

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390024 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.05

(51) Int. Cl. C07K 14/64 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.16

(54) ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ СЛИТЫЕ ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ РЕЛАКСИНА И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/040,250

(32) 2020.06.17

(33) US

(86) PCT/EP2021/066309

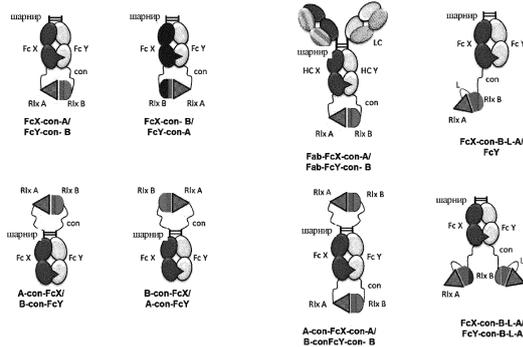
(87) WO 2021/255127 2021.12.23

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Сермадирас Изабелль, Папворт
Моника Анна, Патерсон Джуди
Кристиан, Мартин Эстер Мари, Ке
Пэн (GB)

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

(57) Изобретение относится к гетеродимерным слитым полипептидам релаксина, в частности, к гетеродимерным слитым полипептидам релаксина 2, и путям их применения. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены слитые полипептиды релаксина, молекулы нуклеиновой кислоты, векторы, клетки-хозяева, фармацевтические композиции и наборы, содержащие их, и пути их применения, в том числе способы лечения. Полипептиды и композиции по настоящему изобретению могут быть применимы, в частности, в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, например, для лечения сердечной недостаточности.



A1

202390024

202390024

A1

Гетеродимерные слитые продукты на основе релаксина и пути их применения

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 11 июня 2021 г., имеет название 201011(PCT)_SL.txt, и ее размер составляет 236203 байт.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гетеродимерным слитым продуктам на основе релаксина и путям их применения. В частности, настоящее изобретение относится к слитым продуктам на основе релаксина-2 и путям их применения.

Уровень техники

Релаксин представляет собой пептидный гормон, который относится к суперсемейству инсулина. У людей семейство пептида релаксина включает семь пептидов с высоким структурным сходством, но низким сходством последовательностей: релаксин 1, 2 и 3 и инсулиноподобные пептиды INSL3, INSL4, INSL5 и INSL6. Встречающиеся в природе релаксины состоят из полипептидных цепей А и В, ковалентно связанных двумя межцепочечными дисульфидными связями. Цепь А имеет дополнительную внутрицепочечную дисульфидную связь. Гены релаксина кодируют прогормоны со структурой В-С-А (полипептидные цепи В и А, связанные пептидом С). Прогормон подвергается эндопротеолитическому расщеплению с помощью ферментов PC1 и PC2 для удаления пептида С перед секрецией зрелого релаксина.

Релаксин представляет собой плеiotропный гормон, который, как известно, опосредует изменения системной гемодинамики и адаптивные изменения почечной функции во время беременности. Также было показано, что релаксин характеризуется противоишемическими свойствами и характеризуется полезными эффектами при сердечной недостаточности, например, в случае острой декомпенсированной сердечной недостаточности (ADHF). Сердечная недостаточность ассоциирована со значительной заболеваемостью и смертностью. Она характеризуется сложным ремоделированием тканей, включая повышенную гибель кардиомиоцитов и интерстициальный фиброз. Релаксин активирует ряд сигнальных каскадов, которые, как было показано, являются благоприятными в условиях ишемии-реперфузии и сердечной недостаточности. Эти сигнальные пути включают активацию фосфоинозитид-3-киназного пути и активацию сигнального пути оксида азота (Bathgate RA *et al.* (2013) *Physiol. Rev.* 93(1): 405-480; Mentz RJ *et al.* (2013) *Am.*

Heart J. 165(2): 193-199; Tietjens J *et al.* (2016) *Heart* 102: 95-99; Wilson SS *et al.* (2015) *Pharmacology* 35: 315-327).

Клинические испытания были проведены с применением немодифицированного рекомбинантного человеческого релаксина-2, серелаксина. Непрерывное внутривенное введение серелаксина госпитализированным пациентам снижало маркеры сердечного, почечного и печеночного повреждения и застоя (Felker GM *et al.* (2014) *J. Am. Coll. Cardiol.* 64(15): 1591-1598; Metra M *et al.* (2013) *J. Am. Coll. Cardiol.* 61(2): 196-206; Teerlink JR *et al.* (2013) *Lancet* 381(9860): 29-39). Однако вследствие быстрого выведения серелаксина из кровообращения пациентов терапевтические эффекты были ограниченными, и положительные эффекты быстро исчезали, как только прекращалась внутривенная инъекция. В дополнение, примерно одна треть пациентов испытывали значительное падение артериального давления (>40 мм рт. ст.) после получения серелаксина внутривенно, в результате чего дозу потребовалось снизить наполовину или даже больше.

В WO 2013/004607 и WO 2018/138170 описаны полипептиды рекомбинантного релаксина, в которых релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь с помощью линкерного пептида. В WO2013/004607 описан рекомбинантный релаксин с линкерным пептидом, состоящим из по меньшей мере пяти аминокислот и менее чем 15 аминокислот. В WO 2018/138170 описан рекомбинантный релаксин с линкерным пептидом, состоящим из по меньшей мере 15 аминокислот.

Учитывая многообещающие клинические исследования, проводимые на настоящий момент с немодифицированным рекомбинантным релаксином, остается потребность в дополнительных рекомбинантных релаксинах, которые сохраняют биологическую активность релаксина и обеспечивают такие преимущества, как увеличенный период полувыведения и удобное дозирование.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к гетеродимерным слитым продуктам, характеризующимся активностью релаксина.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) первый домен гетеродимеризации, соединенный с по меньшей мере одним полипептидом цепи А релаксина или его вариантом; и
- (ii) второй домен гетеродимеризации, соединенный с по меньшей мере одним полипептидом цепи В релаксина или его вариантом,

где первый домен гетеродимеризации гетеродимеризуется со вторым доменом гетеродимеризации, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.

В некоторых вариантах осуществления цепь А релаксина и цепь В релаксина ковалентно связаны одной или несколькими (например, двумя) межцепочечными связями, предпочтительно одной или несколькими (например, двумя) межцепочечными дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления цепь А релаксина и цепь В релаксина не связаны ковалентно друг с другом с помощью аминокислотного линкера.

В некоторых вариантах осуществления цепь А релаксина представляет собой цепь А релаксина-2, а цепь В релаксина представляет собой цепь В релаксина-2.

В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации получены из Fc-области иммуноглобулина, например, Fc-области иммуноглобулина G (IgG) (“первая Fc-область” и “вторая Fc-область”). Первая и вторая Fc-области могут содержать константные домены CH2 и/или CH3. Предпочтительно первая и вторая Fc-области содержат CH2 и CH3.

В альтернативных вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации получены из Fab-области иммуноглобулина.

В еще одних альтернативных вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации гетеродимеризуются с образованием параллельных суперспиралей.

В некоторых вариантах осуществления цепь А релаксина соединена с первым доменом гетеродимеризации (например, первой Fc-областью) посредством соединительного элемента, и цепь В релаксина соединена со вторым доменом гетеродимеризации (например, второй Fc-областью) посредством соединительного элемента. В предпочтительных вариантах осуществления один или предпочтительно оба соединительных элемента представляют собой полипептиды.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один соединительный элемент представляет собой полипептид с длиной, составляющей от 6 до 40 аминокислот. Предпочтительно оба соединительных элемента представляют собой полипептиды с длиной, составляющей от 6 до 40 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере один соединительный элемент представляет собой полипептид с длиной, составляющей 21 аминокислоту. В особенно предпочтительных вариантах осуществления оба соединительных элемента представляют собой полипептиды с длиной, составляющей 21 аминокислоту. В определенных вариантах осуществления оба соединительных элемента имеют последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS [SEQ ID NO: 5].

В предпочтительных вариантах осуществления С-конец первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области) соединен с N-концом цепи А релаксина, и С-конец второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области) соединен с N-концом цепи В релаксина. В альтернативных вариантах осуществления N-конец первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области) соединен с С-концом цепи А релаксина, и N-конец второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области) соединен с С-концом цепи В релаксина.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации (например, первая и вторая Fc-области) содержат содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации и/или модификации, предпочтительно асимметричные содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации и/или модификации. В предпочтительных вариантах осуществления содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации представляют собой мутации по типу “Fc-выступ” и “Fc-впадина”. В особенно предпочтительных вариантах осуществления мутации по типу “Fc-выступ” и “Fc-впадина” присутствуют в доменах СНЗ. В предпочтительных вариантах осуществления первая Fc-область содержит мутации по типу “Fc-выступ”, а вторая Fc-область содержит мутации по типу “Fc-впадина”. В качестве альтернативы первая Fc-область имеет мутации по типу “Fc-впадина”, а вторая Fc-область имеет мутации по типу “Fc-выступ”. Предпочтительно содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации предусматривают мутации по типу “Fc-впадина”, Y349C, T366S, L368A и Y407V или их консервативные замены, в одном домене СНЗ; и мутации по типу “Fc-выступ”, S354C и T366W или их консервативные замены, в другом домене СНЗ, где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat.

В вариантах осуществления любого аспекта настоящего изобретения полипептид цепи А релаксина-2 содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, или ее вариант, и полипептид цепи В релаксина-2 содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина-2 содержит аминокислотную мутацию K9H.

Также в настоящем изобретении предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) слитый полипептид FcX-con-A и
- (ii) слитый полипептид FcY-con-B,

где

А представляет собой цепь А релаксина или ее вариант, например, цепь А релаксина-2 или ее вариант;

В представляет собой цепь В релаксина или ее вариант, например, цепь В релаксина-2 или ее вариант;

FcY представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1) с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-впадина”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями Y349C:T366S:L368A:Y407V или их консервативными заменами;

FcX представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1) с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-выступ”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями S354C:T366W или их консервативными заменами; и

сop представляет собой соединительный элемент, например соединительный полипептид, предпочтительно имеющий последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS [SEQ ID NO: 5],

где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat, где FcX гетеродимеризуется с FcY, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления гетеродимерный слитый продукт содержит слитый полипептид с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 11 и слитый полипептид с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта настоящего изобретения гетеродимерный слитый продукт дополнительно содержит один или несколько Fab, где необязательно гетеродимерный слитый продукт содержит один Fab, связанный с N-концом первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области), и второй Fab, связанный с N-концом второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области).

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта настоящего изобретения гетеродимерный слитый продукт дополнительно содержит полипептид второй цепи А релаксина или его вариант, соединенные с N-концом первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области), и полипептид второй цепи В релаксина или его вариант, соединенные с N-концом второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области), где необязательно вторая цепь А релаксина соединена с первым доменом гетеродимеризации (например, первой Fc-областью) посредством соединительного полипептида, и вторая цепь В релаксина соединена со вторым доменом гетеродимеризации (например, второй Fc-областью) посредством соединительного полипептида.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) FcX-B-L-A и FcY, необязательно FcY-B-L-A; или
- (ii) FcY-B-L-A и FcX, необязательно FcX-B-L-A;

где

FcY представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1) с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-впадина”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями Y349C:T366S:L368A:Y407V или их консервативными заменами;

FcX представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1) с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-выступ”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями S354C:T366W или их консервативными заменами;

B представляет собой цепь B релаксина или ее вариант, например, цепь B релаксина-2 или ее вариант;

A представляет собой цепь A релаксина или ее вариант, например, цепь A релаксина-2 или ее вариант; и

L представляет собой линкерный полипептид, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGSGGGSGG [SEQ ID NO: 60],

где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat, где FcX гетеродимеризуется с FcY, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина. В качестве альтернативы FcX и FcY представляют собой отличные от Fc домены гетеродимеризации, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления цепь B релаксина соединена с FcX и/или FcY посредством соединительного элемента, необязательно соединительного полипептида с длиной, составляющей от 6 до 40 аминокислот, например, длиной, составляющей 21 аминокислоту.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) FcX-A-L-B и FcY, необязательно FcY-A-L-B; или
- (ii) FcY-A-L-B и FcX, необязательно FcX-A-L-B;

где

FcY представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1) с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-впадина”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями Y349C:T366S:L368A:Y407V или их консервативными заменами;

FcX представляет собой Fc-область иммуноглобулина (например, IgG1) с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-выступ”,

предпочтительно содержащую домен СНЗ с аминокислотными мутациями S354C:T366W или их консервативными заменами;

A представляет собой цепь A релаксина или ее вариант, например, цепь A релаксина-2 или ее вариант;

B представляет собой цепь B релаксина или ее вариант, например, цепь B релаксина-2 или ее вариант; и

L представляет собой линкерный полипептид, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGSGGGSGG [SEQ ID NO: 60],

где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat, где FcX гетеродимеризуется с FcY, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина. В качестве альтернативы FcX и FcY представляют собой отличные от Fc домены гетеродимеризации, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления цепь A релаксина соединена с FcX и/или FcY посредством соединительного элемента, необязательно соединительного полипептида с длиной, составляющей от 6 до 40 аминокислот, например, длиной, составляющей 21 аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта настоящего изобретения соотношение активности релаксина гетеродимерного слитого продукта относительно активности релаксина эталонного белка релаксина составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 10.

В родственных аспектах настоящего изобретения предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты (например, молекулы ДНК), кодирующие гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению, векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, клетки-хозяева, содержащие вектор или нуклеиновую кислоту, и способы получения гетеродимерных слитых продуктов по настоящему изобретению путем культивирования клеток-хозяев и сбора слитого белка.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению, набор, содержащий его, и пути применения гетеродимерного слитого продукта в терапии, в том числе способы лечения субъекта с сердечной недостаточностью.

Аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения изложены в прилагаемой формуле изобретения. Эти и другие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения также описаны в данном документе.

Краткое описание фигур и перечня последовательностей

На **фиг. 1** показаны иллюстративные форматы гетеродимерных слитых продуктов в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. Формат

каждого слитого полипептида гетеродимерного слитого продукта представлен в терминах FcX, FcY, A, B, con и L, где FcX (“Fc-выступ”) и FcY (“Fc-впадина”) представляют собой две Fc-области, содержащие содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации и/или модификации; A (“Rlx A”) и B (“Rlx B”) представляют собой полипептиды цепи A релаксина и цепи B релаксина; “con” представляет собой соединительный полипептид; L представляет собой линкерный полипептид; HC X и HC Y – тяжелые цепи антитела; LC – легкая цепь антитела, шарнир – шарнирная область антитела, и Fab представляет собой Fab-фрагмент антитела.

На **фиг. 2** показан LC-MS анализ RELAX0019 и RELAX0023: А) анализ дегликозилированных RELAX0019 и RELAX0023 в невозстанавливающих условиях, демонстрирующий массу интактных молекул; В) анализ дегликозилированных RELAX0019 и RELAX0023 в восстанавливающих условиях, демонстрирующий массы отдельных Fc-слитых цепей - выступ-цепь A релаксина и впадина-цепь B релаксина.

