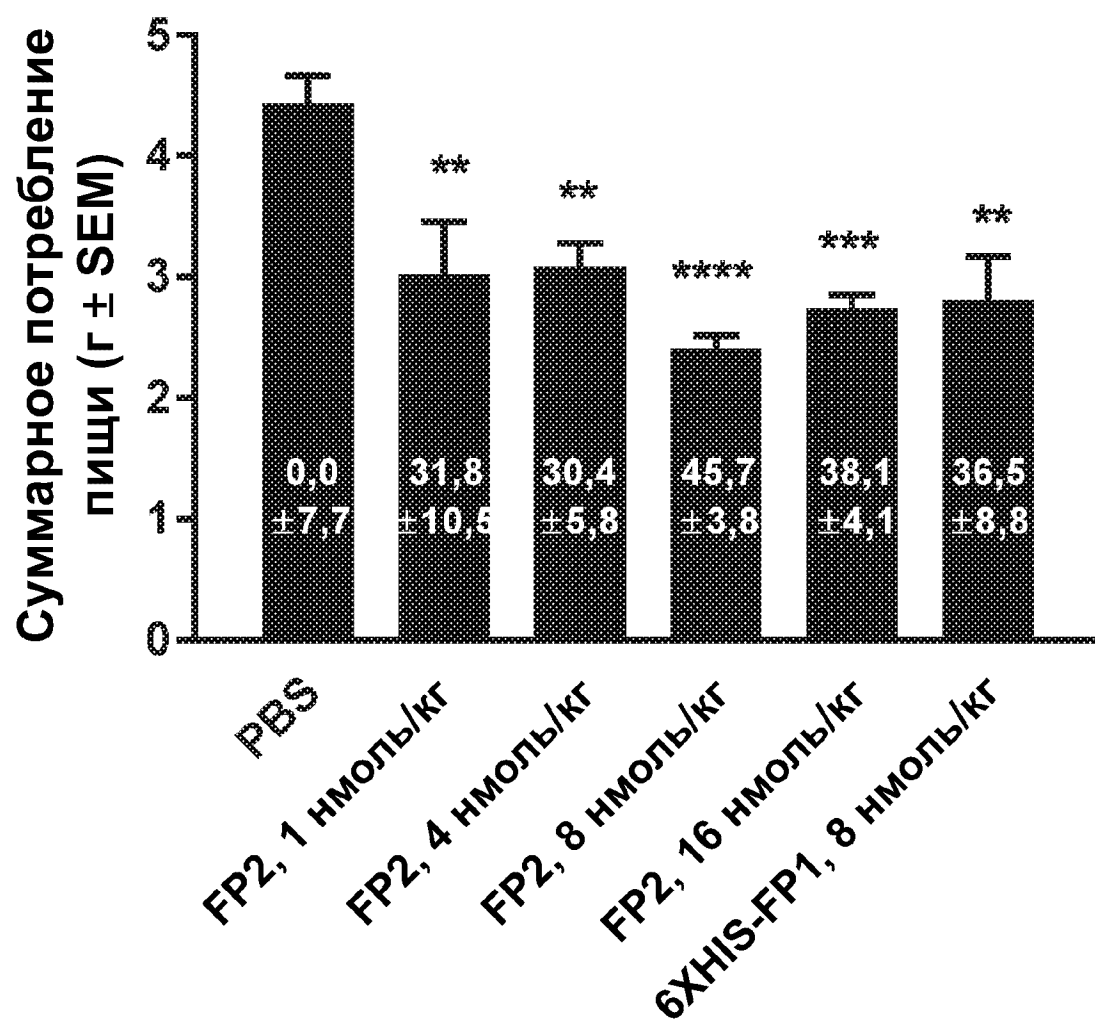
Фиг. 16



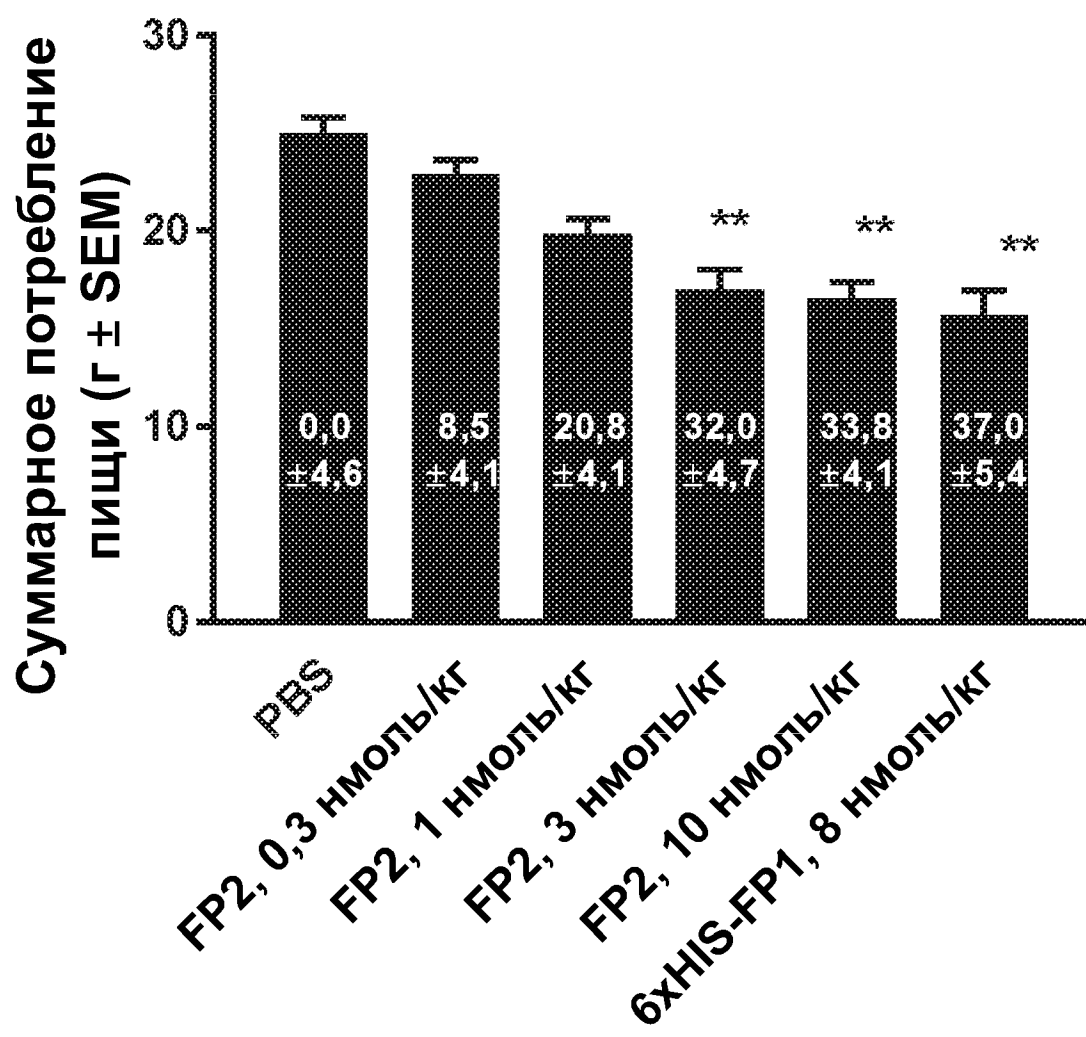
Фиг. 17



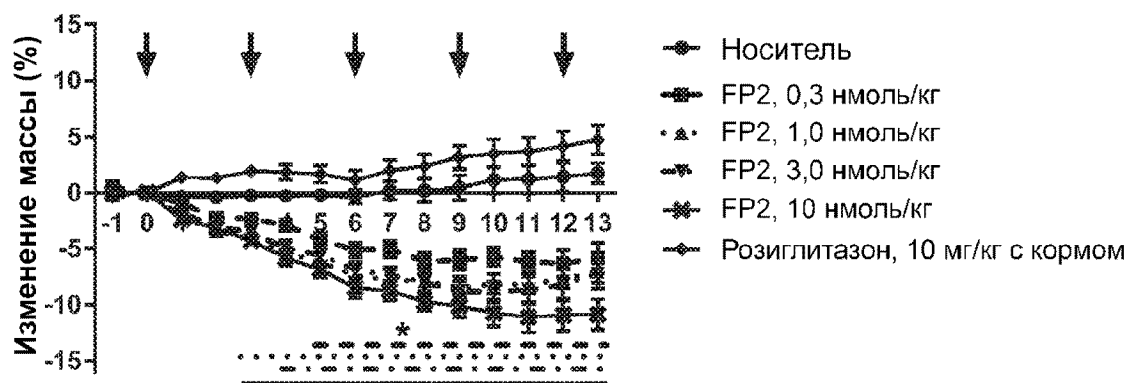
Фиг. 18



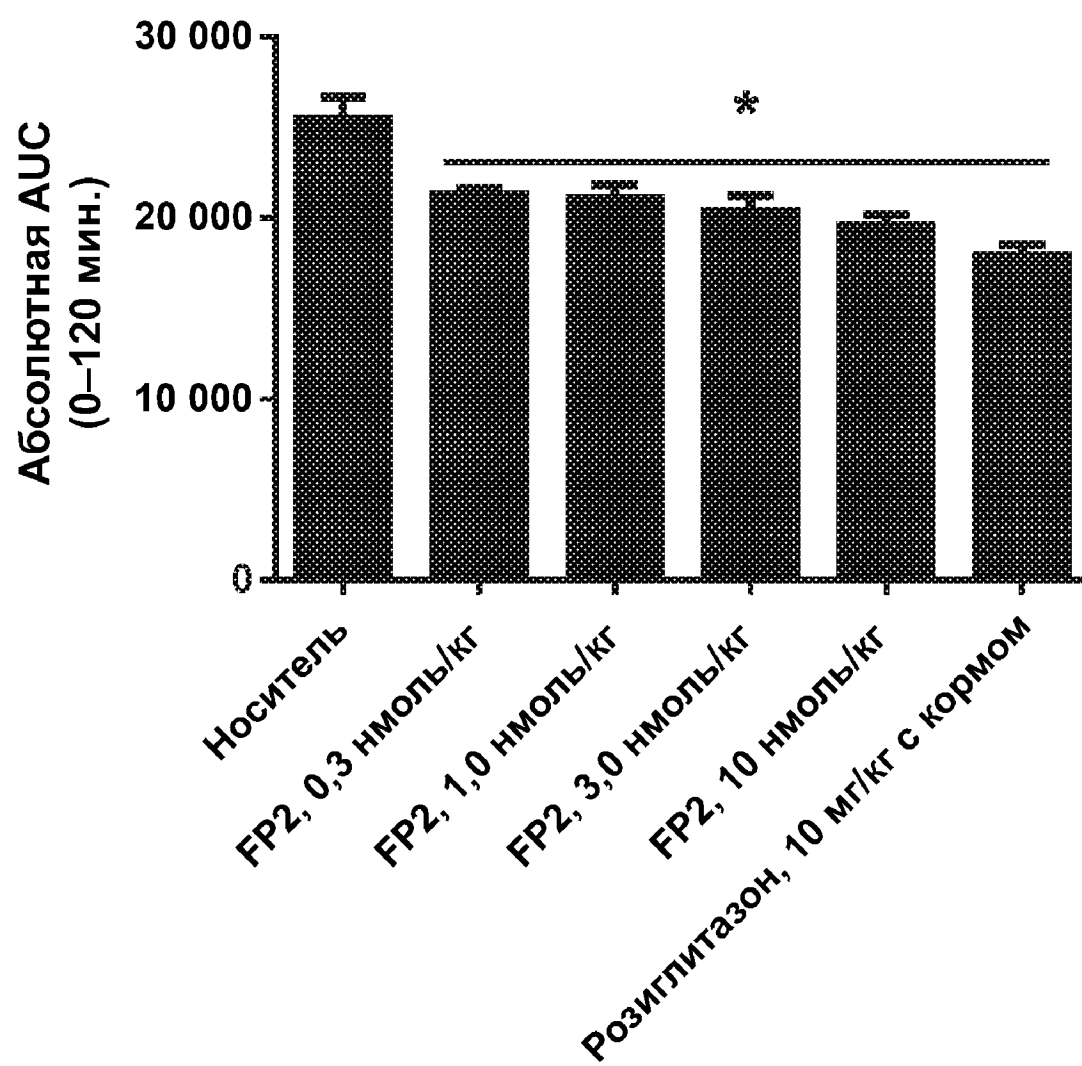
Фиг. 19



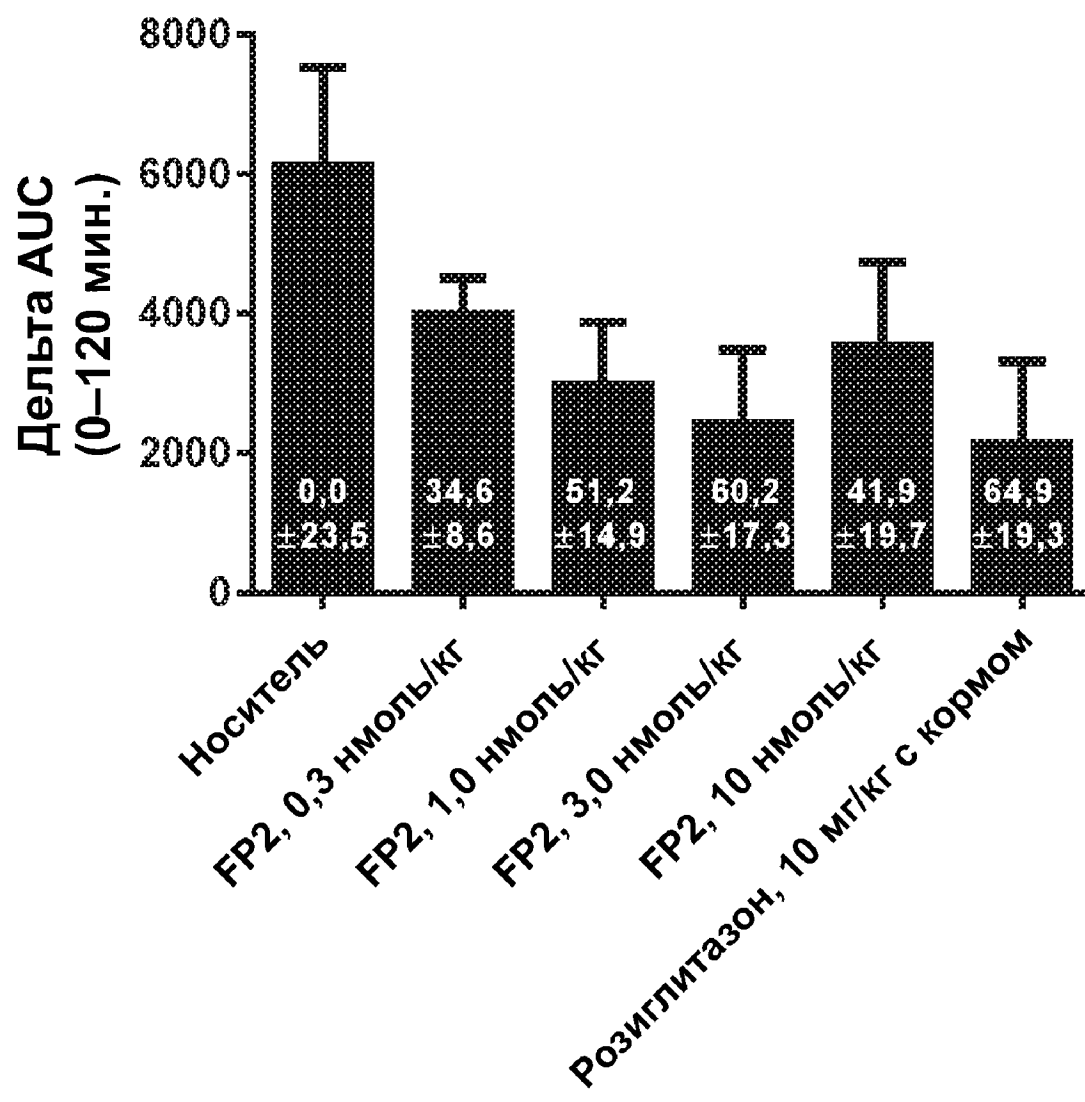
Фиг. 20



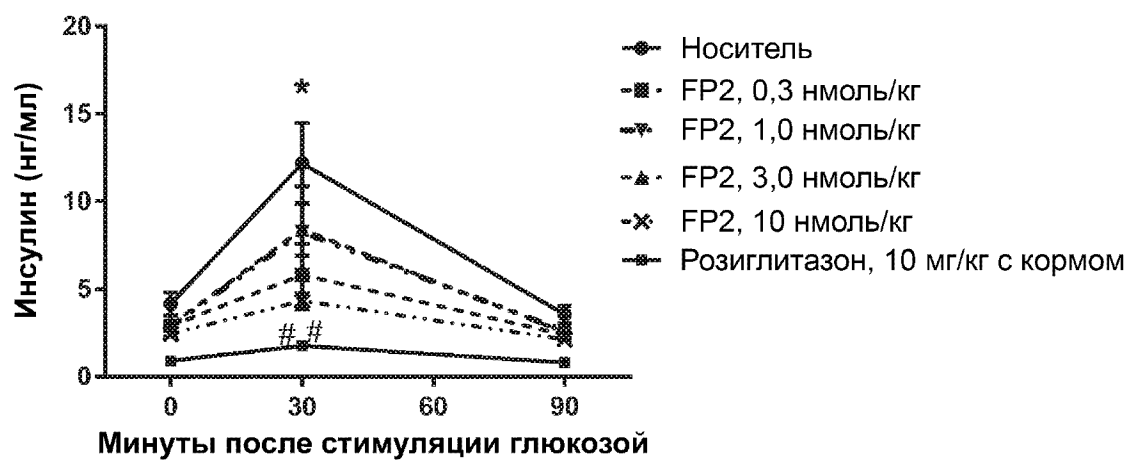
Фиг. 21А



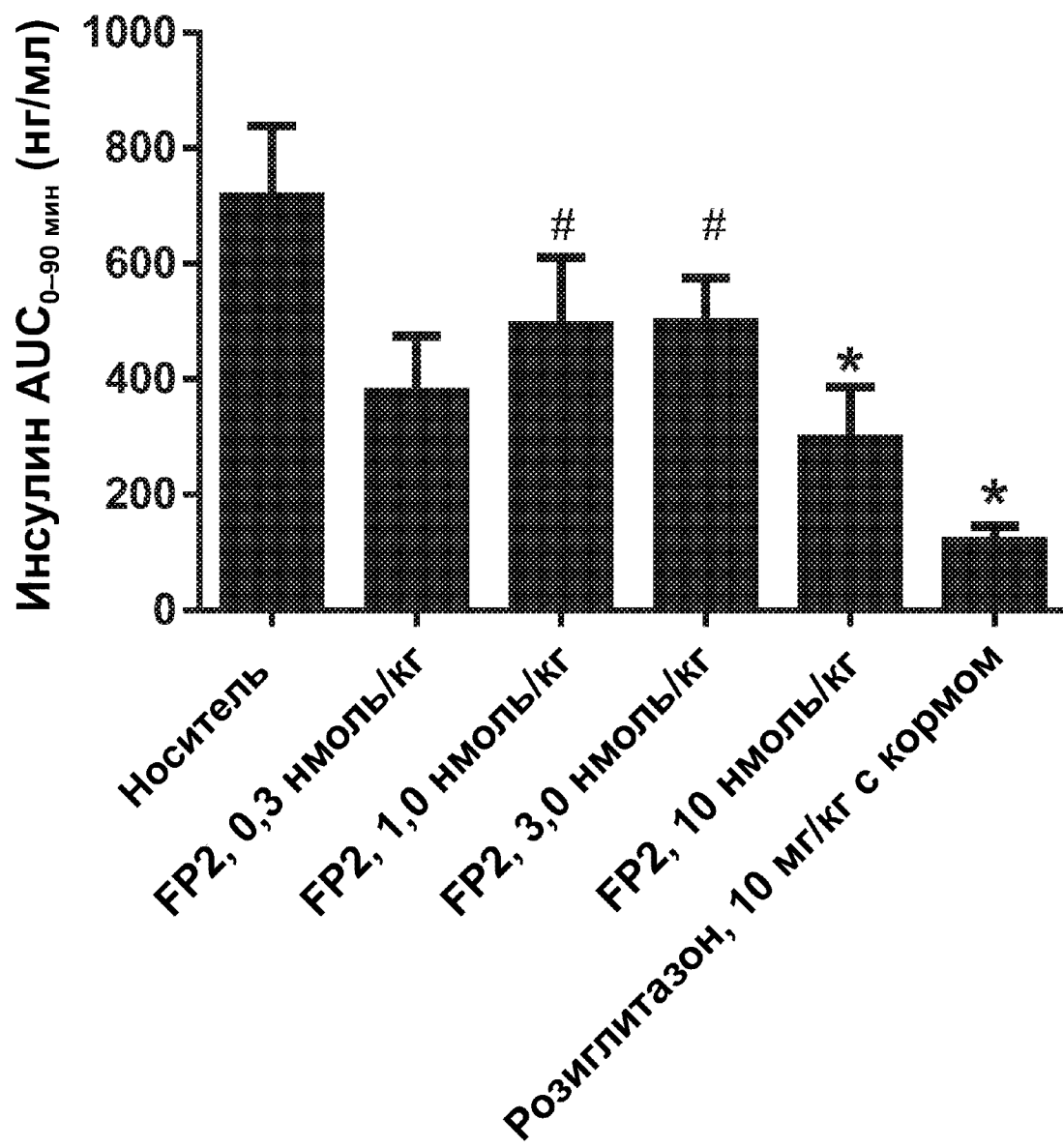
Фиг. 21В



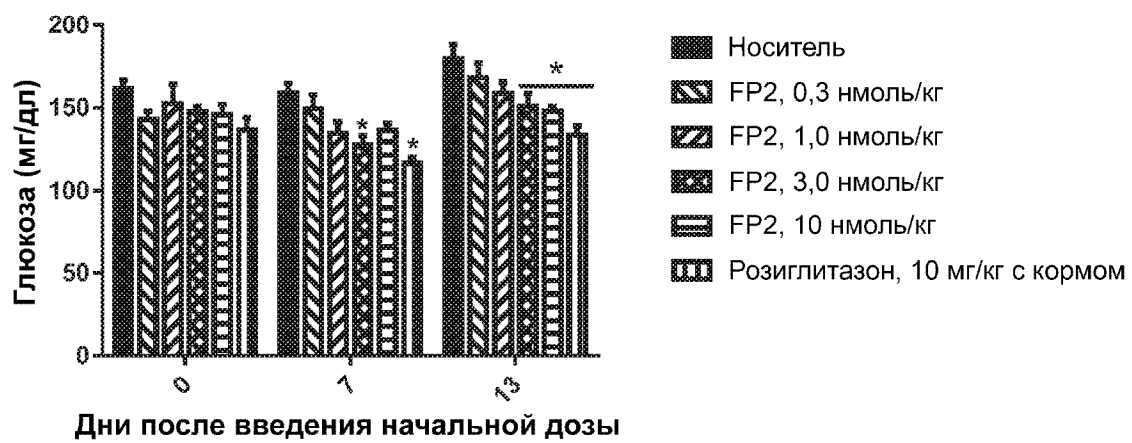
Фиг. 22А



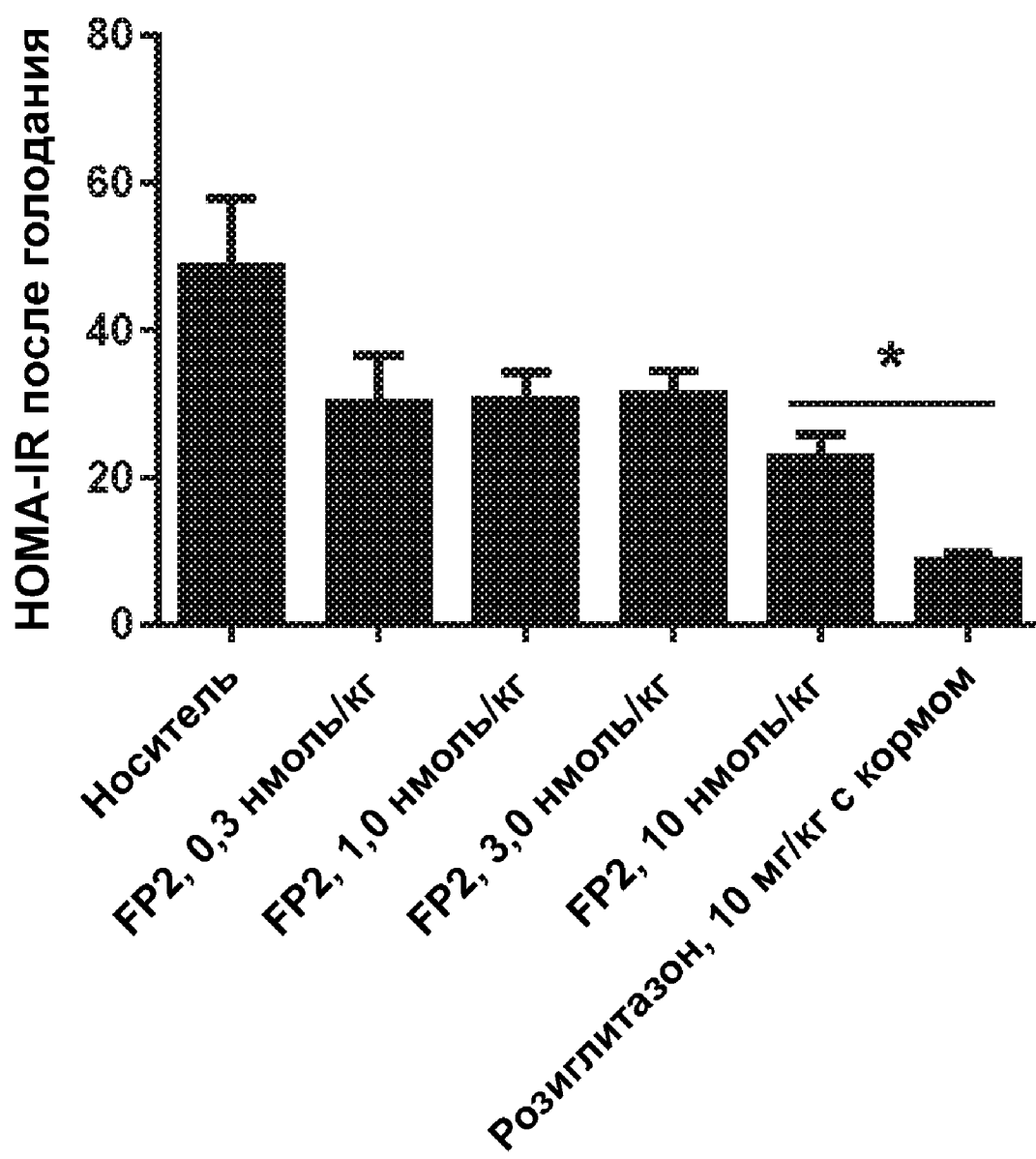
Фиг. 22В



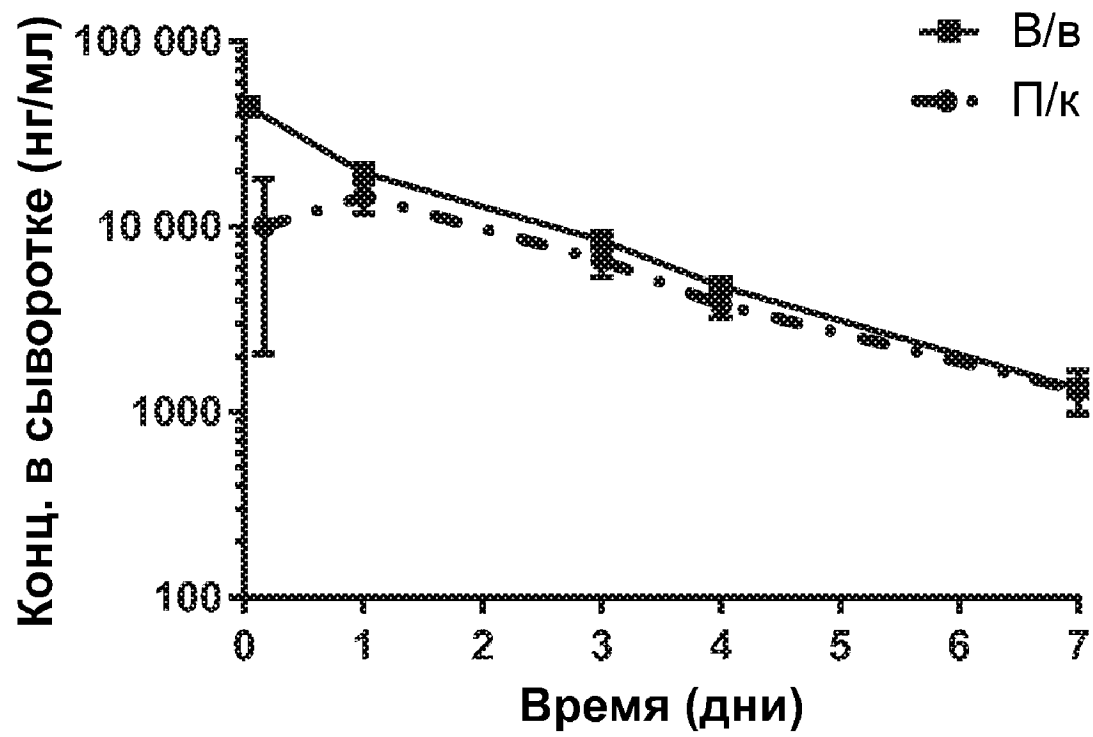
Фиг. 23



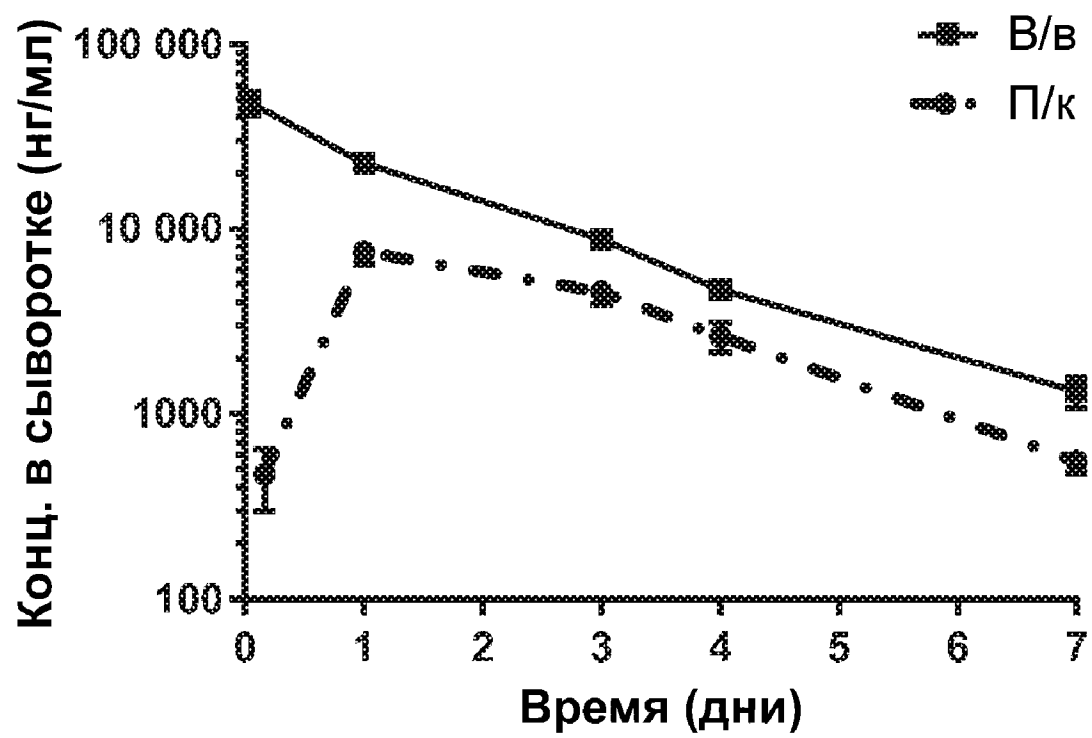
Фиг. 24



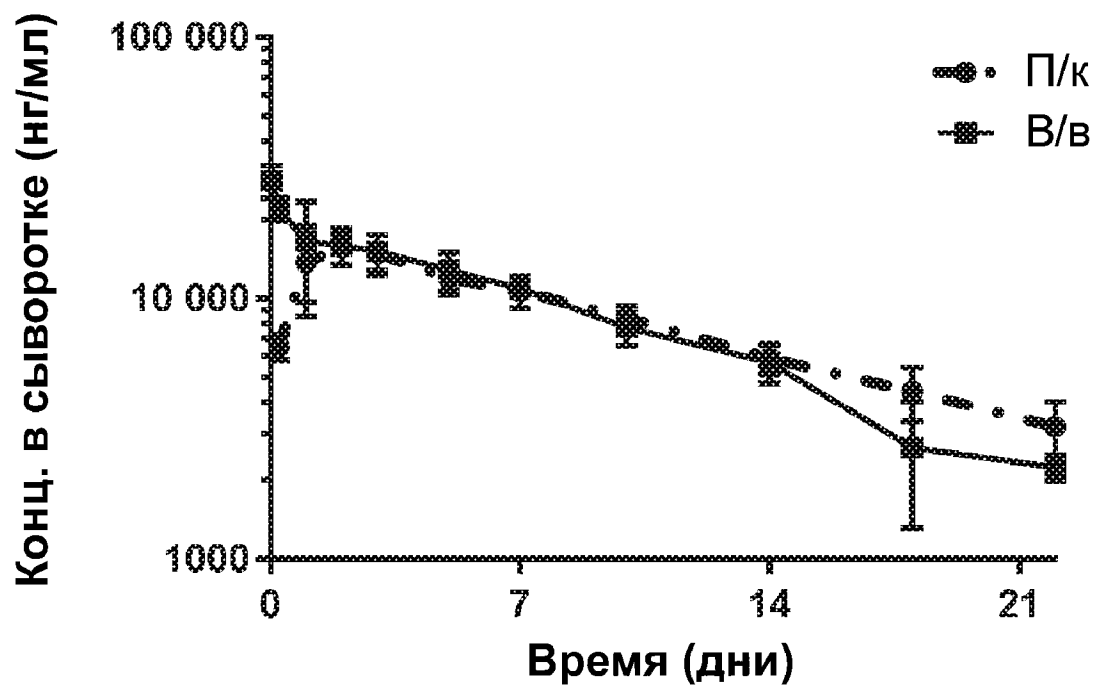