На **фиг. 3** показан анализ С-концевого пептида RELAX0019 и RELAX0023 с помощью пептидного картирования в невозстанавливающих условиях с применением LC-MS. Аминокислотная последовательность С-концевого пептида с прогнозируемыми дисульфидными связями, представленными линиями, показана на верхней панели. Панели А и Е - экстракционная ионная хроматограмма С-концевого пептида в отсутствие восстанавливающего средства (-DTT). Панели С и G - подвергнутый деконволюции масс-спектр С-концевого пептида в отсутствие восстанавливающего средства. Панели В и F - экстракционная ионная хроматограмма в присутствии восстанавливающего средства (+DTT), и панели D и H - подвергнутый деконволюции масс-спектр в присутствии восстанавливающего средства. На фиг. 3 раскрыты SEQ ID NO 75, 77 и 76 соответственно, в порядке появления.

На **фиг. 4** показана биологическая активность *in vitro* некоторых гетеродимерных слитых продуктов по настоящему изобретению, измеренная посредством индуцирования cAMP в клетках, экспрессирующих рекомбинантный человеческий RXFP1.

На **фиг. 5** показаны фармакокинетические (PK) профили *in vivo* из серии экспериментов ELISA, в которых гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению вводили мышам внутривенно. Данные нормализованы как % cMax в момент времени 5 минут (T1).

На **фиг. 6** показано устранение индуцированных изопротеренолом фиброза и гипертрофии сердца у мышей, обработанных с помощью RELAX0019 и RELAX0023. Показаны уровни фиброза и гипертрофии в случае применения (1) среды-носителя (исходный уровень), (2) изопротеренола, (3) изопротеренола + релаксина-2, (4) изопротеренола + RELAX0019 и (5) изопротеренола + RELAX0023.

На **фиг. 7** показано неспецифическое связывание *in vitro* гетеродимерных слитых продуктов по настоящему изобретению в анализе ELISA на основе бакуловируса (BV).

На **фиг. 8** показан процентное значение потери чистоты, агрегации и фрагментации RELAX0023, RELAX0127 и RELAX0128 в растворе при хранении.

На **фиг. 9** показана стабильность RELAX0023, RELAX0127 и RELAX0128 в растворе с течением времени, оцененная с помощью LC-MS анализа в восстанавливающих условиях: А) общие ионные хроматограммы; В) масс-спектры восстановленных молекул.

На **фиг. 10** показан РК-профиль RELAX0023 у яванских макаков после внутривенной и подкожной инъекций.

На **фиг. 11** показаны нуклеотидные последовательности, кодирующие некоторые из полипептидов по настоящему изобретению (SEQ ID NO 80-140 соответственно, в порядке появления).

Таблица 1. Перечень последовательностей. Верхняя шарнирная область выделена курсивом, релаксин А подчеркнут, релаксин В подчеркнут дважды, Fc-область выделена жирным шрифтом.

SEQ ID NO:	Конструкция	Аминокислотная последовательность
1	Релаксин А	<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</u>
2	Релаксин В	<u><u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u></u>
3	FcH01	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
4	FcK01	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>

5	Con01	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS
6	Con02	PAPAPAPAPAPAPAPAPAG
7	RELAX 0009	<u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u> GGGGSGGGGSGGGGSQLYS <u>ALANKCCHVGCTKRSLARFCAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</u> ACP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
8	RELAX 0010	<i>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</i> HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGGSGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGGGSG GGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
9	Rlx011	<i>GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</i> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLAR FC
10	Rlx011b	<i>GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</i> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLAR FC
11	Rlx011D D	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</i> HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS

		DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</u>
12	Rlx012	GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARF</u> <u>C</u>
13	Rlx012b	GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARF</u> <u>C</u>
14	Rlx012D D	DKTHICPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGM</u> <u>STWS</u>
15	Rlx013	GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG</u> <u>MSTWS</u>
16	Rlx013b	GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

		DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG <u>MSTWS</u>
17	Rlx013D D	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</i> HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
18	Rlx014	<i>GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</i> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG <u>MSTWS</u>
19	Rlx014b	<i>GGAGGACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</i> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG <u>MSTWS</u>
20	Rlx014D D	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</i> HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMST <u>WS</u>
21	Rlx020	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</i> HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

		DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
22	Rlx021	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGGS</i> <u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u>
23	Rlx022	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
24	Rlx023	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGGS</i> <u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u>
25	Rlx024	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
26	Rlx025	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGGS</i> <u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u>
27	Rlx026	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</i>

		DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAPAPAPAPAPAPAPAPAPAGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
28	Rlx027	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG APAPAPAPAPAPAPAPAGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTW <u>S</u></i>
29	Rlx028	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AAPAPAPAPAPAPAGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
30	Rlx029	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAAPAPAPAPAPAGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</i>
31	Rlx030	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAPAPAPAPAGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
32	Rlx031	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS</i>

		GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG APAPAPAPAGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
33	Rlx041E	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANECCHVGCTKRSLARFC</i>
34	Rlx041H	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANHCCHVGCTKRSLARFC</i>
35	Rlx041L	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANLCCHVGCTKRSLARFC</i>
36	Rlx041 M	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANMCCHVGCTKRSLARFC</i>
37	Rlx044E	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKESLARFC</i>
38	Rlx044H	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH</i>

		<p>QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKHSLARFC</u></p>
39	Rlx051A	<p><i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLAAFC</u></i></p>
40	Rlx051I	<p><i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLAIFC</u></i></p>
41	Rlx051 M	<p><i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLAMF</u> <u>C</u></i></p>
42	Rlx051Q	<p><i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLAQFC</u></i></p>
43	Rlx051S	<p><i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS</i></p>

		DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLASFC
44	Rlx052E	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLAREC</i>
45	Rlx052I	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARIC</i>
46	Rlx055	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS <u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGM STWS</u>GGGSGGGSGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
47	Rlx056	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS <u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMST WS</u>GGGSGGGSGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
48	Rlx061H	<u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u>AAAGGGGSGGGGSGGGGGS GGGGSACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS

		REEMTKNQVLSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
49	Rlx062K	<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGG</u> SACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
50	Rlx076	<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCAAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGG</u> SACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</u>
51	Rlx077	<u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSAAAGGGGSGGGGSGGGGS</u> GGGGSACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS REEMTKNQVLSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVILKCGRELVRAQIAICG MSTWS
52	Rlx014D Ddel2aa	DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVLSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVILKCGRELVRAQIAICGMST
53	Rlx014D Ddel3aa	DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE

		EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMS
54	R347L	ELVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSKRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGQAEDEADYYCSSYSSST LVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQTHEGSTVEKTVAPTECS
55	R347Rlx 011DD	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCTTSGFTFNTYAMSWVRQAPGKGLEW LSGINNNGRTAFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQINSLRADDTA VYF CAKDVRFIAVPGDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
56	R347Rlx 014DD	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCTTSGFTFNTYAMSWVRQAPGKGLEW LSGINNNGRTAFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQINSLRADDTA VYF CAKDVRFIAVPGDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSG GGGGSSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

57	RELAX 0126	<i>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGSPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGGSGGGSGSWMEEVIK LCGRELVRAQIAICGMSTWS</i>
58	RELAX 0127	<i>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGSGGSPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGGSGGGSGSWMEE VIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</i>
59	RELAX 0128	<i>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGSGGSGGSPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGGSGGGSGSW MEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</i>
60	Линкер 01	GGGSGGGSGG
61	Rlx052A	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGSGGGGGSGGGGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARAC</i>
62	Цепь B RELAX 0013	<i><u>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</u></i>

63	Цепь A RELAX 0013	<u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</u>
64	Цепь B RELAX 0014	MRVSEEWMDGFIRMCGREYARELIKICGASVGR
65	Цепь A RELAX 0014	ESGGLMSQQCCHVGCRRRSIAKLYC
66	Rlx042R	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS</i> <u>QLYSALANKCCRVGCTKRSLARFC</u>
67	Rlx014d	<i>DKTHTACPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS</i> <u>SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGM STWS</u>
68	Rlx051Y	<i>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS</i> <u>QLYSALANKCCHVGCTKRSLAYFC</u>

Подробное описание

Релаксин

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере отчасти, на обнаружении того, что гетеродимерные слитые продукты, описанные в данном документе, могут проявлять активность релаксина, когда цепь А релаксина и цепь В релаксина не связаны ковалентно друг с другом с помощью аминокислотного линкера. Это является неожиданным, исходя из раскрытий WO 2013/004607 и WO 2018/138170, в которых описан рекомбинантный

релаксин, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь. Авторы настоящего изобретения дополнительно обнаружили, что гетеродимеризация доменов гетеродимеризации индуцирует правильный фолдинг и гетеродимеризацию цепи А релаксина и цепи В релаксина (см. пример 2). Помимо этого, в отличие от белков релаксина дикого типа для биологической активности слитых полипептидов по настоящему изобретению не требуется эндопротеолитический процессинг.

Используемый в данном документе термин “гетеродимерный слитый продукт” относится к гетеродимеру из слитых полипептидов, где один слитый полипептид содержит первый домен гетеродимеризации, соединенный с первой субъединицей гетеродимерного белка (например, цепью А релаксина), и другой слитый полипептид содержит второй домен гетеродимеризации, соединенный со второй субъединицей гетеродимерного белка (например, цепью В релаксина).

Гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению могут содержать полипептиды цепей А и В релаксина из группы релаксинов, выбранных от релаксина-1, релаксина-2 и релаксина-3. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина по настоящему изобретению представляет собой полипептид цепи А релаксина-2 или его вариант; и полипептид цепи В релаксина по настоящему изобретению представляет собой полипептид цепи В релаксина-2 или его вариант. В конкретных вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина предусматривает полипептид цепи А человеческого релаксина-2 или его вариант и полипептид цепи В человеческого релаксина-2 или его вариант.

Термины “цепь”, “полипептид” и “пептид” могут использоваться взаимозаменяемо в данном документе для обозначения цепи из двух или более аминокислот, связанных посредством пептидных связей.

В некоторых вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина-2 имеет последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, или ее вариант и полипептид цепи В релаксина-2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или ее вариант. Варианты могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, делеций и/или вставок. В некоторых вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина-2 содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, выбранных из K9E, K9H, K9L, K9M, R18E, R18H, R22A, R22I, R22M, R22Q, R22S, R22Y, F23E, F23A и F23I. В предпочтительном варианте осуществления цепь А релаксина-2 содержит аминокислотную мутацию K9H.

Варианты цепей А и В релаксина известны из уровня техники. Помимо этого, специалистам в данной области техники доступны рекомендации по конструированию

вариантов цепей А и В релаксина. Например, будет понятно, что варианты могут сохранять те аминокислоты, которые требуются для функции релаксина. Например, варианты цепи В релаксина-2 могут содержать консервативный мотив Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile (Claasz AA *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269(24): 6287-6293) или Arg-X-X-X-Arg-X-X-Val (Bathgate RA *et al.* (2013) *Physiol Rev.* 93(1): 405-480). Варианты могут содержать одну или несколько аминокислотных замен и/или вставок. Например, варианты цепи В релаксина-2 могут иметь одну или несколько дополнительных аминокислот, например, K30 и R31 и N-концевые V-2, A-1 и M-1 по сравнению с SEQ ID NO: 62. В качестве альтернативы или дополнения варианты могут содержать одну или несколько аминокислотных производных. Например, первая аминокислота вариантов цепи В релаксина-2 может представлять собой пироглутамат.

В предпочтительных вариантах осуществления цепь А релаксина и цепь В релаксина ковалентно связаны двумя межцепочечными дисульфидными связями (см. пример 2).

Релаксиновое семейство пептидов опосредует свои биологические эффекты, по меньшей мере отчасти, посредством активации сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR) и последующей стимуляции или ингибирования сигнального пути cAMP с помощью субъединицы белка Gs или Gi соответственно. Как известно, релаксин-2 активирует GPCR RXFP1 (также известный как LGR7) и в меньшей степени GPCR RXFP2 (также известный как LGR8), таким образом стимулируя зависимый от Gs-cAMP сигнальный путь, что приводит к увеличению уровня молекулы вторичного мессенджера cAMP.

Используемый в данном документе термин "активность релаксина" относится к способности молекулы релаксина связываться с рецептором релаксина, и/или активировать указанный рецептор релаксина, и/или инициировать сигнальный каскад внутри клетки. В вариантах осуществления, в которых активность релаксина представляет собой активность релаксина-2, активность релаксина может относиться к способности связываться и/или активировать рецептор RXFP1 и/или RXFP2. Термин "активность релаксина" может использоваться взаимозаменяемо с "биологической активностью".

Активность релаксина можно определять путем измерения связывания молекулы релаксина с рецептором релаксина и/или путем измерения явлений ниже по сигнальному пути от связывания с рецептором релаксина.

Активность релаксина можно определять *in vitro* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления активность релаксина определяют *in vitro*.

Активность релаксина можно определять путем измерения количества и/или присутствия молекулы, расположенной ниже по сигнальному пути от активации релаксином рецептора. Например, активность релаксина можно определять путем

измерения выработки cAMP после активации релаксином рецептора. Способы выявления индуцированного релаксином образования cAMP известны из уровня техники. Такие способы включают анализы ELISA для cAMP, HTRF для cAMP и анализ HitHunter®cAMP. В некоторых вариантах осуществления активность релаксина определяют путем измерения индуцированной релаксином выработки cAMP с помощью анализа HTRF для cAMP, например, осуществленного в примере 3. Также активность релаксина можно определять путем измерения выработки оксида азота (NO) после активации релаксином рецептора. Также активность релаксина можно определять путем измерения степени активации молекулы, расположенной ниже по сигнальному пути от активации релаксином рецептора. Например, активность релаксина можно определять путем измерения активации p42/44 MAPK.

В качестве альтернативы или дополнения активность релаксина можно определять путем измерения активации известного целевого гена релаксина. Например, активность релаксина можно определять путем измерения активации транскрипции известного целевого гена релаксина, VEGF, в клетках THP-1. Способы определения активации транскрипции гена известны из уровня техники и включают количественный ПЦР-анализ мРНК. Относительную экспрессию мРНК VEGF можно измерять с помощью количественной ПЦР в реальном времени при индуцировании транскриптов VEGF после инкубации клеток THP-1 с релаксином, как описано в Xiao *et al.* (2013) *Nat Commun.* 4: 1953.

В качестве альтернативы или дополнения активность релаксина можно определять путем измерения одного или нескольких эффектов релаксина ниже по сигнальному пути. Например, снижение гипертрофии сердца можно измерять с помощью эхокардиографии, измерения массы левого желудочка относительно массы тела и/или длины большеберцовой кости в соответствии со стандартными способами. В другом примере активность релаксина можно определять путем измерения снижения фиброза с помощью трихромного окрашивания по Массону. В другом примере активность релаксина можно определять путем измерения модуляции метаболизма соединительной ткани, такой как ингибирование профибротических факторов (таких как TGF-бета), подавление пролиферации и дифференцировки фибробластов и/или активация опосредованного MMP разрушения внеклеточного матрикса (Bathgate RA *et al.* (2013) *Physiol Rev.* 93(1): 405-480).

В некоторых вариантах осуществления активность релаксина определяют путем измерения устранения индуцированных изопротеренолом гипертрофии (измеренной как масса сердца относительно длины большеберцовой кости) и фиброза сердца (измеренного как содержание коллагена относительно массы сердца), например, осуществленного в примере 7.

Активность гетеродимерных слитых продуктов по настоящему изобретению можно определять относительно эталонного белка релаксина. В некоторых вариантах осуществления эталонный белок релаксина представляет собой рекомбинантный белок. В предпочтительных вариантах осуществления эталонный белок релаксина представляет собой белок релаксина, имеющий комплект из цепи А релаксина и цепи В релаксина зрелого белка релаксина. Рекомбинантные релаксины, имеющие комплект из цепи А релаксина и цепи В релаксина зрелого белка релаксина являются коммерчески доступными. Например, рекомбинантный человеческий релаксин-2, мышинный релаксин-1 и INSL3 доступны от R&D Systems (номера по каталогу 6586-RN, 6637-RN и 4544-NS соответственно).

В некоторых вариантах осуществления эталонный белок релаксина имеет такие же цепи А и В релаксина, что и гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению, или отличается от цепей А и В релаксина гетеродимерного слитого продукта по настоящему изобретению не более чем 10 аминокислотами, например, 1 или 2 аминокислотами. В некоторых вариантах осуществления первая аминокислота цепи В эталонного релаксина-2 представляет собой D, и эта аминокислота удалена в цепи В релаксина гетеродимерного слитого продукта по настоящему изобретению.

Эталонный белок релаксина может быть выбран из:

- (i) рекомбинантного человеческого релаксина-2 (упоминаемого в данном документе как RELAX0013); и
- (ii) рекомбинантного мышинного релаксина-1 (упоминаемого в данном документе как RELAX0014); и
- (iii) рекомбинантного Fc-слитого релаксина-2, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь, и где Fc является продлевающей период полувыведения Fc-областью (упоминаемого в данном документе как RELAX0010 и описанного в WO2018/138170); и
- (iv) рекомбинантного Fc-слитого релаксина-2, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь, и где Fc является продлевающей период полувыведения Fc-областью (упоминаемого в данном документе как RELAX0009 и описанного в WO2018/138170); и
- (v) рекомбинантного Fc-слитого релаксина-2, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь (упоминаемого в данном документе как RELAX0126 и описанного в WO 2013/004607); и

- (vi) рекомбинантного Fc-слитого релаксина-2, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь (упоминаемого в данном документе как RELAX0127 и описанного в WO 2013/004607); и
- (vii) рекомбинантного Fc-слитого релаксина, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь (упоминаемого в данном документе как RELAX0128 и описанного в WO 2013/004607).

В особенно предпочтительных вариантах осуществления эталонный белок релаксина представляет собой белок релаксина-2, имеющий комплект из цепи А релаксина-2 и цепи В релаксина-2 зрелого белка релаксина-2, раскрытого под номером доступа UniProtKB/Swiss-Prot P04090.1.

Может считаться, что гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению характеризуются активностью релаксина, если они демонстрируют по меньшей мере долю активности эталонного белка релаксина. Например, может считаться, что слитый полипептид характеризуется активностью релаксина, если он характеризуется по меньшей мере половиной активности эталонного белка релаксина. Может считаться, что гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению характеризуется активностью релаксина, если соотношение активности указанного слитого полипептида относительно активности эталонного белка релаксина составляет от приблизительно 10^{-5} до приблизительно 1, от приблизительно 10^{-4} до приблизительно 1, от приблизительно 10^{-3} до приблизительно 1, от приблизительно 10^{-2} до приблизительно 1, от приблизительно 1/50 до приблизительно 1, от приблизительно 1/20 до приблизительно 1, от приблизительно 1/15 до приблизительно 1, от приблизительно 1/10 до приблизительно 1, от приблизительно 1/5 до приблизительно 1 или от приблизительно $\frac{1}{2}$ до приблизительно 1. В качестве альтернативы может считаться, что гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению характеризуется активностью релаксина, если соотношение активности указанного слитого полипептида относительно активности эталонного белка релаксина составляет от приблизительно 1 до 10^5 , от приблизительно 1 до 10^4 , от приблизительно 1 до приблизительно 10^3 , от приблизительно 1 до приблизительно 100, от приблизительно 1 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 20, от приблизительно 1 до приблизительно 15, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 5 или от приблизительно 1 до приблизительно 2.

В некоторых вариантах осуществления активность релаксина гетеродимерного слитого продукта относительно активности релаксина эталонного белка релаксина составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 10.

Активность релаксина можно определять как значение EC50. Используемый в данном документе термин "EC50" (полуМаксимальная эффективная концентрация) относится к эффективной концентрации терапевтического соединения, которая индуцирует ответ посередине между исходным уровнем и максимумом после указанного времени воздействия.

Домены гетеродимеризации

Гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению содержат первый домен гетеродимеризации и второй домен гетеродимеризации. В предпочтительных вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации получены из Fc-области иммуноглобулина.

Термин "Fc-область" определяет C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая может быть получена за счет расщепления папаином интактного антитела. Fc-область иммуноглобулина обычно содержит два константных домена, домен CH2 и домен CH3, и необязательно домен CH4.

Первая и вторая Fc-области могут содержать домены CH2 и/или CH3 иммуноглобулина. В предпочтительных вариантах осуществления первая и вторая Fc-области содержат домены CH2 и CH3 иммуноглобулина.

Fc-область можно получить из иммуноглобулина (например, IgG) любого вида, предпочтительно человека (например, человеческого IgG). В вариантах осуществления, в которых Fc-область получена из IgG, Fc-область может быть получена из IgG любого подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), предпочтительно IgG1. Предпочтительно первая и вторая Fc-области получены из человеческого иммуноглобулина IgG1. В других вариантах осуществления первая и вторая Fc-области получены из человеческого иммуноглобулина IgG4.

В предпочтительных вариантах осуществления первая и вторая Fc-области содержат содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации и/или модификации. Такие модификации могут включать введение асимметричных комплементарных модификаций в каждую из первой и второй Fc-областей так, чтобы обе цепи состыковывались друг с другом и, таким образом, были способны образовать гетеродимер, но каждая цепь не была бы способна димеризоваться сама с собой. Такие модификации могут охватывать вставки, делеции, консервативные и неконсервативные замены и реаранжировки. Включение таких модификаций обеспечивает способ увеличения выхода гетеродимеров, вырабатываемых в культуре рекомбинантных клеток, по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Первая и вторая Fc-области могут содержать любые содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации и/или модификации, известные из уровня техники. Комбинацию модификаций можно применять для максимального увеличения эффективности сборки при минимизации влияния на стабильность антитела.

В способе "выступ-во впадину" гетеродимеризации можно содействовать путем введения стерического затруднения между контактирующими остатками. "Выпячивание" получают путем замены одной или нескольких небольших боковых цепей аминокислот на поверхности контакта одной Fc-области ("Fc-выступ") на более крупные боковые цепи (например, тирозина или триптофана). Компенсационные "полости" с размером, идентичным или сходный с большой(-ими) боковой(-ыми) цепью(-ями), создают на поверхности контакта другой Fc-области ("Fc-впадина") путем замены аминокислоты с большими боковыми цепями на аминокислоты, имеющие меньшие цепи (например, аланин или валин). Модификации "выступ-во-впадину" подробно описаны, например, в Ridgway JB *et al.* (1996) *Protein Eng.* 9(7) 617-621; Merchant AM *et al.* (1998) *Nat. Biotechnol.* 16(7): 677-681.

Другие модификации, которые можно применять для получения гетеродимеров, включают без ограничения модификации, которые создают благоприятные электростатические взаимодействия между двумя Fc-областями. Например, одну или несколько положительно заряженных аминокислот можно вводить в одну Fc-область, а одну или несколько отрицательно заряженных аминокислот можно вводить в соответствующее положение в другой Fc-области. В качестве альтернативы или дополнения Fc-области можно модифицировать для включения мутаций, которые вводят остатки цистеина, способные образовать дисульфидную связь. В качестве альтернативы или дополнения Fc-области могут содержать одну или несколько модификаций в гидрофильные или гидрофобные остатки на поверхности контакта между цепями, чтобы сделать образование гетеродимера более энтропически и энтальпически благоприятным, чем образование гомодимера.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления содействующие гетеродимеризации аминокислотные остатки и/или модификации создают стерическое затруднение между контактирующими остатками (например, за счет подхода "выступ-во-впадину"), создают благоприятные электростатические взаимодействия между двумя Fc-областями, вводят остатки цистеина, способные образовать дисульфидную связь, и/или модифицируют гидрофильные и гидрофобные остатки на поверхности контакта между двумя Fc-областями.

В предпочтительных вариантах осуществления содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации представляют собой мутации по типу “Fc-выступ” и “Fc-впадина”. В предпочтительных вариантах осуществления мутации по типу “Fc-выступ” и “Fc-впадина” присутствуют в доменах СН3.

В некоторых вариантах осуществления первая и вторая Fc-области получены из человеческого иммуноглобулина IgG1 и содержат “Fc X” и “Fc Y” с мутациями в доменах СН3, где мутации в “Fc X” и “Fc Y” выбраны из комбинаций, изложенных в таблице 2 (или их консервативны замен).

Таблица 2. Мутации в “Fc X” и “Fc Y”

№ комбинации	Мутация (-ии) в Fc X*	Мутация (-ии) в Fc Y*
1	D399C	K392C
2	D399S	K392S
3	Y349C	S354C
4	Y349C	E356C
5	Y349C	E357C
6	L351C	S354C
7	T394C	V397C
8	T366W	T366S:L368A:Y407V
9	T366W:D399C	T366S:L368A:K392C:Y407V
10	T366W:K392C	T366S:0099C:L368A:Y407V
11	S354C:T366W	Y349C:T366S:L368A:Y407V
12	Y349C:T366W	S354C:T366S:L368A:Y407V
13	E356C:T366W	Y349C:T366S:L368A:Y407V
14	Y349C:T366W	E356C:T366S:L368A:Y41J7V
15	E357C:T366W	Y349C :T366S:L368A:Y407V
16	Y349C:T366W	E357C:T366S:L368A:Y407V
17	S364H/F405A	Y349T/T394F
18	T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
19	K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
20	K409D/K392D	D399K/E356K
21	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
22	K360E/K409W/Y349C	Q347R/D399V/F405T/S354C
23	K370E/K409W	E357N/D399V/F405T
24	T366Y	Y407T

*где нумерация аминокислот приведена в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

В предпочтительных вариантах осуществления “Fc Y” представляет собой “Fc-впадина” с мутациями Y349C, T366S, L368A и Y407V или их консервативными заменами; и “Fc X” представляет собой “Fc-выступ” с мутациями S354C и T366W или их консервативными заменами, где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat.

Термин "EU-индекс согласно Kabat" относится к системе нумерации человеческого антитела IgG1 EU, описанной в Kabat EA *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service. National Institutes of Health. Bethesda, MD. Все положения аминокислот, на которые ссылаются в настоящей заявке, относятся к положениям согласно EU-индексу.

В некоторых вариантах осуществления первая Fc-область имеет мутации по типу “Fc-впадина”, а вторая Fc-область имеет мутации по типу “Fc-выступ”. В альтернативных или предпочтительных вариантах осуществления первая Fc-область имеет мутации по типу “Fc-выступ”, а вторая Fc-область имеет мутации по типу “Fc-впадина”.

Будет понятно, что Fc-области могут дополнительно содержать другие аминокислотные модификации относительно Fc-области дикого типа. Fc-область можно модифицировать, например, для увеличения аффинности молекулы IgG в отношении FcRn. В WO 02/060919 раскрыты модифицированные иммуноглобулины, содержащие Fc-область с одной или несколькими аминокислотными модификациями, и она включена посредством ссылки в данный документе со всей своей полнотой. Способы получения Fc-областей с одной или несколькими аминокислотными модификациями известны из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая Fc-области могут содержать одну или несколько аминокислотных модификаций для снижения или отмены эффекторной функции Fc-области. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации снижают или преодолевают цитотоксичность, например, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая Fc-области могут содержать одну или несколько аминокислотных модификаций для увеличения периода полувыведения гетеродимерного слитого продукта.

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая Fc-области содержат по меньшей мере одну из следующих комбинаций аминокислотных мутаций:

- (i) M252Y, S254T и T256E или их консервативные замены;
- (ii) L234F, L235Q и K322Q или их консервативные замены;
- (iii) L234F, L235E и P331S или их консервативные замены;

(iv) M252Y, S254T, T256E, L234F, L235Q и K322Q или их консервативные замены,
или

(v) M252Y, S254T, T256E, L234F, L235E и P331S или их консервативные замены,
где нумерация аминокислот приведена в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая Fc-области могут содержать аминокислотные мутации L234F, L235E и P331S или их консервативные замены, где нумерация аминокислот приведена в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область, содержащая мутации по типу “Fc-впадина”, имеет последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 3, или ее варианты, и Fc-область, содержащая мутации по типу “Fc-выступ”, имеет последовательность, изложенную под SEQ ID NO:4, или ее варианты.

В некоторых вариантах осуществления Fc-области содержат вариант SEQ ID NO: 3, к котором аминокислотная мутация Y349C возвращена обратно в Y349, и вариант SEQ ID NO: 4, в котором аминокислотная мутация S354C возвращена обратно в S354, так что Fc-области не способны образовать стабилизирующую дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления Fc-области содержат вариант SEQ ID NO: 3 и/или вариант SEQ ID NO: 4, где первые пять остатков DKTHTCPPC (SEQ ID NO: 69) модифицированы. В некоторых вариантах осуществления данную область заменяют последовательностью DKTHTACPPC (SEQ ID NO: 70). В альтернативных вариантах осуществления данную область заменяют последовательностью GGAGGACPPC (SEQ ID NO: 71). В альтернативных вариантах осуществления данную область заменяют последовательностью ACPCC (SEQ ID NO: 72).

В альтернативных вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации получены из Fab-области иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления домены гетеродимеризации содержат области CH1 и CL. Было обнаружено, что Fab-области, содержащие цепи L и Fd, опосредуют эффективную гетеродимеризацию (Schoonjans R *et al.* (2000) J. Immunol. 165 (12): 7050-7057). Таким образом, в альтернативных вариантах осуществления домены гетеродимеризации содержат цепи L и Fd. В некоторых вариантах осуществления цепи L и Fd гетеродимеризуются для образования гетеродимера, стабилизированного дисульфидным мостиком.

В еще одних альтернативных вариантах осуществления первый и второй домены гетеродимеризации гетеродимеризуются с образованием параллельных суперспиралей. Гетеродимерные суперспирали описаны, например, в Aronsson *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5: 14063. В некоторых вариантах осуществления домены гетеродимеризации содержат

аминокислотные мутации и/или модификации для предупреждения образования сборок с нежелательным фолдингом и/или содействия образованию параллельных суперспиралей.

Первый и второй домены гетеродимеризации (например, первая и вторая Fc-область) могут образовывать фрагмент, продлевающий период полувыведения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению характеризуются продленным периодом полувыведения по сравнению с эталонным релаксином.

Используемый в данном документе термин "период полувыведения" используется для обозначения времени, необходимого для снижения концентрации слитого белка в плазме крови до 50% от ее исходного уровня. "Период полувыведения" белка в плазме крови может зависеть от различных факторов, таких как размер белка, его стабильность, его скорость выведения, скорость циркуляции, протеолитическое расщепление *in vivo*, скорость абсорбции организмом или специфическими тканями и т. д. Способы определения периода полувыведения белков известны из уровня техники и описаны в разделе "Примеры" ниже.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению с первым и вторым доменами гетеродимеризации, полученными из Fc иммуноглобулина, характеризуются периодом полувыведения, составляющим по меньшей мере 5 часов в мышинных моделях (см. пример 6). Для сравнения период полувыведения человеческого релаксина-2 после IV введения составляет приблизительно 0,09 +/- 0,04 часа, т. е. 5,4 +/- 2,4 минуты у людей (Chen SA *et al.* (1993) *Pharm. Res.* 10(6): 834-838).