Фиг. 25



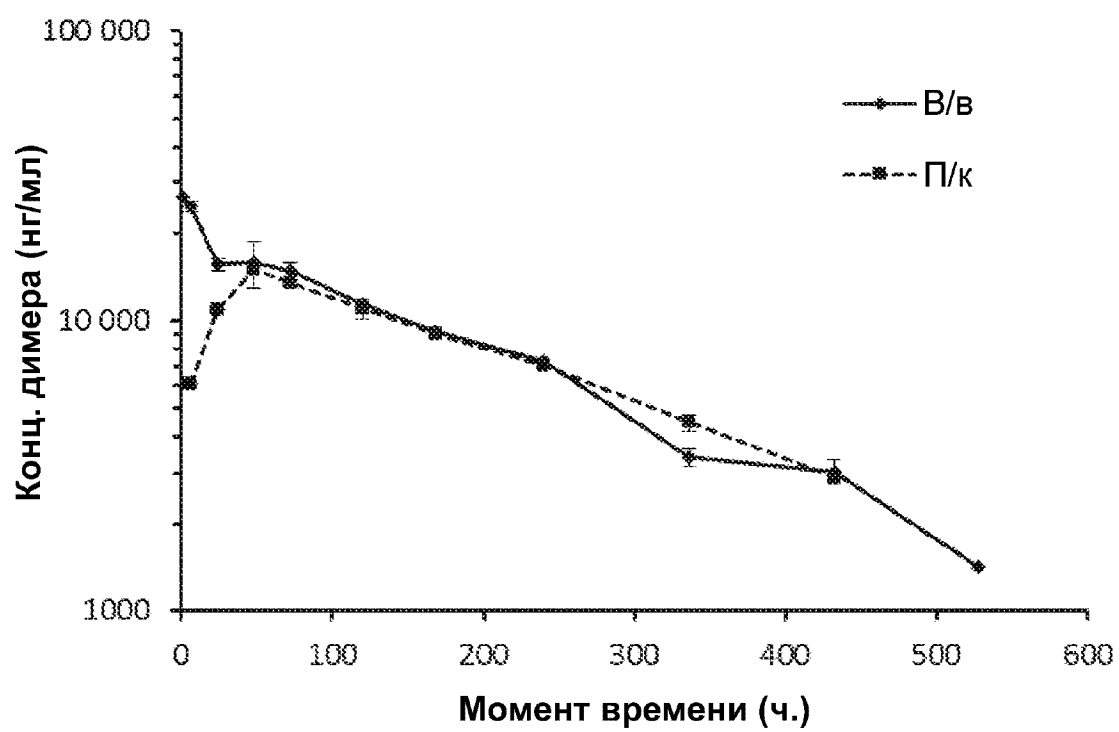
Фиг. 26



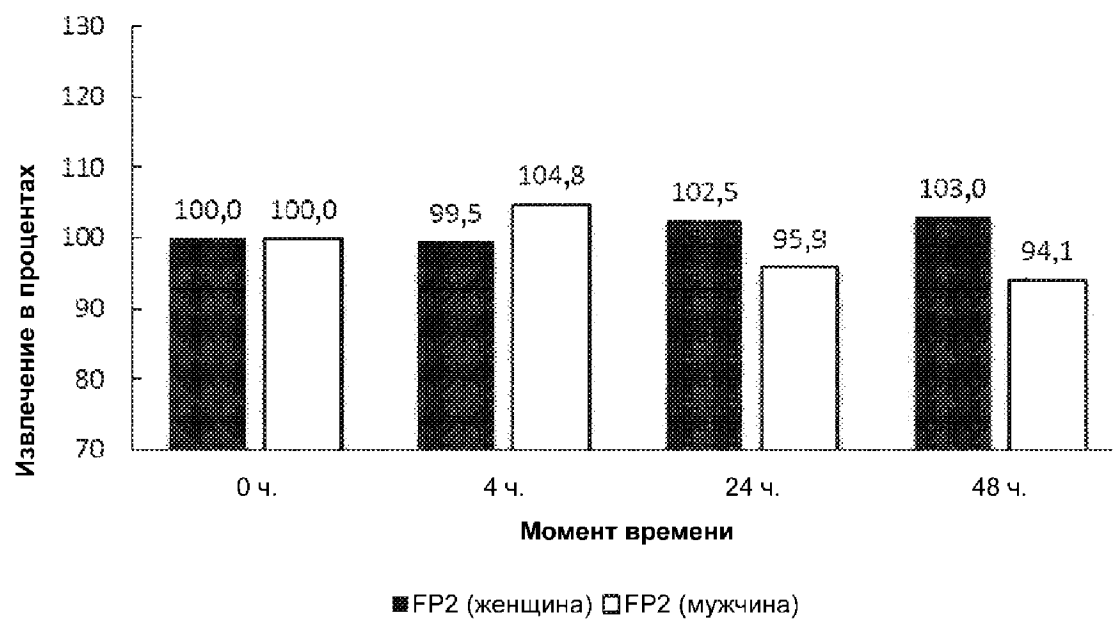
Фиг. 27



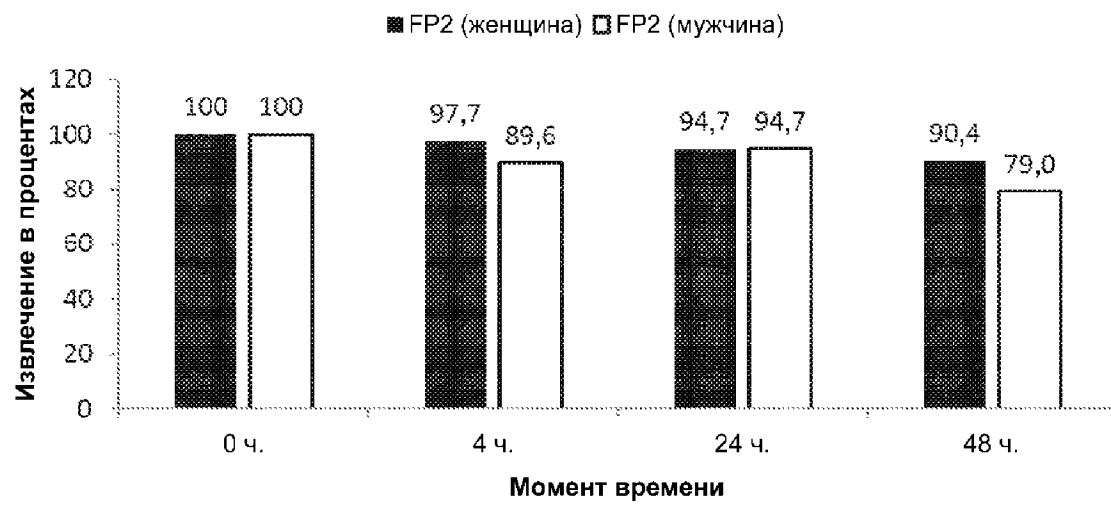
Фиг. 28



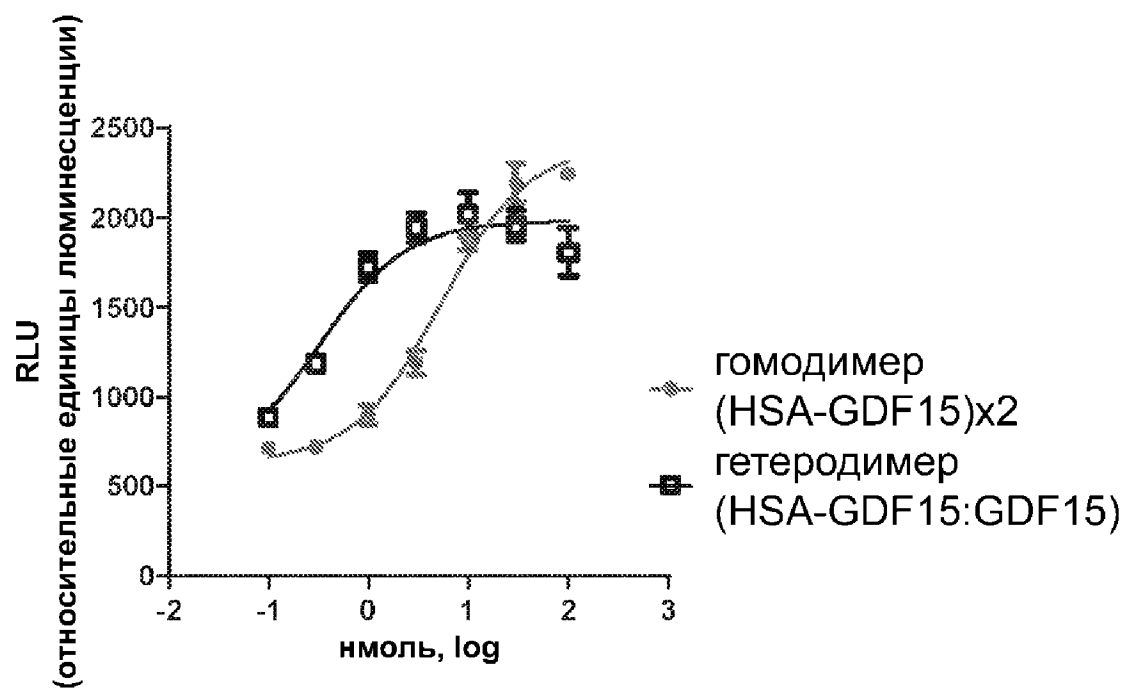
Фиг. 29



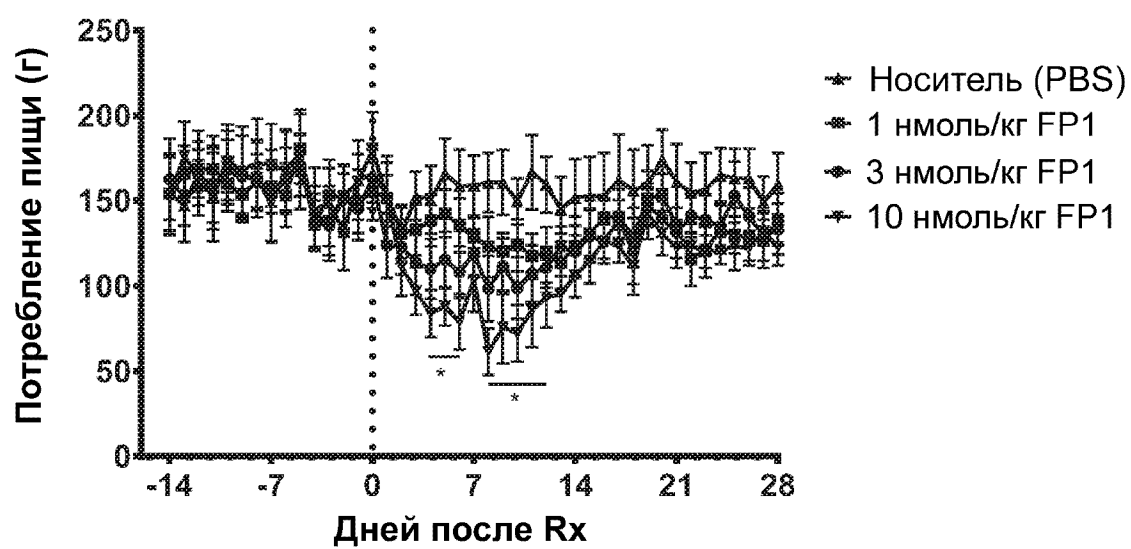
Фиг. 30



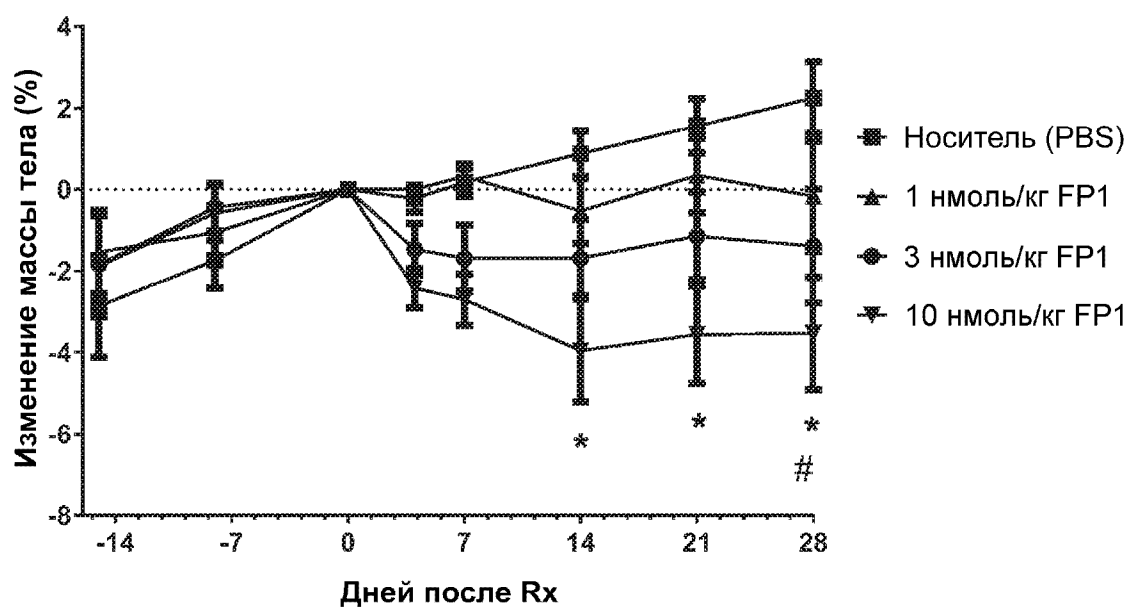
Фиг. 31



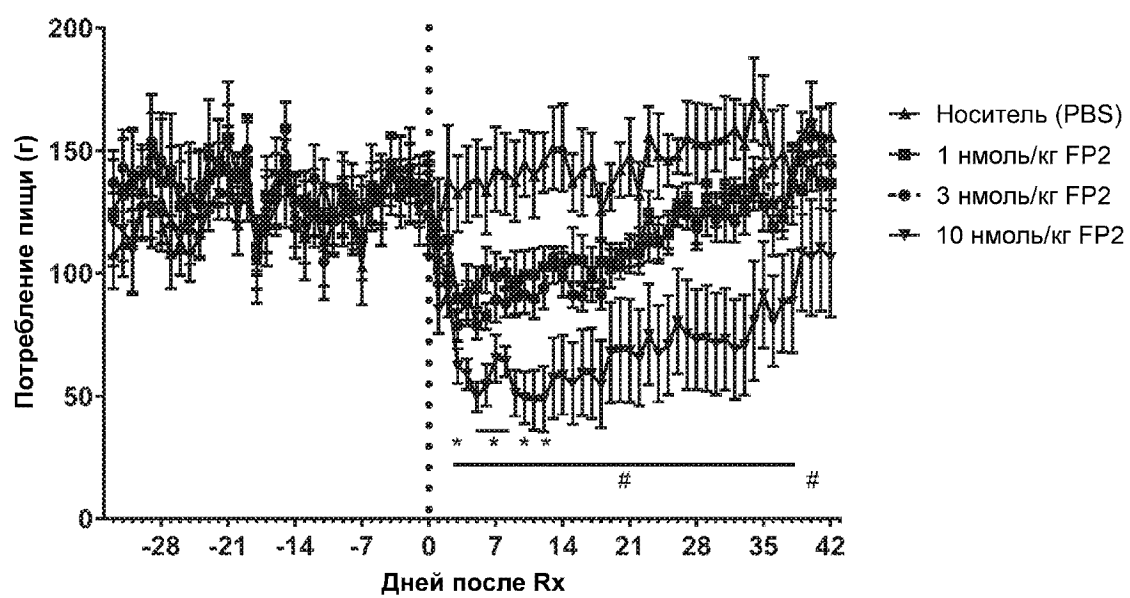
Фиг. 32



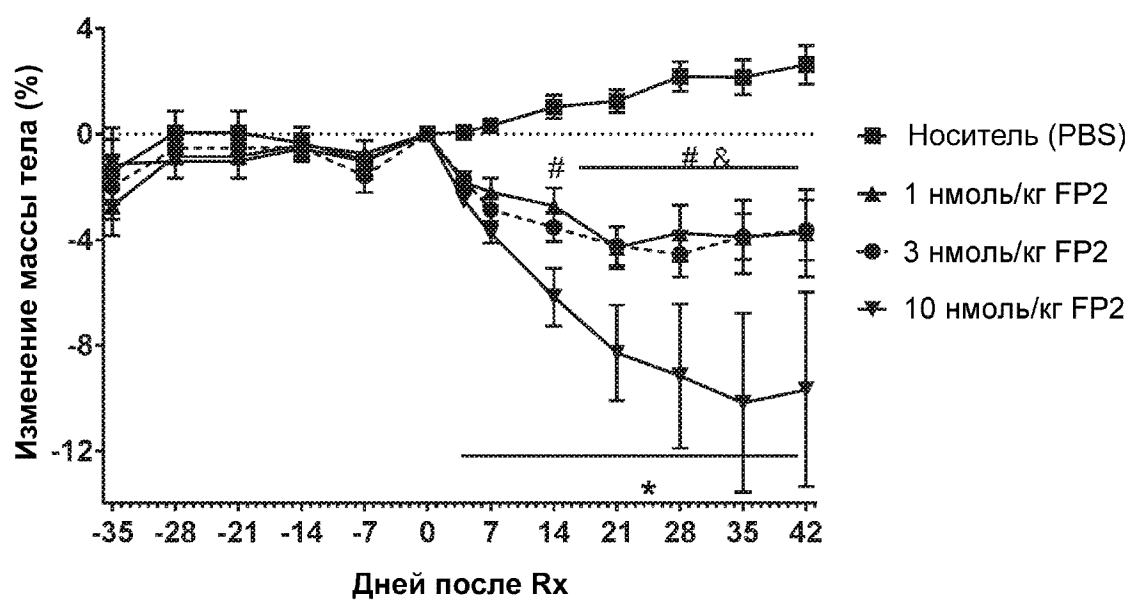
Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference JBI5086WOPCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2017/031197	International filing date (day/month/year) 05 May 2017	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10 May 2016
Applicant JANSSEN BIOTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1A
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☒ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/031197

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1, 2, 4-6, 8, 12, 60, 92, and 96 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/031197

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-12, 15-24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-7, 13, 14, 25-34, and 37-45 to the extent that they read on a fusion protein of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:60, and/or SEQ ID NO:92.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/031197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 9/00; A61K 38/00; A61K 38/18; C07K 14/00; C07K 14/495; C07K 14/765 (2017.01)

CPC - A61K 9/0019; A61K 38/00; C07K 14/495; C07K 2319/02; C07K 2319/30; C07K 2319/31; C07K 2319/91 (2017.08)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 435/360; 435/69.1; 435/252.3; 435/320.1; 514/4.8; 514/6.8; 514/6.9; 530/363 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN et al. "Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality," Adv Drug Deliv Rev, 15 October 2015 (15.10.2015), Vol. 65, Iss. 10, Pgs. 1357-1369. entire document	1-7, 13, 14, 25-34, 37-45
A	US 6,420,543 B1 (LEE et al) 16 July 2002 (16.07.2002) entire document	1-7, 13, 14, 25-34, 37-45
A	US 2014/0213511 A1 (NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC.) 31 July 2014 (13.07.2014) entire document	1-7, 13, 14, 25-34, 37-45
A	WO 2015/198199 A1 (NOVARTIS AG) 30 December 2015 (30.12.2015) entire document	1-7, 13, 14, 25-34, 37-45
P, A	US 2016/0168213 A1 (AMGEN INC.) 16 June 2016 (16.06.2016) entire document	1-7, 13, 14, 25-34, 37-45



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*

Special categories of cited documents:

"A"

document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E"

earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P"

document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 2017

Date of mailing of the international search report

18 SEP 2017

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/031197

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-7, 13, 14, and 25-45 are drawn to fusion proteins, and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to a fusion protein, and methods comprising the same, wherein the fusion protein is selected to be SEQ ID NO:5, wherein the fusion protein comprises a half-life extension protein, a linker, and a GDF 15 protein, wherein the half-life extension protein is a human serum albumin (HSA) of SEQ ID NO:1, wherein the linker is SEQ ID NO:4, and wherein the GDF 15 protein is SEQ ID NO:6 (encoded by SEQ ID NO:96). It is believed that claims 1-7, 13, 14, 27-33, 37-41, and 43-45 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on a fusion protein comprising SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, and/or SEQ ID NO:96.