Будет признаваться, что продленный период полувыведения является преимущественный, поскольку он позволяет вводить терапевтические белки в соответствии с безопасной и удобной схемой введения доз, например, в более низких дозах, которые можно вводить менее часто. Более того, достижение более низких доз может обеспечить дополнительные преимущества, такие как обеспечение улучшенного профиля безопасности и/или активацию нескольких механизмов действия *in vivo*.

Соединительные элементы

Одна или обе из цепей А и В релаксина могут быть соединены со своими соответствующими доменами гетеродимеризации посредством соединительного полипептида. В некоторых вариантах осуществления цепь А релаксина соединена с первым доменом гетеродимеризации (например, первой Fc-областью) посредством соединительного полипептида, и цепь В релаксина соединена со вторым доменом гетеродимеризации (например, второй Fc-областью) посредством соединительного полипептида.

Соединительный полипептид может быть любой подходящей длины, например, длина составляет от приблизительно 6 до 40 аминокислот, предпочтительно от приблизительно 6 до 21 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления длина соединительного полипептида составляет по меньшей мере 6 аминокислотных остатков, предпочтительно по меньшей мере 11 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина соединительного полипептида составляет менее 40 аминокислот. Соединительные полипептиды разной или одинаковой длины можно применять для каждого плеча гетеродимерных слитых продуктов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления длина по меньшей мере одного соединительного полипептида составляет 21 аминокислоту. В предпочтительных вариантах осуществления длина обоих соединительных полипептидов составляет 21 аминокислоту. Соединительные полипептиды могут иметь любую аминокислотную последовательность. Соединительные полипептиды с разными или одинаковыми аминокислотным составами можно применять для каждого плеча гетеродимерных слитых продуктов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления один или предпочтительно оба соединительных полипептида содержат повторы пролина и аланина (PA)_x (SEQ ID NO: 73), где предпочтительно x составляет от 3 до 15, где предпочтительно длина соединительного полипептида превышает 16 аминокислот, где предпочтительно соединительный полипептид состоит из 21-аминокислотной последовательности PARAPARAPARAPARAPAG (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления один или предпочтительно оба соединительных полипептида содержат повторы глицина и серина, такие как полипептиды, описанные в Chen X *et al.* (2013) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 65(10): 1357-1369. В некоторых вариантах осуществления один или оба соединительных полипептида содержат мотив (GGGS)_n (SEQ ID NO: 74), где n может составлять от 1 до 8, например, где n составляет 4. В некоторых вариантах осуществления один или несколько соединительных полипептидов состоят из 21-аминокислотной последовательности GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 5). В определенных вариантах осуществления оба соединительных полипептида состоят из 21-аминокислотной последовательности GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления один соединительный полипептид содержит повторы пролина и аланина, как описано в данном документе, а другой соединительный полипептид содержит повторы глицина и серина, как описано в данном документе.

В качестве альтернативы одна или обе цепи А и В релаксина могут быть соединены с их соответствующими доменами гетеродимеризации с помощью синтетического соединительного полипептида, такого как полимерная цепь полиэтиленгликоля (PEG). Таким образом, цепь А релаксина может быть соединена с первым доменом гетеродимеризации (например, первой Fc-областью) посредством синтетического соединительного элемента, такого как полимерная цепь полиэтиленгликоля (PEG), и цепь В релаксина может быть соединена со вторым доменом гетеродимеризации (например, второй Fc-областью) посредством синтетического соединительного элемента, такого как полимерная цепь полиэтиленгликоля (PEG), где синтетический соединительный элемент может быть ковалентно или нековалентно присоединен к домену гетеродимеризации (например, Fc-области). Пегилирование, которое представляет собой процесс присоединения полимерных цепей PEG к молекуле, можно осуществлять в соответствии со способами, известными из уровня техники.

Стабильность

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению характеризуются неожиданной превосходной физической и химической стабильностью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению характеризуются превосходной физической и/или химической стабильностью по сравнению с эталонным белком релаксина.

Физическую стабильность релаксина можно определять путем измерения чистоты и агрегации, например, с помощью HP-SEC, как в примере 9. Химическую стабильность релаксина можно определять путем измерения фрагментации и модификации молекулы, например, с помощью LC-MS, как в примере 9.

Неожиданно авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению характеризуются превосходной физической и химической стабильностью по сравнению с рекомбинантным Fc-слитым релаксином, в котором релаксин А и релаксин В слиты в одну цепь (в отличие от релаксина А и В в отдельных слитых полипептидах). В WO 2013/004607 описаны рекомбинантные одноцепочечные слитые полипептиды релаксина, слитые с Fc-областью иммуноглобулина, например, слитые полипептиды, упоминаемые в данном документе как RELAX0127 и RELAX0128. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению характеризуются превосходной физической и/или химической стабильностью по сравнению с RELAX0127 и RELAX0128.

Гетеродимерный слитый продукт может содержать фрагмент, продлевающий период полувыведения, в дополнение к первому и второму доменам гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полувыведения, представляет собой белковый фрагмент, продлевающий период полувыведения. Белковый фрагмент, продлевающий период полувыведения, может быть выбран из группы, состоящей из Fc-области иммуноглобулина, альбуминсвязывающего домена и сывороточного альбумина. В дополнительных вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полувыведения, представляет собой химическое соединение, которое не является белком или пептидом, такое как полимерная цепь полиэтиленгликоля (PEG).

Фрагмент, продлевающий период полувыведения, может быть присоединен на N-конце или C-конце первого или второго домена гетеродимеризации. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полувыведения, присоединен на N-конце первого или второго домена гетеродимеризации. В других вариантах осуществления фрагмент, продлевающий период полувыведения, присоединен на C-конце первого или второго домена гетеродимеризации. Способы присоединения фрагмента, продлевающего период полувыведения, к гетеродимерному слитому продукту известны из уровня техники. Например, фрагмент, продлевающий период полувыведения, может быть присоединен с помощью химической конъюгации или рекомбинантной технологии. Фрагмент, продлевающий период полувыведения, может быть присоединен к гетеродимерному слитому продукту непосредственно или посредством соединительного элемента (например, соединительного полипептида). Применение соединительного полипептида может быть особенно подходящим, когда слитый полипептид содержит белковый фрагмент, продлевающий период полувыведения, такой как Fc-область.

Иллюстративные варианты осуществления

Гетеродимерные слитые продукты по настоящему изобретению могут иметь различные форматы и/или последовательности.

Термины “слитый полипептид по настоящему изобретению” и “слитые полипептиды по настоящему изобретению” можно использовать для обозначения первого домена гетеродимеризации, слитого с цепью А релаксина, и/или второго домена гетеродимеризации, слитого с цепью В релаксина. Слитые полипептиды по настоящему изобретению могут представлять собой рекомбинантные слитые полипептиды, т. е. которые были созданы с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

В предпочтительных вариантах осуществления C-конец первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области) соединен с N-концом цепи А релаксина,

и С-конец второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области) соединен с N-концом цепи В релаксина. В некоторых вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина и/или полипептид цепи В релаксина имеют свободный С-конец.

В альтернативных вариантах осуществления N-конец первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области) соединен с С-концом цепи А релаксина, и N-конец второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области) соединен с С-концом цепи В релаксина. В некоторых вариантах осуществления полипептид цепи А релаксина и/или полипептид цепи В релаксина имеют свободный N-конец.

Гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению может дополнительно содержать один или несколько Fab. В некоторых вариантах осуществления гетеродимерный слитый продукт содержит один Fab, связанный с N-концом первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области), и второй Fab, связанный с N-концом второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области).

Гетеродимерный слитый продукт по настоящему изобретению может дополнительно содержать полипептид второй цепи А релаксина или его вариант и полипептид второй цепи В релаксина или его вариант. В некоторых вариантах осуществления полипептид второй цепи А релаксина или его вариант соединены с N-концом первого домена гетеродимеризации (например, первой Fc-области), и полипептид второй цепи В релаксина или его вариант соединены с N-концом второго домена гетеродимеризации (например, второй Fc-области), где необязательно вторая цепь А релаксина соединена с первым доменом гетеродимеризации (например, первой Fc-областью) посредством соединительного элемента (например, соединительного полипептида), и вторая цепь В релаксина соединена со вторым доменом гетеродимеризации (например, второй Fc-областью) посредством соединительного элемента (например, соединительного полипептида).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления формат гетеродимерного слитого продукта выбран из:

- (i) FcX-con-A/ FcY-con-B (например, см. фигуру 1);
- (ii) FcX-con-B/ FcY-con-A (например, см. фигуру 1);
- (iii) A-con-FcX/ B-con-FcY (например, см. фигуру 1);
- (iv) B-con-FcX/ A-con-FcY (например, см. фигуру 1);
- (v) Fab-FcX-con-A/ Fab-FcY-con-B (например, см. фигуру 1);
- (vi) Fab-FcX-con-B/ Fab-FcY-con-A;
- (vii) A-con-FcX-con-A/ B-con-FcY-con-B (например, см. фигуру 1);
- (viii) B-con-FcX-con-B/ A-con-FcY-con-A;

- (ix) FcX-con-B-L-A и FcY, необязательно FcY-con-B-L-A (например, см. фигуру 1);
- (x) FcY-con-B-L-A и FcX, необязательно FcX-con-B-L-A;
- (xi) FcX-con-A-L-B и FcY, необязательно FcY-con-A-L-B; и
- (xii) FcY-con-A-L-B и FcX, необязательно FcX-con-A-L-B,

где

FcY представляет собой Fc-область иммуноглобулина с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-впадина”, предпочтительно содержащую домен СН3 с аминокислотными мутациями Y349C:T366S:L368A:Y407V или их консервативными заменами;

FcX представляет собой Fc-область с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-выступ”, предпочтительно содержащую домен СН3 с аминокислотными мутациями S354C:T366W или их консервативными заменами;

“con” представляет собой соединительный полипептид;

B представляет собой цепь B релаксина или ее вариант;

A представляет собой цепь A релаксина или ее вариант; и

L представляет собой линкерный полипептид, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 60).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) X-B-L-A и Y, необязательно Y-B-L-A; или
- (ii) Y-B-L-A и X, необязательно X-B-L-A,

где

X и Y представляют собой домены гетеродимеризации, описанные в данном документе;

B представляет собой цепь B релаксина или ее вариант, например, цепь B релаксина-2 или ее вариант;

A представляет собой цепь A релаксина или ее вариант, например, цепь A релаксина-2 или ее вариант; и

L представляет собой линкерный полипептид, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 60),

где X гетеродимеризуется с Y, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) X-A-L-B и Y, необязательно Y-A-L-B, или

(ii) Y-A-L-B и X, необязательно X-A-L-B,

где

X и Y представляют собой домены гетеродимеризации, описанные в данном документе;

A представляет собой цепь A релаксина или ее вариант, например, цепь A релаксина-2 или ее вариант;

B представляет собой цепь B релаксина или ее вариант, например, цепь B релаксина-2 или ее вариант; и

L представляет собой линкерный полипептид, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGSGGGSGG (SEQ ID NO: 60),

где X гетеродимеризуется с Y, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления гетеродимерный слитый продукт содержит слитые полипептиды Rlx011DD, изложенный под SEQ ID NO: 11, и Rlx014DD, изложенный под SEQ ID NO: 20. В альтернативных предпочтительных вариантах осуществления гетеродимерный слитый продукт содержит слитые полипептиды Rlx013DD, изложенный под SEQ ID NO: 17, и Rlx012DD, изложенный под SEQ ID NO: 14.

В аспекте настоящего изобретения предусмотрены гетеродимерные слитые продукты, содержащие комбинацию слитых полипептидов, выбранную из комбинаций FcX и FcY, изложенных в таблице 3.

Таблица 3. Комбинации слитых полипептидов в гетеродимерных слитых продуктах по настоящему изобретению

Гетеродимерный слитый продукт	Слитый полипептид FcX (выступ)*	Слитый полипептид FcY (впадина)*
RELAX0019	Rlx011	Rlx014
RELAX0020	Rlx013	Rlx012
RELAX0021	Rlx011b	Rlx014b
RELAX0022	Rlx12b	Rlx13b
RELAX0023	Rlx011DD	Rlx014DD
RELAX0024	Rlx013DD	Rlx012DD
RELAX0034	Rlx041H	Rlx014d
RELAX0039	Rlx041M	Rlx014DD
RELAX0040	Rlx041L	Rlx014DD
RELAX0041	Rlx041H	Rlx014DD
RELAX0043	Rlx041E	Rlx014DD
RELAX0046	Rlx042R	Rlx014DD

RELAX0052	Rlx044E	Rlx014DD
RELAX0053	Rlx044H	Rlx014DD
RELAX0054	Rlx028	Rlx029
RELAX0055	Rlx030	Rlx031
RELAX0056	Rlx026	Rlx027
RELAX0063	Rlx052A	Rlx014DD
RELAX0069	Rlx051M	Rlx014DD
RELAX0070	Rlx051I	Rlx014DD
RELAX0071	Rlx051Q	Rlx014DD
RELAX0072	Rlx051A	Rlx014DD
RELAX0073	Rlx051Y	Rlx014DD
RELAX0074	Rlx051S	Rlx014DD
RELAX0075	Rlx052I	Rlx014DD
RELAX0076	Rlx052E	Rlx014DD
RELAX0081	Rlx020	Rlx021
RELAX0082	Rlx022	Rlx023
RELAX0083	Rlx024	Rlx025
RELAX0084	Rlx026	Rlx014DD
RELAX0085	Rlx011DD	Rlx027
RELAX0086	Rlx020	Rlx014DD
RELAX0087	Rlx011DD	Rlx021
RELAX0088	Rlx055	FcH01
RELAX0091	Rlx062K	Rlx061H
RELAX0105	Rlx020	Rlx027
RELAX0106	Rlx022	Rlx027
RELAX0107	Rlx024	Rlx027
RELAX0109	Rlx020	Rlx029
RELAX0110	Rlx022	Rlx029
RELAX0111	Rlx024	Rlx029
RELAX0117	Rlx076	Rlx077
RELAX0122	Rlx055	Rlx056
RELAX0123	Rlx011DD	Rlx014DDdel2aa
RELAX0124	Rlx011DD	Rlx014DDdel3aa
RELAX0130**	R347Rlx011DD	R347Rlx014DD

*Последовательности перечисленных слитых полипептидов изложены в таблице 1.

**В этом конкретном варианте осуществления гетеродимерный слитый продукт представляет собой IgG и содержит дополнительный полипептид, соответствующий легкой цепи, изложенной под SEQ ID NO: 54

В одном аспекте предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий слитые полипептиды, изложенные под SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 20.

В альтернативном аспекте предусмотрен гетеродимерный слитый продукт, содержащий слитые полипептиды, изложенные под SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 14.

Слитые полипептиды по настоящему изобретению можно получать с помощью любого способа, известного из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды по настоящему изобретению получают путем рекомбинантной экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, в клетке-хозяине.

Способы, которые известны специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Подходящие векторы включают, например, плазмиды, фагмиды, фаги или вирусные векторы.

Векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, можно перемещать в клетку-хозяина с помощью традиционных методик. Подходящие клетки-хозяева известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих, такие как клетки НЕК293 или клетки СНО.

Трансфицированные клетки можно культивировать с помощью традиционных методик для получения слитых полипептидов по настоящему изобретению.

После получения слитого полипептида по настоящему изобретению, например, за счет рекомбинантной экспрессии, его можно очистить с помощью любого способа, известного из уровня техники. Иллюстративные методики очистки белка включают хроматографию (например, ионообменную, аффинную и/или эксклюзионную колоночную хроматографию), центрифугирование и дифференциальную растворимость. В настоящем изобретении предусмотрены выделенные слитые полипептиды, которых были отделены от культуры клеток, необязательно с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Терапевтические способы

Слитые полипептиды по настоящему изобретению можно обеспечивать в виде фармацевтической композиции.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества известны из уровня техники, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (Joseph P. Remington, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), которая включена в данный документ во всей своей полноте.

Настоящее изобретение охватывает виды терапии, которые включают введение слитых полипептидов по настоящему изобретению животному, в частности млекопитающему, например человеку, для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или инфекцией.

Соответственно, слитые полипептиды или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут применяться в терапии, например, для лечения заболевания или нарушения. Также предусмотрен способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту или пациенту, нуждающимся в этом, терапевтически эффективного количества слитых полипептидов по настоящему изобретению. Применение или способ могут включать введение терапевтически эффективной схемы, которая характеризуется менее частыми дозами слитых полипептидов по настоящему изобретению, чем терапевтически эффективная схема введения доз молекулы релаксина дикого типа.

Будет понятно, что слитые полипептиды по настоящему изобретению можно применять в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, например, для лечения сердечной недостаточности.

Используемый в данном документе термин "сердечная недостаточность" включает острую сердечную недостаточность, хроническую сердечную недостаточность (CHF) и острую декомпенсированную сердечную недостаточность. Термин "сердечная недостаточность" также может включать более специфические диагнозы, такие как сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечная недостаточность с промежуточной фракцией выброса или сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFrEF).

Слитые полипептиды по настоящему изобретению также можно применять для лечения заболевания почек, заболевания легкого и фиброзных нарушений, например, фиброзных нарушений почки, сердца, легкого и печени, а также при заживлении ран (Sherwood OD (2004) *Endocrine Reviews* 25(2): 205-234). Слитые полипептиды по настоящему изобретению также можно применять для устранения инсулинорезистентности у пациентов с диабетом (Bonner JS *et al.* (2013) *Diabetes* 62(9):3251-3260). Слитые полипептиды по настоящему изобретению также можно применять при различных формах легочной гипертензии. Слитые полипептиды по настоящему изобретению также можно применять при нарушениях, которые являются результатом или причиной артериальной ригидности, снижения артериальной эластичности, снижения податливости и растяжимости сосудистой стенки артерий, в том числе гипертензии, заболевании почек, заболевании периферических артерий, заболевании сонных артерий и цереброваскулярном заболевании (т. е. инсульте

или деменции), диабете, микрососудистых заболеваниях, приводящих к ишемическому повреждению органов, ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности.

Слитые полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению подходят для парентерального введения субъекту или пациенту. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент представляют собой млекопитающее, в частности человека.

Человеческий релаксин-2 дикого типа характеризуется периодом полувыведения *in vivo*, составляющим минуты. Как следствие, его следует вводить путем непрерывной внутривенной инфузии госпитализированным пациентам, и он вызывает серьезные побочные эффекты, в том числе падение артериального давления. Напротив, будет понятно, что варианты осуществления слитых полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно вводить субъекту или пациенту с помощью инъекции, такой как внутривенная, подкожная или внутримышечная инъекция. В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды и/или фармацевтические композиции вводятся с помощью подкожной инъекции. Введение с помощью инъекции, такой как подкожная инъекция, обеспечивает преимущество лучшего комфорта для субъекта или пациента и возможность введения субъекту или пациенту вне стационарных условий. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид и/или фармацевтическую композицию вводятся с помощью самостоятельного введения.

В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды по настоящему изобретению характеризуются увеличенным периодом полувыведения по сравнению с релаксином дикого типа, что позволяет снижать общую экспозицию на основе молярной концентрации. Например, слитые полипептиды по настоящему изобретению можно вводить менее часто, чем релаксин дикого типа, таким образом обеспечивая более удобную схему введения доз.

В настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий фармацевтические композиции по настоящему изобретению. Набор может содержать пакет, содержащий фармацевтические композиции по настоящему изобретению и инструкции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению составлены в однодозовых флаконах или системе контейнер/укупорка (например, предварительно заполненном шприце). Необязательно, с таким контейнером(-ами) может быть ассоциировано уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, и такое уведомление отражает одобрение агентством изготовления, применения или продажи для введения человеку.

Используемые в данном документе формы единственного числа могут относиться к одному или более чем одному (например, к по меньшей мере одному) грамматическому объекту предмета.

"Приблизительно" в целом может означать приемлемую степень погрешности для измеренного количества с учетом характера или точности измерений. Иллюстративные степени погрешности находятся в пределах процентов (%), как правило, в пределах 10% и более типично в пределах 5% от заданного значения или диапазона значений.

Варианты осуществления, описанные в данном документе как "содержащие" один или несколько признаков, также могут считаться как раскрытие соответствующих вариантов осуществления, "состоящих из" таких признаков.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США, Европейской Фармакопее или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, и более конкретно у людей.

Значения концентрации, количества, объемов, процентной доли и другие числовые значения могут быть представлены в данном документе в формате диапазона. Также следует понимать, что такой формат диапазона применяют только для удобства и краткости, и его следует интерпретировать свободно, чтобы он включал не только числовые значения, явно упомянутые в качестве пределов диапазона, но также включал все отдельные числовые значения или поддиапазоны, охватываемые в пределах такого диапазон, как если бы каждое числовое значение и поддиапазон упоминались явным образом.

Вышеуказанные варианты осуществления следует понимать как иллюстративные примеры. Подразумеваются дополнительные варианты осуществления. Следует понимать, что любой признак, описанный в связи с любым вариантом осуществления, можно применять отдельно или в комбинации с другими описанными признаками и также можно применять в комбинации с одним или несколькими признаками любого другого из вариантов осуществления или любой комбинацией любых других вариантов осуществления. Кроме того, эквиваленты и модификации, не описанные выше, также можно использовать без отклонения от объема настоящего изобретения, который определен в прилагаемой формуле изобретения.

В контексте настоящего изобретения другие примеры и вариации слитых полипептидов и способов, описанных в данном документе, будут очевидны специалисту в данной области техники.

Другие примеры и вариации находятся в пределах объема настоящего изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения. Каждый из всех документов, цитируемых в данном документе, полностью включен в данный документ посредством ссылки, в том числе все данные, таблицы, фигуры и текст, представленные в цитируемых документах.

Примеры

Пример 1. Получение рекомбинантных гетеродимерных слитых белков Fc-релаксин-2

Слитые белки Fc-релаксин-2, описанные в данном документе, были сконструированы с применением свойств гетеродимеризации Fc-доменов по типу выступ-во-впадину (Fc-выступ и Fc-впадина), чтобы индуцировать правильный фолдинг и гетеродимеризацию цепей А и В релаксина-2.

Более точно, цепи А и В релаксина-2 были генетически слиты с двумя комплементарными Fc (на N- и/или C-конце Fc) посредством соединительных элементов, как проиллюстрировано на фиг. 1. Затем клетки CHO трансфицировали совместно двумя векторами экспрессии, каждый из которых содержал один Fc-цепь релаксина (А и/или В). Два комплементарных Fc-фрагмента собираются внутри клеток CHO и, таким образом, облегчают сборку и правильный фолдинг релаксина-2. Как продемонстрировано в следующем примере 2, затем между комплементарными Fc-цепями и между цепью А и цепью В образуются дисульфидные связи, воссоздавая естественную структуру релаксина-2.

Гетеродимерные слитые белки Fc-релаксин-2 секретируются в надосадочную жидкость, затем их очищали с применением автоматизированной системы с помощью аффинной хроматографии, где Fc-область белка связывается с материалом колонки.

Пример 2. LC-MS анализ гетеродимеров Fc-релаксин-2 по типу выступ-во-впадину

LC-MS анализ проводили как на невосстановленных, так и восстановленных дегликозилированных гетеродимерах Fc-релаксин-2. Для осуществления дегликозилирования образцы разводили до 1 мг/мл и забуферивали при pH 7,80 с применением 10 mM Tris-Cl. К образцу добавляли PNGазу F (Roche) в концентрации, составляющей 1 единицу фермента на 50 мкг Fc-релаксин-2, и инкубировали на протяжении ночи при 37°C. Для анализа в невосстанавливающих условиях образец разводили до 0,05 мг/мл в воде и 20 мкл загружали в сертифицированный для LC-MS флакон с полным извлечением вещества с крышкой, снабженной предварительно прорезанной мембраной (номер по каталогу Waters 186005663CV). Для анализа в восстанавливающих условиях добавляли 10 mM TCEP и образец инкубировали при 37°C в течение дополнительных 30 минут перед анализом.

Эксперименты проводили с применением ACQUITY I-Class UPLC, сопряженного с прибором Xevo G2-XS Q-TOF (Waters, Милфорд, Массачусетс, США), оба управляемые с применением системы научной информации UNIFI. В случае LC-системы растворителем А была вода с 0,1% муравьиной кислоты, а растворителем В был ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (обе степени чистоты для UPLC-MS, BioSolve). УФ-детектор устанавливали на измерение при длинах волны, составляющих 220 нм и 280 нм, и флаконы помещали в камеру для образца с поддержанием температуры 4°C. Объем, составляющий 1 мкл, инъецировали в ВЕН С4 колонку для обращенно-фазовой UPLC белка от ACQUITY, колонка с порами 300Å (номер по каталогу Waters: 186004495), и белки элюировали с применением возрастающего градиента растворителя В от 5% до 75% на протяжении 6 минут.

Масс-спектрометр калибровали в диапазоне 500-5000 масса/заряд путем инфузии 2 мкг/мкл натрия йодида в 50% 2-пропаноле, а веществом с фиксированной массой был 200 пг/мкл раствор лейцин-энкефалин. Прибор эксплуатировали в режиме положительной ионизации и режиме анализатора чувствительности со следующими ключевыми настройками: напряжение на капилляре = 3,0 В; напряжение на пробоотборном конусе = 40 В; температура источника = 120°C; температура десольватации = 450°C; газовый поток в конусе = 120 л/час; газовый поток десольватации = 1000 л/час; диапазон изменения массы = 500-5000 масса/заряд, время сканирования = 1,0 с.

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения UNIFI. Спектры комбинировали, исходя из времени удерживания в хроматограмме, когда элюировался представляющий интерес белок. Из сырых данных вычитали фон и выполняли деконволюцию с применением алгоритма MaxEnt1 для больших молекул. Экспериментальные данные сравнивали с массой теоретических последовательностей, в которых учитывались дисульфидные связи для анализа в невозстанавливающих условиях и свободные остатки цистеина для анализа в восстанавливающих условиях. Дезамидирование аспарагина (+1 Да) также учитывали после дегликозилирования с помощью PNGазы F.

LC-MS анализ подтвердил, что между комплементарными Fc-цепями и между цепью А и цепью В образуются дисульфидные связи, воссоздавая естественную структуру релаксина-2. На фиг. 2А в качестве примера показаны данные LC-MS для RELAX0019 и RELAX0023. Анализ в невозстанавливающих условиях подтвердил образование гетеродимеров с ожидаемыми массами для RELAX0019 и RELAX0023, составляющими 58932 Да и 59361 Да соответственно, гомодимеры не были обнаружены. Анализ в восстанавливающих

условиях (фиг. 2В) подтвердил идентичность последовательности обеих цепей и продемонстрировал, что в них не было модификаций.

Картирование пептидов в невозстанавливающих условиях для идентификации дисульфидных связей

Гетеродимерный белок Fc-релаксин (50 мкг) помещали в чистую пробирку для образцов и разводили в 17 мкл 100 мМ фосфата натрия с рН 7,0. Алкилирование свободных остатков цистеина достигалось путем добавления 0,5 мкл 5 мг/мл йодацетамида с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 20 минут. После алкилирования добавляли дополнительные 2,5 мкл 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,0, и 2,5 мкл хлорида натрия. Белок денатурировали путем добавления 40 мкл 8,0 М гуанидина HCl и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Разведения достигали путем добавления 125 мкл 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,0, с последующим добавлением 0,5 мкл 40 мМ EDTA. Эндопротеиназу Lys-C (Wako Chemicals) растворяли в воде при концентрации, составляющей 1 мг/мл, и добавляли 5 мкл к Fc-релаксину-2. Расщепление проводили при 37°C в течение 2 часов, после чего добавляли дополнительные 5 мкл Lys-C и инкубацию продолжали в течение дополнительных 2 часов. Для пептидного анализа 42,5 мкл образца переносили во флакон для UPLC и добавляли 2,5 мкл воды. Для восстановления дисульфидных связей к другой 42,5 мкл аликвоте образца добавляли 2,5 мкл 500 мМ DTT и оставляли при комнатной температуре в течение 15 минут до LC-MS анализа.

Анализ пептидов проводили с применением ACQUITY I-Class UPLC, сопряженного с прибором Xevo G2-XS Q-TOF (Waters, Милфорд, Массачусетс, США), оба управляемые с применением системы научной информации UNIFI. В случае LC-системы растворителем А была вода с 0,1% муравьиной кислоты, а растворителем В был ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (обе степени чистоты для UPLC-MS, BioSolve). УФ-детектор устанавливали на измерение при длине волны, составляющей 214 нм, и флаконы помещали в камеру для образца с поддержанием температуры 4°C. Объем, составляющий 10 мкл, инъецировали в ВЕН C18 колонку для обращенно-фазовой хроматографии ACQUITY с порами 300 Å (номер по каталогу Waters: 186003687) и белки элюировали с применением возрастающего градиента растворителя В от 5% до 37% в течение 73,5 минуты и затем повышали до 60% В на протяжении дополнительных 2,5 минуты. После 77,5 минуты колонку выдерживали при 95% В в течение 5 минут.

Масс-спектрометр калибровали в диапазоне 100-2600 масса/заряд путем инфузии 2 мкг/мкл натрия йодида в 50% 2-пропаноле, а веществом с фиксированной массой был 200 пг/мкл раствор лейцин-энкефалин. Прибор эксплуатировали в режиме положительной

ионизации и режиме анализатора чувствительности со следующими ключевыми настройками: напряжение на капилляре = 3,0 В; напряжение на пробоотборном конусе = 25 В; температура источника = 100 °С; температура десольватации = 250 °С; газовый поток в конусе = 0 л/час; газовый поток десольватации = 500 л/час; диапазон изменения массы = 100-2600 масса/заряд, время сканирования = 0,5 с.

Данные обрабатывали в программном обеспечении UNIFI путем импорта последовательности с ожидаемыми дисульфидными связями и выполнения поиска в отношении совпадающих полученных пептидов с Lys-C. Хроматограммы, полученные в отсутствие и в присутствии восстанавливающего средства, накладывали, чтобы убедиться, что идентифицированные пептиды с дисульфидными связями после восстановления больше не наблюдались.