Applicant is invited to elect additional fusion proteins, half-life extension proteins, linkers, and/or GDF15 proteins, each with specified SEQ ID NO, to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be to a fusion protein, and methods comprising the same, wherein the fusion protein is selected to be SEQ ID NO:25. Additional fusion proteins, half-life extension proteins, linkers, and/or GDF15 proteins will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element for treating a disorder, requiring the selection of alternatives for the half-life extension protein, linker, and GDF15 protein for each of the fusion proteins, where "the half-life extension protein comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 2 and 3" and "the linker comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of (GGGGS)_n, (AP)_n, (EAAAK)_n, (GGGGA)_n, (PGGGS)_n, (AGGGS)_n and (i)GS-(EGKSSGSG-ISEKST)_n-GGS wherein n is 2 to 20" and "the GDF1 5 protein comprises an amino acid sequence having at least 90% identity to SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 or 11" and "[t]he fusion protein ...comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 25-30, 40, 55-56, 59-60, 70, 92, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, and 127".

The Groups I+ share the technical features of a fusion protein comprising: a. a half-life extension protein, b. a linker, and c. a GDF 15 protein; wherein the fusion protein is arranged from N-terminus to C-terminus in the order (a)-(b)-(c); a fusion protein comprising an amino acid sequence; a method of treating a disorder selected from the group consisting of a metabolic disorder selected from the group consisting of type 2 diabetes, elevated glucose levels, elevated insulin levels, obesity, dyslipidemia, diabetic nephropathy; myocardial ischemic injury, congestive heart failure, and rheumatoid arthritis in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a fusion protein comprising the amino acid sequence and a pharmaceutically acceptable carrier; a method of treating a disorder selected from the group consisting of a metabolic disorder selected from the group consisting of type 2 diabetes, elevated glucose levels, elevated insulin levels, obesity, dyslipidemia, diabetic nephropathy; myocardial ischemic injury, congestive heart failure, and rheumatoid arthritis in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a fusion protein comprising the amino acid sequence and a pharmaceutically acceptable carrier; a dimer comprising two polypeptide chains, wherein each chain comprises from N-terminus to C-terminus an ISA region, a linker, and a GDF15 region; wherein the HSA region comprises an amino acid sequence and wherein the GDF15 region comprises an amino acid sequence; a dimer comprising (i) a first polypeptide chain comprising a first HSA region at the N terminus, a linker, and a first GDF 15 region at the C-terminus, and (ii) a second polypeptide chain comprising a second GDF15 region; wherein the HSA region comprises an amino acid sequence, and wherein the first GDF15 region comprises an amino acid sequence and the second GDF15 region comprises an amino acid sequence; a polypeptide comprising an amino acid sequence; an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence; a vector comprising a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence; a host cell comprising a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2014/0213511 A1 to Ngm Biopharmaceuticals, Inc. discloses a fusion protein (Fusion molecules were generated wherein each GDF15 mutein sequence was fused to HSA through the linker, Para. [0052]) comprising: a. a half-life extension protein (HSA—drug molecule conjugates contemplated by the present disclosure... the fusion protein has a higher plasma stability than the unfused drug molecule and/or the fusion protein retains the therapeutic activity of the unfused drug molecule, Para. [0183]); b. a linker (the indirect fusion is effected by a linker, such as a peptide linker or modified version thereof, Para. [0183]), and c. a GDF 15 protein (fusion molecules comprising mature GDF15 polypeptide, Para. [0160]); wherein the fusion protein is arranged from N-terminus to C-terminus in the order (a)-(b)-(c) (recombinant human GDF15 and GDF15 muteins were constructed as N-terminal HSA fusion molecules containing a Factor Xa proteolytic-sensitive linker (a 2x(4Gly-Ser) Factor Xa cleavable linker; as described in FIG. 1F, Para. [0324]); a fusion protein comprising an amino acid sequence (Fusion molecules were generated wherein each GDF15 mutein sequence was fused to HSA through the linker, Para. [0052]); a method of treating a disorder selected from the group consisting of a metabolic disorder selected from the group consisting of type 2 diabetes, elevated glucose levels, elevated insulin levels, obesity, dyslipidemia, diabetic nephropathy; myocardial ischemic injury, congestive heart failure, and rheumatoid arthritis in a subject in need thereof (By way of example, but not limitation, the agents, and compositions thereof, can be used for the treatment and/or prevention of diabetes mellitus (e.g., Type 2 diabetes), Para. [0009]), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition (The present disclosure also contemplates a method of treating or preventing a glucose metabolism disorder in a subject (e.g., a human) by administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide, Para. [0038]; administering a Polypeptide or a pharmaceutical composition comprising a Polypeptide, Para. [0066]) comprising a fusion protein comprising the amino acid sequence and a pharmaceutically acceptable carrier (such compositions are "pharmaceutical compositions" comprising one or more

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/031197

modulators and one or more pharmaceutically acceptable or physiologically acceptable diluents, carriers, Para. [0253]; Fusion molecules were generated wherein each GDF15 mutein sequence was fused to HSA through the linker, Para. [0052]; a method of treating a disorder (The present disclosure also contemplates a method of treating or preventing a glucose metabolism disorder in a subject (e.g., a human) by administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide, Para. [0038]; administering a Polypeptide or a pharmaceutical composition comprising a Polypeptide, Para. [0066]; Fusion molecules were generated wherein each GDF15 mutein sequence was fused to HSA through the linker, Para. [0052]) selected from the group consisting of a metabolic disorder selected from the group consisting of type 2 diabetes, elevated glucose levels, elevated insulin levels, obesity, dyslipidemia, diabetic nephropathy; myocardial ischemic injury, congestive heart failure, and rheumatoid arthritis in a subject in need thereof (By way of example, but not limitation, the agents, and compositions thereof, can be used for the treatment and/or prevention of diabetes mellitus (e.g., Type 2 diabetes), Para. [0009]), comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a fusion protein comprising the amino acid sequence and a pharmaceutically acceptable carrier (such compositions are "pharmaceutical compositions" comprising one or more Modulators and one or more pharmaceutically acceptable or physiologically acceptable diluents, carriers, Para. [0253]; Fusion molecules were generated wherein each GDF15 mutein sequence was fused to HSA through the linker, Para. [0052]); a dimer comprising two polypeptide chains, wherein each chain comprises from N-terminus to C-terminus an HSA region (each of the N-linked glycan muteins increased the hydrodynamic radii of the human GDF15 disulfide-linked dimer, Para. [0126]), a linker, and a GDF15 region; wherein the HSA region comprises an amino acid sequence and wherein the GDF15 region comprises an amino acid sequence (GDF15 and GDF15 muteins were constructed as N-terminal HSA fusion molecules containing a Factor Xa proteolytic-sensitive linker (a 2x(4Gly-Ser) Factor Xa cleavable linker, Para. [0324]; see Fig. 1H); a dimer comprising (i) a first polypeptide chain comprising a first HSA region at the N terminus (N-terminal HSA fusion molecules, Para. [0122]), a linker (the fusion protein comprises a linker, Para. [0185]), and a first GDF 15 region at the C-terminus (GDF15 and GDF15 muteins were constructed as N-terminal HSA fusion molecules containing a Factor Xa proteolytic-sensitive linker (a 2x(4Gly-Ser) Factor Xa cleavable linker, Para. [0324]; see Fig. 1H); and (ii) a second polypeptide chain comprising a second GDF15 region (the second encoding human GDF15, Para. [0298]); wherein the HSA region comprises an amino acid sequence, and wherein the first GDF15 region comprises an amino acid sequence (such compositions are "pharmaceutical compositions" comprising one or more Modulators and one or more pharmaceutically acceptable or physiologically acceptable diluents, carriers, Para. [0253]; Fusion molecules were generated wherein each GDF15 mutein sequence was fused to HSA through the linker, Para. [0052]) and the second GDF15 region comprises an amino acid sequence; a polypeptide comprising an amino acid sequence (the second encoding human GDF15, Para. [0298]); an isolated nucleic acid molecule (the present disclosure contemplates nucleic acid molecules encoding the aforementioned polypeptides, Para. [0028]) comprising a nucleotide sequence (corresponding nucleic acid sequence, Para. [0042]); a vector comprising a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence (For example, a nucleic acid molecule (e.g., a vector) encoding a HSA-GDF15/GDF15 mutein fusion protein may be introduced into a cell, Para. [0185]); a host cell comprising a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence (coding sequence is operably linked to a regulatory element (e.g., a promoter) that is from a genetic origin different from that of the coding sequence (e.g., to provide for expression in a host cell of interest, Para. [0091]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.