Идентифицировали пептид, совпадающий по ожидаемой массе с пептидом релаксина-2 с дисульфидными связями, включающим обе цепи А и В, изображенный в верхней части фиг. 3 (SLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQLYSALANKCCHVGCTK=LCGRELVRAQIAICGMSTWS=RSLARFC (SEQ ID NO 75-77 соответственно), ожидаемая масса, включая 3 дисульфидные связи, 6836,23 Да). На фиг. 3 (А-Д) показана идентификация этого пептида для RELAX0019 и подтверждение того, что пептид больше не наблюдался при добавлении восстанавливающего средства: на панелях А и В показаны экстракционные ионные хроматограммы в отсутствие или присутствии DTT, а на панелях С и D показаны соответствующий масс-спектр пептида. На фиг. 3 (Е-Н) показана идентификация такого же пептида для RELAX0023 и подтверждение того, что пептид больше не наблюдался при добавлении восстанавливающего средства: на панелях Е и F показаны экстракционные ионные хроматограммы в отсутствие или присутствии DTT, а на панелях G и H показаны соответствующие масс-спектры пептида. Эти данные подтверждают, что цепи А и В релаксина взаимодействуют посредством дисульфидных связей в пределах гетеродимеров RELAX0019 и RELAX0023.

Пример 3. Активность *in vitro* слитых белков Fc-релаксин-2 (клеточный анализ активности cAMP)

Слитые полипептиды релаксина-2, полученные, как описано выше, тестировали в отношении биологической активности, например, стимуляции одного или нескольких ответов клеточных рецепторов, с помощью следующих способов.

Стабильные линии клеток, экспрессирующие человеческий или мышинный рецепторы, разработанные из клеток CHO, приобретали у DiscoverX:

- линия клеток cAMP Hunter™ CHO-K1 RXFP1 Gs (номер по каталогу DiscoverX 95-0127C2);

- линия клеток cAMP Hunter™ CHO-K1 RXFP2 Gs (номер по каталогу DiscoverX 95-0140C2);
- линия клеток cAMP Hunter™ CHO-K1 mRXFP1 Gs (номер по каталогу DiscoverX 95-0180C2).

Активация этих рецепторов приводит к расположенной ниже по сигнальному пути выработке вторичного мессенджера cAMP, которую можно измерить в анализе функциональной активности.

Традиционные анализы на cAMP проводили с применением буфера для анализа на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA): сбалансированный солевой раствор Хенкса (Sigma № H8264), дополненный 0,1% BSA (Sigma № A9418) и 0,5 мМ IBMX (Sigma № I7018), доведенный до pH 7,4 с помощью 1 М NaOH.

Замороженную криопробирку с клетками, экспрессирующими представляющий интерес рецептор, быстро размораживали на водяной бане, переносили в предварительно нагретую среду для клеток и центрифугировали при 240 x g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали в среде для клеток при оптимизированной концентрации (например, hRXFP1 из расчета $3,33 \times 10^4$ клеток/мл) и 30 мкл суспензии клеток добавляли в покрытые поли-D-лизином 384-луночные планшеты (Greiner № 781946) и оставляли для прикрепления на протяжении ночи. На следующий день среду вытряхивали из планшетов и замещали с помощью 5 мкл буфера для анализа. К клеткам добавляли серийные разведения тестовых образцов рекомбинантного пептида или слитого продукта Fc для получения одиннадцати точек данных с применением бесконтактного жидкостного дозатора (ECHO™, Labcyte). Все разведения образцов получали в двух повторностях. В каждую лунку добавляли дополнительный буфер для анализа в объеме 5 мкл и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Уровни cAMP измеряли с применением коммерчески доступного набора для HTRF с определением Gs-сопряженной динамики cAMP (Cisbio, № по кат. 62AM4PEJ), следуя двухстадийному протоколу в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, отдельно получали меченное криптомом антитело к cAMP (донорный флуорофор) и cAMP-d2 (акцепторный флуорофор) путем разведения каждого 1/20 в буфере для конъюгата и лизиса, который предоставлялся в наборе. Во все лунки планшета для анализа добавляли 5 мкл меченого криптомом антитела к cAMP, и во все лунки добавляли 5 мкл cAMP-d2, за исключением лунок для неспецифического связывания (NSB), в которые добавляли буфер для конъюгата и лизиса. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа, а затем считывали на Envision (Perkin Elmer) с применением длины волны возбуждения 320 нм и длин волны испускания, составляющих 620 нм и 665 нм. Данные

преобразовывали в % дельта F, как описано в руководстве производителя, и затем преобразовывали в процент активации от максимального ответа на нативный агонист и анализировали с помощью 4-параметрической логистической модели для определения значений EC50. Результаты сравнивали с соответствующими результатами для рекомбинантного человеческого релаксина-2 (R&D Systems, № по кат. 6586 RN) в случае клеток hRXFP1, мышинового релаксина-1 (R&D Systems, № по кат. 6637 RN) в клетках mRXFP1 и INSL3 (R&D Systems, кат. № 4544 NS) в клетках hRXFP2.

Анализ данных проводили с применением программного обеспечения для статистического анализа (GraphPad Prism, V6).

Биологическая активность тестируемых конструкций представлена в таблице 4 и на фиг. 4. Средние измерения EC50 и для рекомбинантного человеческого релаксина-2, и для слитых полипептидов из нескольких анализов были обобщены в таблице 4.

RELAX0013, RELAX0014 и RELAX0010 являются эталонными белками, где RELAX0013 представляет собой рекомбинантный человеческий релаксин-2, RELAX0014 представляет собой рекомбинантный мышинный релаксин-1, а RELAX0010 представляет собой одноцепочечный слитый белок, содержащий цепь А, линкер из 15 аминокислот, цепь В, соединительный элемент из 15 аминокислот и Fc, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, описанную в WO2018/138170.

Таблица 4. Биологическая активность гетеродимерных слитых полипептидов Fc-релаксин (n: число повторов).

Название	n	EC50 hRXFP1 (M)	EC50 mRXFP1 (M)	EC50 hRXFP2 (M)
RELAX0013	23	1,15E-12	7,54E-13	1,75E-09
RELAX0014	23	4,47E-12	2,37E-12	1,78E-12
RELAX0010	10	8,3E-12	7,64E-12	2,88E-07
RELAX0019	8	3,57E-11	9,10E-12	3,42E-08
RELAX0020	4	4,41E-11	2,79E-11	3,54E-08
RELAX0023	11	3,77E-11	3,27E-11	3,24E-08
RELAX0024	2	4,60E-11	1,56E-11	4,26E-08
RELAX0021	4	8,27E-11	4,14E-11	Не тестировали
RELAX0022	2	4,74E-11	3,28E-11	Не тестировали
RELAX0091	2	5,88E-11	2,88E-11	>1,09E-7
RELAX0117	6	1,06E-11	1,74E-11	1,61E-08

Исходя из результатов, представленных в таблице 4, можно сделать вывод, что протестированные гетеродимерные слитые белки Fc-релаксин были менее активными, чем

одноцепочечный слитый продукт RELAX0010 или рекомбинантный человеческий пептид релаксин-2, но они по-прежнему сохраняли высокие уровни биологической активности (в диапазоне от ~10 пМ до ~80 пМ в линии клеток с человеческим RXFP1).

Данные результаты показывают, что цепи А и В релаксина могут быть слиты на одном/обоих концах (соединительный элемент может присоединяться либо к N-, либо к C-концу цепи релаксина) и любой цепью гетеродимерной Fc (X или Y) и сохранять биологическую активность. Таким образом, формат гетеродимерных слитых белков Fc-релаксин, описанных в данном документе, представляет надежный формат для получения активного релаксина с длительным периодом полувыведения.

Наличие дисульфидной связи для стабилизации гетеродимерной Fc не влияет на активность слитого белка (сопоставьте RELAX0023 в сравнении с RELAX0021 и RELAX0024 в сравнении с RELAX0022).

Две используемые верхние шарнирные области (GGAGGA (SEQ ID NO: 78) и нативная DKTHT (SEQ ID NO: 79)) не влияли на активность (сопоставьте RELAX0023 в сравнении с RELAX0019 и RELAX0024 в сравнении с RELAX0020). Точная аминокислотная последовательность верхнего шарнира не является критически важной для активности слитого белка.

Пример 4. Эффект состава и длины соединительного элемента в гетеродимерных слитых белках релаксин-2-Fc

Соединительные элементы могут быть составлены из остатков глицина и серина (GS) или могут быть составлены из повторов пролина и аланина (PA). Длина соединительных элементов, используемых в данном документе, составляет от 6 до 21 остатка. Примером длинного соединительного элемента GS является GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 5) (21 аминокислота). Примером длинного соединительного элемента PA является PARAPARAPARAPARAPAG (SEQ ID NO: 6) (21 аминокислота).

Соединительные элементы различных длины и составов можно поместить на каждую Fc-цепь гетеродимерных слитых полипептидов релаксин-2-Fc.

Примеры гетеродимерных слитых белков релаксин-2- Fc с различными соединительными элементами показаны в таблице 5. В данной таблице также указана информация, касающаяся возможности разработки/обрабатываемости (выход экспрессии и процентная доля мономерных/неагрегированных слитых белков релаксин-2-Fc после захвата белком А из надосадочной жидкости культуры клеток) и биологической активности.

Таблица 5: Эффект соединительных элементов на биологическую активность и свойства возможности разработки гетеродимерных слитых белков Fc-релаксин-2 во время экспрессии в малом масштабе.

Название	Выход экспрессии (мг/л)	% мономеров	n	EC50 hRXFP1 (M)	EC50 mRXFP1 (M)	EC50 hRXFP2 (M)
RELAX0013			23	1,15E-12	7,54E-13	1,75E-09
RELAX0014			23	4,47E-12	2,37E-12	1,78E-12
RELAX0010	Нет данных	Нет данных	10	8,3E-12	7,64E-12	2,88E-07
RELAX0019	147	78	25	5,81E-11	2,24E-11	4,40E-08
RELAX0023	Нет данных	Нет данных	15	3,32E-11	1,36E-11	4,20E-08
RELAX0081	164	82	3	4,51E-11	4,73E-11	4,92E-08
RELAX0082	226	83	3	5,68E-11	4,90E-11	3,81E-08
RELAX0083	83	94	6	2,81E-11	1,34E-11	2,42E-08
RELAX0056	466	75	4	3,87E-11	3,27E-11	6,48E-08
RELAX0054	6	89	2	2,89E-11	1,59E-11	1,53E-08
RELAX0055	9	92	2	1,88E-11	1,51E-11	3,39E-08
RELAX0084	91	93	2	5,34E-11	3,48E-11	1,20E-08
RELAX0085	261	81	2	6,37E-11	3,09E-11	4,67E-08
RELAX0086	150	92	2	4,49E-11	2,68E-11	4,88E-08
RELAX0087	179	82	2	4,89E-11	3,48E-11	3,63E-08
RELAX0105	231	76	2	7,12E-11	1,49E-11	3,33E-08
RELAX0106	269	76	2	6,96E-11	1,98E-11	4,94E-08
RELAX0107	301	77	2	8,09E-11	3,87E-11	1,22E-07
RELAX0109	60	33	3	1,72E-09	8,22E-10	
RELAX0110	61	34	3	1,88E-09	1,11E-09	>6,07E-8
RELAX0111	60	36	3	1,93E-09	1,24E-09	>6,06E-8

Длина и состав соединительных элементов не оказывают влияния на аспект возможности разработки молекул. Как показано в таблице 5, гетеродимерные слитые полипептиды релаксин-2-Fc с соединительными элементами PA из 16 аминокислот или меньше экспрессировали плохо. Напротив, длинный соединительный элемент PA с 21 остатками значительно повышал выход экспрессии. Выходы экспрессии у конструкций с соединительными элементами GS являются более стабильными.

Гетеродимерные слитые белки релаксин-2-Fc с короткими и асимметричными (различными) соединительными элементами сохраняли активность. Снижение биологической активности наблюдали только у слитых белков с низким содержанием мономеров (RELAX0109, RELAX0110 и RELAX0111).

Пример 5. Точечные мутации в последовательности релаксина-2

Аналоги релаксина с одной точечной мутацией получали в виде гетеродимерных слитых белков Fc-релаксин-2. В таблице 6 показаны примеры таких молекул, которые сохраняли активность и благоприятные свойства возможности разработки.

Намеченные нативные остатки являются положительно заряженными и могут подвергаться протеолизу, но не участвуют в связывании релаксина с его рецептором.

Например, аналоги R22X гетеродимерных слитых белков Fc-релаксин-2, по-видимому, стабильно характеризуются улучшенными свойствами возможности разработки/обрабатываемости.

Таблица 6. Примеры аналогов релаксина-2, которые сохраняют активность и благоприятные свойства возможности разработки во время экспрессии в малом масштабе.

Название	Выход экспрессии (мг/л)	% мономеров	n	EC50 hRXFP1 (M)	EC50 mRXFP1 (M)	EC50 hRXFP2 (M)
RELAX0013			23	1,15E-12	7,54E-13	1,75E-09
RELAX0014			23	4,47E-12	2,37E-12	1,78E-12
RELAX0019	147	78	25	5,81E-11	2,24E-11	4,40E-08
RELAX0039	188,0	87	2	6,54E-11	4,25E-11	1,08E-07
RELAX0040	128,8	88	2	5,92E-11	2,92E-11	>1,27E-7
RELAX0041	162,5	82	2	6,22E-11	3,17E-11	1,18E-07
RELAX0043	160,2	79	2	7,98E-11	5,58E-11	>1,58E-7
RELAX0052	162,4	81	4	9,67E-11	5,69E-11	1,05E-07
RELAX0053	181,0	80	2	7,15E-11	4,36E-11	>1,79E-7
RELAX0063	157,2	84	2	1,96E-10	4,46E-11	>1,38E-7
RELAX0069	163,0	86	3	5,76E-11	3,69E-11	>1,62E-7
RELAX0070	145,5	91	3	6,67E-11	5,02E-11	1,07E-07
RELAX0071	174,7	85	3	6,87E-11	3,93E-11	1,15E-07
RELAX0072	232,3	78	2	8,53E-11	4,03E-11	>2,3E-7
RELAX0073	174,7	87	3	5,70E-11	4,15E-11	8,63E-08
RELAX0074	170,0	88	2	5,45E-11	4,53E-11	9,21E-08
RELAX0075	144,4	79	3	9,47E-11	6,14E-11	>1,43E-7

Результаты, представленные в таблице 6, демонстрируют, что некоторая вариабельность аминокислотной последовательности цепи А релаксина-2 является допустимой без утраты активности одновременно с сохранением благоприятных свойств возможности разработки.

Пример 6. РК-профиль слитых белков Fc-релаксин-2

Фармакокинетические (РК) профили слитых полипептидов релаксина-2 определяли с применением анализа ELISA для релаксина и/или анализа сAMP. Слитые полипептиды релаксина-2 вводили самцам мышей C57BL/6J (Jax) в возрасте 6-10 недель (Jackson Laboratories) с помощью одного из подкожного (SC) и/или (IV) внутривенного пути из расчета 6 мг/кг. В случае IV пути введения образцы сыворотки крови собирали через 5 минут, 30 минут и 60 минут, а затем через один из интервалов 3 часа, и/или 6 часов, и/или 8 часов и 24 часа, после чего следовала серия интервалов от минимум 1 дня до максимум 21 дня после введения лекарственного средства. Аналогичной схеме следовали в случае SC пути введения с менее частыми сборами в пределах первых 8 часов; например, сбор первого образца через 30 минут, затем через 3 часа, 8 часов, 24 часа, 30 часов и 48 часов, после чего следовала серия интервалов от минимум 1 дня до максимум 21 дня. Образцы собирали с помощью пункции сердца в пробирку для отделения сыворотки крови и выдерживали при комнатной температуре в течение 15-30 минут, затем центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об./мин в пределах 30 минут от сбора. Разделенные на аликвоты образцы хранили при $< -80^{\circ}\text{C}$ и позже тестировали с помощью ELISA или анализа активности сAMP.

Для большинства молекул РК-образцы тестировали в ELISA с применением иммобилизованного антитела к человеческому релаксину-2 (набор для ELISA Quantikine с предварительно нанесенным человеческим релаксином-2, R&D Systems, № по кат. DRL200) и детекторного антитела к Fc человека (AU003, меченное с помощью HRP), за исключением RELAX0010 (описанным в WO2018/138170), который тестировали в ELISA с применением иммобилизованного антитела к Fc человека и детекторного антитела к человеческому релаксину-2 (с применением поликлонального меченного HRP антитела из набора ELISA для человеческого релаксина-2, R&D Systems, № кат. DRL200). В обоих анализах планшеты, покрытые иммобилизованным антителом, блокировали с помощью 100 мкл разбавителя для анализа RD1-19 в течение одного часа при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли по 50 мкл стандарта или образца и планшет инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. Образцы аспирировали и лунки промывали три раза аналитического буфера для промывки. В каждую лунку добавляли по 50 мкл меченного HRP детекторного антитела, разбавленного либо 1:1000 в PBS/1% BSA в случае выявления с антителом, специфичным к Fc человека, либо применяли в неразбавленном виде в случае выявления с антителом к человеческому релаксину-2. После 1 часа инкубации при

комнатной температуре и трех промывок в каждую лунку добавляли по 50 мкл ТМВ (SureBlue Reserve KPL 53-00-03), и как только происходило изменение цвета, реакцию останавливали путем добавления в каждую лунку по 50 мкл стоп-раствора ТМВ (KPL 50-85-06).

Биологическая активность РК-образцов в клеточном анализе активности cAMP.

Образцы сыворотки крови, собранные у животных, как указано выше, тестировали в отношении биологической активности, чтобы измерить функциональный релаксин-2 для оценки целостности слитых полипептидов Fc-релаксин-2. Стабильную линию клеток, экспрессирующую человеческий рецептор RXFP1, разработанную из клеток CHO, приобретали у DiscoverX. Активация этого рецептора приводит к расположенной ниже по сигнальному пути выработке вторичного мессенджера cAMP, которую можно измерить в анализе функциональной активности.

Анализы на cAMP проводили с применением буфера для анализа на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA): сбалансированный солевой раствор Хенкса (Sigma № H8264), дополненный 0,1% BSA (Sigma № A9418) и 0,5 мМ IBMX (Sigma № I7018), доведенный до pH 7,4 с помощью 1 М NaOH.

Дозированные растворы слитых полипептидов релаксина-2 или рекомбинантного пептида релаксина-2 (R&D Systems, № по кат. 6586-RN) разводили в буфере для анализа и бесконтактный жидкостной дозатор (ECHO, Labcyte) применяли для создания 11-точечных стандартных кривых при четырех концентрациях матрицы. Применяемая матрица представляла собой пустую сыворотку крови от животных с имитационным введением дозы, и ее добавляли вручную в лунки при концентрации, вдвое превышающей требуемую концентрацию с учетом добавления клеток. Тестируемые образцы переносили из пробирок для отделения сыворотки крови в 384-луночный исходный планшет, который применяли с помощью бесконтактного жидкостного дозатора (ECHO, Labcyte) для приготовления четырех разведений в буфере для анализа. Все разведения образцов получали в двух повторностях.

Замороженную криопробирку с клетками, экспрессирующими hRXFP1, быстро размораживали на водяной бане, переносили в предварительно нагретую среду для клеток и центрифугировали при 240 x g в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали в 8 мл среды для культивирования клеток, высевали в колбу T75, содержащую 10 мл среды для культивирования, и оставляли для прикрепления на протяжении ночи. На следующий день клетки отделяли с применением аккутазы и центрифугировали при 240 x g в течение 5 минут. Полученный клеточный осадок ресуспендировали при оптимизированной

концентрации и в каждую лунку планшетов для анализа добавляли по 2,5 мкл суспензии клеток с применением дозатора Combi-drop.

Уровни сАМР измеряли с применением коммерчески доступного набора для 2 HTRF с определением динамики сАМР (Cisbio, № по кат. 62AM4PEJ), следуя двухстадийному протоколу в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, отдельно получали меченное криплатом антитело к сАМР (донорный флуорофор) и сАМР-d2 (акцепторный флуорофор) путем разведения каждого 1/20 в буфере для конъюгата и лизиса, который предоставлялся в наборе. Во все лунки планшета для анализа добавляли 2,5 мкл меченного криплатом антитела к сАМР, и во все лунки добавляли 2,5 мкл сАМР-d2, за исключением лунок для неспецифического связывания (NSB), в которые добавляли буфер для конъюгата и лизиса. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа, а затем считывали на Envision (Perkin Elmer) с применением длины волны возбуждения 320 нм и длин волны испускания, составляющих 620 нм и 665 нм. Данные преобразовывали в % дельта F, как описано в руководстве производителя, и значения образцов рассчитывали, исходя из линейной части стандартных кривых.

Результаты и вывод

На фиг. 5 показаны обобщенные данные серии экспериментов PK *in vivo*, где полипептиды Fc-релаксин-2 вводили мышам IV. Данные нормализованы по моменту времени 5 минут.

Период полувыведения человеческого релаксина-2 после IV введения составляет приблизительно 0,09 +/- 0,04 часа, т. е. 5,4 +/- 2,4 минуты у людей (Chen *et al.* 1993). Все рекомбинантные слитые полипептиды релаксин-Fc демонстрируют увеличение периода полувыведения по сравнению с нативным релаксином-2. Полипептиды Fc-релаксин, у которых цепь A и цепь B релаксина соединены с различными гетеродимерными Fc-цепями (на примере RELAX0019, RELAX0023, RELAX0034, RELAX0046 и RELAX0117), характеризуются улучшенными свойствами PK по сравнению с теми полипептидами Fc-релаксин, в которых цепи релаксина соединены с линкером (на примере RELAX0010 и RELAX0009). Однако наличие соединяющего линкера между цепью A и цепью B релаксина само по себе непосредственно не связано с быстрой элиминацией *in vivo* полипептидов Fc-релаксин, поскольку обе содержащие линкер молекулы RELAX0088 и RELAX0122 демонстрируют хорошую стабильность *in vivo*.

Неожиданно в данном исследовании все гетеродимерные слитые полипептиды Fc-релаксин (RELAX0019, RELAX0023, RELAX0034, RELAX0046, RELAX0117, RELAX0088 и RELAX0122) характеризуются значительно улучшенными фармакокинетическими

свойствами по сравнению со слитыми полипептидами Fc-релаксин RELAX0010 и RELAX0009.

Пример 7. Устранение установленных гипертрофии и фиброза с помощью RELAX0019 и RELAX0023

Изопротеренол вводили путем инфузии с помощью мининасоса (15 мг/кг/день) мышам C57B6 в течение 10 дней для индуцирования гипертрофии и фиброза сердца. Мышей, которым вводили путем инфузии среду-носитель в течение того же срока, использовали в качестве исходных контролей. Через 10 дней мининасосы удаляли и мышам либо устанавливали новый мининасос, содержащий рекомбинантный релаксин-2 (500 мкг/кг/день), либо вводили первую из двух, вводимых один раз в неделю (QW), подкожных инъекций RELAX0019 (20 мг/кг) или RELAX0023 (20 мг/кг). После 14-дневного периода обработки мышей умерщвляли и их сердца собирали для анализа в отношении гипертрофии и фиброза. Сердца мышей исходного контроля собирали после удаления мининасоса со средой-носителем. Гипертрофию определяли как показатель массы сердца относительно длины большеберцовой кости, а фиброз устанавливали с помощью количественного определения содержания коллагена относительно массы сердца. Инфузия изопротеренола в значительной степени индуцировала как гипертрофию, так и фиброз в данной модели. QW введение дозы RELAX0019 и RELAX0023 возвращало индуцированную изопротеренолом гипертрофию к исходным уровням, так же как и постоянная инфузия рекомбинантного релаксина-2. Все обработки с помощью релаксина также снижали фиброз сердца на более чем 50%. N=8 для каждой группы. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

Рекомбинантные слитые белки релаксин-Fc RELAX0019 и RELAX0023 были способны устранять гипертрофию и фиброз сходным образом с нативным человеческим релаксином-2 (фиг. 6).

Пример 8. Оценка неспецифического связывания белков Fc-релаксин-2 с применением ELISA на основе бакуловируса.

Белки RELAX экспрессировали в клетках CHO и очищали, как описано выше. ELISA на основе бакуловируса, разработанный для оценки неспецифического связывания моноклональных антител (ссылка: Hotzel et al 2012 mAbs 4:6, 753-760), адаптировали для определения неспецифического связывания полипептидов Fc-релаксин с модификацией, где вместо расчета 'показателя BV' (поглощение планшета с бакуловирусом/поглощение пустого планшета) неспецифическое связывание рассчитывали отдельно для планшета с бакуловирусом и пустого планшета как сигнал относительно фона (где фон представляет собой значение, полученное в отсутствие полипептида Fc-релаксин). Данный показатель

вводили для отражения повышенного по сравнению с моноклональными антителами неспецифического связывания некоторых Fc-пептидов как с покрытыми, так и с непокрытыми (пустыми) планшетами. Препараты каждого белка получали при концентрации либо 100 нМ, либо 10 нМ в PBS (Gibco 14190-086) + 0,5% BSA (Sigma A9576) и применяли в двух повторностях в анализе ELISA на 96-луночных планшетах Nunc MaxiSorp F, покрытых на протяжении ночи при 4°C с помощью 50 мкл/лунка либо 1% экстракта бакуловируса в 50 мМ карбоната натрия (планшет BV), либо 50 мМ карбоната натрия (пустой планшет). После промывки с помощью PBS планшеты блокировали с помощью 300 мкл/лунка PBS + 0,5% BSA в течение 1 часа при комнатной температуре и три раза промывали с помощью PBS. Добавляли по 50 мкл/лунка либо PBS + 0,5% BSA (фон), либо разведения белков RELAX и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После трех промывок в PBS добавляли детекторное антитело (антитело, специфическое к Fc человека, конъюгированное с HRP, Sigma A0170), разведенное 1:5000 в PBS + 0,5% BSA, из расчета 50 мкл/лунка. Образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и планшеты промывали три раза в PBS. Затем добавляли субстрат HRP – TMB (SureBlue Reserve KPL 53-00-03) из расчета 50 мкл/лунка и после изменения цвета реакцию останавливали путем добавления по 50 мкл/лунка 0,5 М серной кислоты. Поглощение измеряли при 450 нм и для каждого образца определяли неспецифическое связывание. Неспецифическое связывание (кратность превышения связывания относительно фона) определяли как соотношение неспецифического связывания в присутствии белков Fc-релаксин-2 и в отсутствие белков Fc-релаксин-2 (фон). Данные для белков Fc-релаксин-2, тестируемых при 2 различных концентрациях, составляющих либо 100 нМ, либо 10 нМ, показаны в таблице 7.

Таблица 7. Связывание слитых белков Fc-релаксин в ELISA на основе бакуловируса при 100 нМ и 10 нМ (-001, 002, 003 относятся к различным партиям одного и того же белка).

Название слитого продукта	планшет BV для неспецифического связывания (сигнал/фон) при 100 нМ	ПУСТОЙ		планшет BV для неспецифического связывания (сигнал/фон) при 10 нМ
		планшет для неспецифического связывания (сигнал/фон) при 100 нМ	планшет для неспецифического связывания (сигнал/фон) при 10 нМ	
RELAX0019-001	2,0	1,8	1,0	1,2

RELAX0019-002	1,5	1,9	1,1	1,1
RELAX0020	2,2	2,5	1,1	1,3
RELAX0021	2,7	5,3	1,0	2,0
RELAX0022	4,9	8,2	1,3	2,9
RELAX0023-001	1,7	1,8	1,0	1,0
RELAX0023-002	2,4	3,7	1,1	0,8
RELAX0024	1,8	5,3	0,9	1,5
RELAX0039	6,3	3,2	1,7	1,8
RELAX0040	7,5	3,0	2,6	2,1
RELAX0041	7,0	4,4	1,9	2,0
RELAX0043	3,7	1,6	1,3	1,3
RELAX0052	2,9	1,1	1,5	1,3
RELAX0053	5,5	3,8	1,7	2,2
RELAX0054	3,2	4,1	1,5	1,8
RELAX0055	1,4	4,6	0,7	1,7
RELAX0056	5,4	9,1	1,3	1,2
RELAX0069	1,7	1,8	1,1	6,5
RELAX0070	2,7	3,2	0,9	1,3
RELAX0071	1,3	1,7	0,8	0,9
RELAX0072	1,4	2,4	0,7	1,3
RELAX0073	1,7	1,6	0,7	1,1
RELAX0074	1,4	1,8	0,9	1,5
RELAX0075	4,7	7,9	3,3	4,8
RELAX0076	3,3	5,0	1,5	3,6
RELAX0081	3,2	4,9	0,8	1,5
RELAX0082	3,4	6,1	1,0	2,9
RELAX0083	2,9	5,7	2,6	1,5
RELAX0084	3,2	7,8	1,2	1,7
RELAX0085	5,4	12,3	1,4	2,2
RELAX0086	3,1	7,2	1,3	1,6
RELAX0087	4,1	17,3	1,4	2,7

RELAX0088-001	3,5	5,6	1,4	1,4
RELAX0088-002	1,9	2,2	1,1	0,8
RELAX0091	5,6	39,3	1,6	6,8
RELAX0105	12,9	8,3	2,4	1,1
RELAX0106	14,6	8,3	2,4	1,0
RELAX0107	11,6	7,0	1,8	0,9
RELAX0109	27,1	19,7	5,8	2,5
RELAX0110	26,8	23,9	8,3	2,6
RELAX0111	29,0	24,3	7,0	2,9
RELAX0117	18,5	47,4	3,0	8,2
RELAX0122	2,2	2,4	1,1	0,7
RELAX0123	2,5	4,8	1,1	0,9
RELAX0124-001	1,8	1,7	1,1	0,7
RELAX0124-002	6,4	4,6	1,5	0,9
RELAX0126-001	20,0	41,5	10,2	16,9
RELAX0126-002	21,3	40,4	10,9	14,3
RELAX0127	23,5	42,8	13,3	19,8
RELAX0128	23,5	42,4	13,2	19,2
RELAX0130	2,2	6,1	1,1	1,6
RELAX0010-001	6,3	13,7	1,5	5,0
RELAX0010-002	6,0	13,2	1,8	4,2
RELAX0010-003	2,4	21,0	0,8	7,7
RELAX0009	17,8	22,2	4,8	21,5

Как показано в таблице 7 и на фиг. 7 гетеродимерные слитые полипептиды релаксин-2-Fc проявляют более низкую степень неспецифического связывания, когда цепи релаксина присоединены к C-концу с применением соединительных элементов GS. Некоторые асимметричные соединительные элементы и соединительные элементы PA, определенные точечные мутации и расположение цепей релаксина на N-концах, в частности, в контексте бивалентной молекулы (RELAX0117), увеличивают неспецифическое связывание как с пустыми планшетами, так и с планшетами, покрытыми BV. Некоторые белки Fc-релаксин с особенно высокой степенью неспецифического связывания проявляют большее неспецифическое связывание с пустыми планшетами, чем с планшетами, покрытыми BV, как при высоких (100 нМ), так и при низких (10 нМ) концентрациях. Хотя все контрольные молекулы — содержащие линкер бивалентные RELAX0009, RELAX0010, RELAX0126, RELAX0127 и RELAX0128 — демонстрируют высокую степень неспецифического связывания, ни присутствие линкера между цепями A и B релаксина, ни бивалентность сама по себе не приводят к высокой степени неспецифического связывания, что может быть продемонстрировано низкой степенью неспецифического связывания у RELAX0122.

Пример 9. Стабильность в растворе

Стабильность RELAX0023 оценивали с применением высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC) и жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) и сравнивали с RELAX0127 и RELAX0128. HP-SEC при выявлении с поглощением при 280 нм можно применять для измерения чистоты, агрегации и фрагментации. У молекул проводили замену буфера на оптимизированную композицию для составления, а затем концентрировали вплоть до 10 мг/мл. Все образцы помещали в условия температурного стресса (40°C) в течение до 4 недель. В моменты времени 1, 2 и 4 недели образцы собирали и инъецировали в эксклюзионную колонку и элюировали с помощью водной подвижной фазы изократически при фиксированной скорости потока. Более крупные молекулы вымываются из пор эксклюзионной колонки в большей степени, чем более мелкие молекулы, и, следовательно, элюируются раньше. Пики, элюирующиеся раньше, чем пик мономера, регистрируются как агрегаты. Пики, элюирующиеся после пика мономера (за исключением пика, связанного с буфером), регистрируются как фрагменты. Результаты представлены как чистота, выраженная в процентах; процентное содержание агрегатов и процентное содержание фрагментов и показаны на фиг. 8. RELAX0023 является наиболее стабильной молекулой со скоростью потери % чистоты, составляющей всего 0,1% в месяц, по сравнению с 7,7% и 9,3% для RELAX0128 и RELAX0127 соответственно. Как RELAX0127, так и RELAX0128 продемонстрировали признаки агрегации, однако уровень агрегатов для RELAX0023 не увеличился, что указывает на лучшую физическую

стабильность раствора. Фрагментация оказалась основным фактором потери чистоты, при этом RELAX0127 характеризовался фрагментацией 6,6% в месяц, а RELAX0128 - 6,8%. RELAX0023 характеризуется скоростью фрагментации всего 0,7% в месяц. В то же самое время после 4 недель хранения при 40°C общая площадь пика у RELAX0128 уменьшилась с 22403 до 18216 (снижение на 19%), а у RELAX0127 уменьшилась с 22225 до 18823 (снижение на 15%). Эта значительная потеря общей площади пика вместе с высокой скоростью фрагментации указывала на потенциальное сильное химическое разрушение этих двух молекул. Следует отметить, что эта потеря общих площадей оказывала сильное влияние на профили хроматограмм этих двух молекул. Это объясняет, почему, несмотря на очевидное увеличение площадей пика агрегатов после хранения, RELAX0128 и RELAX0127 демонстрировали более низкий процент агрегатов через 4 недели по сравнению с предыдущими моментами времени. Напротив, общая площадь пика RELAX0023 уменьшилась всего на 0,03%, с 21828 до 21761, что указывает на лучший профиль стабильности по сравнению с RELAX0128 и RELAX0127.

Фрагментацию молекул дополнительно подтвердили с помощью LC-MS с применением масс-спектрометрического анализа восстановленного образца, который показал, что интенсивность пиков фрагментов RELAX0127 и RELAX0128 увеличивались после хранения при 40°C (фиг. 9А). Напротив, пик фрагмента для RELAX0023 оставался неизменным после стресса. Масс-спектры в восстанавливающих условиях также показали модификацию RELAX0127 и RELAX0128 с течением времени, о чем свидетельствует сдвиг пика в сторону большей массы и расширение пика, что указывает на большую гетерогенность (фиг. 9В). Напротив, масс-спектры интактных образцов RELAX0023 остались неизменными, что указывает на отсутствие модификации. Это исследование указывает на, что RELAX0023 характеризуется превосходной физической и химической стабильностью по сравнению с RELAX0127 и RELAX0128.

Пример 10. PK-профиль RELAX0023 у яванских макаков

Фармакокинетический профиль (PK) RELAX0023 у яванских макаков определяли с применением иммуноанализа на основе сэндвич-ELISA. RELAX0023 вводили в общей сложности 12 самкам яванских макаков, которых случайным образом распределили на 4 группы по 3 животных в группе. Животным в группах 1, 2 и 3 вводили SC 0,1, 1 и 10 мг/кг RELAX0023 соответственно. Животным в группе 4 вводили IV болюс из расчета 10 мг/кг RELAX0023. Образцы сыворотки крови собирали через 0,25 часа, 1 час, 2 часа, 4 часа, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 96 часов, 7 дней, 14 дней и 21 день после введения лекарственного средства.

Планшеты для анализа покрывали козьим антителом к IgG человека и инкубировали с сывороткой крови яванских макаков из групп животных 1-4. RELAX0023, связавшиеся с планшетами, выявляли с помощью антитела к релаксину, конъюгированного с HRP. Сыворотку крови разводили 1:10 перед добавлением в планшеты. Нижний предел количественного определения составляет 0,010 мкг/мл, а верхний предел количественного определения составляет 0,300 мкг/мл в 100% сыворотке крови.

Результаты и вывод

На фиг. 10 показаны профили зависимости средней концентрации в сыворотке крови от времени для RELAX0023 у яванских макаков после введения однократной дозы. После SC введения однократной дозы RELAX0023 проявлял линейную PK в диапазоне доз от 0,01 до 10 мг/кг. Наблюдали дозопропорциональное увеличение C_{max} . Средние значения C_{max} составляли 0,400, 4,69, 34,8 мкг/мл для групп SC доз, составляющих 0,1, 1 и 10 мг/кг соответственно. Также наблюдали дозопропорциональное увеличение значений AUC_{0-last} в группе SC введения от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг. Средние значения AUC_{0-last} составляли 2,01, 25,5, 193 мкг/день/мл для групп SC доз 0,1, 1 и 10 мг/кг соответственно. В целом, PK для RELAX0023 является линейной в диапазоне от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг со средним значением CL/F , составляющим 51,0 мл/день/кг, и средним значением $t_{1/2}$, составляющим 3,07 дня. Биодоступность RELAX0023 при SC введении оценивали как 88,2%.

Формула изобретения

1. Гетеродимерный слитый продукт, содержащий:
 - (i) первый домен гетеродимеризации, соединенный с по меньшей мере одним полипептидом цепи А релаксина или его вариантом; и
 - (ii) второй домен гетеродимеризации, соединенный с по меньшей мере одним полипептидом цепи В релаксина или его вариантом,где первый домен гетеродимеризации гетеродимеризуется со вторым доменом гетеродимеризации, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.
2. Гетеродимерный слитый продукт по п. 1, где полипептид цепи А релаксина и полипептид цепи В релаксина ковалентно связаны по меньшей мере одной межцепочечной дисульфидной связью.
3. Гетеродимерный слитый продукт по п. 1 или п. 2, где цепь А релаксина и цепь В релаксина не связаны ковалентно друг с другом с помощью аминокислотного линкера.
4. Гетеродимерный слитый продукт по любому из предыдущих пунктов, где цепь А релаксина представляет собой цепь А релаксина-2, а цепь В релаксина представляет собой цепь В релаксина-2.
5. Гетеродимерный слитый продукт по любому из предыдущих пунктов, где цепь А релаксина соединена с первым доменом гетеродимеризации посредством соединительного элемента, и цепь В релаксина соединена со вторым доменом гетеродимеризации посредством соединительного элемента, где необязательно один или предпочтительно оба соединительных элемента представляют собой полипептиды.
6. Гетеродимерный слитый продукт по п. 5, где длина одного или предпочтительно обоих соединительных элементов составляет от 6 до 40 аминокислот, например, длина одного или предпочтительно обоих соединительных элементов составляет 21 аминокислоту.
7. Гетеродимерный слитый продукт по любому из предыдущих пунктов, где первый и второй домены гетеродимеризации получены из Fc-области иммуноглобулина (“первая Fc-область” и “вторая Fc-область” соответственно), где необязательно первая и вторая Fc-области содержат константные домены CH2 и CH3.
8. Гетеродимерный слитый продукт по п. 7, где C-конец первой Fc-области соединен с N-концом цепи А релаксина, и C-конец второй Fc-области соединен с N-концом цепи В релаксина.
9. Гетеродимерный слитый продукт по п. 7 или п. 8, где первая и вторая Fc-области содержат содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации и/или

модификации, где необязательно содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации представляют собой мутации по типу “Fc-выступ” и “Fc-впадина”, например, мутации по типу “Fc-выступ” и “Fc-впадина” присутствуют в доменах СН3.

10. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 7-9, где первая и вторая Fc-области получены из человеческого иммуноглобулина IgG1.

11. Гетеродимерный слитый продукт по п. 10, где содействующие гетеродимеризации аминокислотные мутации предусматривают:

a. мутации по типу “Fc-впадина”, Y349C, T366S, L368A и Y407V, в одном домене СН3 и

b. мутации по типу “Fc-выступ”, S354C и T366W, в другом домене СН3,

где нумерация аминокислот приведена в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

12. Гетеродимерный слитый продукт по п. 11, где:

a. первая Fc-область содержит мутации по типу “Fc-выступ”, а вторая Fc-область содержит мутации по типу “Fc-впадина”; или

b. вторая Fc-область содержит мутации по типу “Fc-выступ”, а первая Fc-область содержит мутации по типу “Fc-впадина”.

13. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 10-12, где первая и/или вторая Fc-область содержат аминокислотные мутации L234F, L235E и P331S, где нумерация аминокислот приведена в соответствии с EU-индексом согласно Kabat.

14. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 4-13, где полипептид цепи А релаксина-2 содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, или ее вариант, и полипептид цепи В релаксина-2 содержит последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2, или ее вариант.

15. Гетеродимерный слитый продукт по п. 14, где полипептид цепи А релаксина-2 содержит аминокислотную мутацию K9H, K17M или K17I.

16. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 5-15, где оба соединительных элемента имеют последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS [SEQ ID NO: 5].

17. Гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

(i) слитый полипептид FcX-con-A и

(ii) слитый полипептид FcY-con-B,

где

А представляет собой цепь А релаксина или ее вариант, например, цепь А релаксина-2 или ее вариант;

В представляет собой цепь В релаксина или ее вариант, например, цепь В релаксина-2 или ее вариант;

FcY представляет собой Fc-область, содержащую константные домены CH2 и CH3 человеческого иммуноглобулина IgG1, и содержит аминокислотные мутации и/или модификации по типу “Fc-впадина”, предпочтительно аминокислотные мутации Y349C: T366S:L368A:Y407V;

FcX представляет собой Fc-область с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-выступ”, предпочтительно содержащую константные домены CH2 и CH3 человеческого иммуноглобулина IgG1, и содержит аминокислотные мутации и/или модификации по типу “Fc-выступ”, предпочтительно аминокислотные мутации S354C:T366W; и

сop представляет собой соединительный полипептид, предпочтительно имеющий последовательность GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 5],

где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat, где FcX гетеродимеризуется с FcY, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.

18. Гетеродимерный слитый продукт по любому из предыдущих пунктов, где гетеродимерный слитый продукт содержит слитый полипептид с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 11 и слитый полипептид с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 20.

19. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 8-18, где гетеродимерный слитый продукт дополнительно содержит один или несколько Fab, где необязательно гетеродимерный слитый продукт содержит один Fab, связанный с N-концом первой Fc-области, и второй Fab, связанный с N-концом второй Fc-области.

20. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 8-19, где гетеродимер дополнительно содержит полипептид второй цепи А релаксина или его вариант, соединенные с N-концом первой Fc-области, и полипептид второй цепи В релаксина или его вариант, соединенные с N-концом второй Fc-области, где необязательно вторая цепь А релаксина соединена с первой Fc-областью посредством соединительного полипептида, и вторая цепь В релаксина соединена со второй Fc-областью посредством соединительного полипептида.

21. Гетеродимерный слитый продукт, содержащий:

- (i) FcX-B-L-A и FcY, необязательно FcY-B-L-A; или
- (ii) FcY-B-L-A и FcX, необязательно FcX-B-L-A;

где

FcY представляет собой Fc-область иммуноглобулина с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-впадина”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями Y349C:T366S:L368A:Y407V;

FcX представляет собой Fc-область иммуноглобулина с аминокислотными мутациями и/или модификациями по типу “Fc-выступ”, предпочтительно содержащую домен CH3 с аминокислотными мутациями S354C:T366W;

B представляет собой цепь B релаксина или ее вариант, например, цепь B релаксина-2 или ее вариант;

A представляет собой цепь A релаксина или ее вариант, например, цепь A релаксина-2 или ее вариант; и

L представляет собой линкерный полипептид, предпочтительно имеющий аминокислотную последовательность GGGSGGGSGG [SEQ ID NO: 60],

где нумерация аминокислот соответствует EU-индексу согласно Kabat, где FcX гетеродимеризуется с FcY, и где гетеродимерный слитый продукт характеризуется активностью релаксина.

22. Гетеродимерный слитый продукт по п. 21, где цепь B релаксина соединена с FcX и/или FcY посредством соединительного элемента, необязательно соединительного полипептида с длиной, составляющей от 6 до 40 аминокислот, например, длиной, составляющей 21 аминокислоту.

23. Гетеродимерный слитый продукт по любому из предыдущих пунктов, где соотношение активности релаксина гетеродимерного слитого продукта относительно активности релаксина эталонного белка релаксина составляет от приблизительно 0,001 до приблизительно 10.

24. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимерный слитый продукт по любому из предыдущих пунктов.

25. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 24.

26. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 25 или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 24.

27. Способ получения гетеродимерного слитого продукта по любому из пп. 1-23, причем способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 26 и сбор слитого белка.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 1-23 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

29. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 1-23 или фармацевтическая

композиция по п. 28 для применения в терапии.

30. Гетеродимерный слитый продукт по любому из пп. 1-23 или фармацевтическая композиция по п. 28 для применения в лечении субъекта с сердечной недостаточностью, где гетеродимерный слитый продукт или фармацевтическая композиция вводятся субъекту.

31. Гетеродимерный слитый продукт для применения по п. 29 или п. 30 или фармацевтическая композиция для применения по п. 29 или п. 30, где гетеродимерный слитый продукт или фармацевтическая композиция вводятся субъекту с помощью подкожной инъекции.

32. Гетеродимерный слитый продукт для применения по любому из пп. 29-31 или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 29-31, где слитый полипептид или фармацевтическая композиция вводятся с помощью самостоятельного введения.

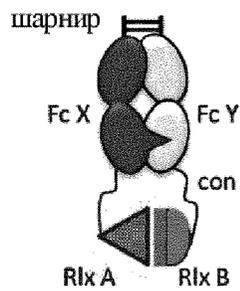
33. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п. 28.

34. Способ лечения субъекта с заболеванием или нарушением, причем способ включает введение субъекту гетеродимерного слитого продукта по любому из пп. 1-23 или фармацевтической композиции по п. 28.

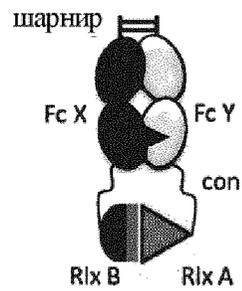
35. Способ лечения субъекта с сердечной недостаточностью, причем способ включает введение субъекту гетеродимерного слитого продукта по любому из пп. 1-23 или фармацевтической композиции по п. 28.

36. Способ по п. 34 или п. 35, где гетеродимерный слитый продукт или фармацевтическую композицию вводят субъекту с помощью подкожной инъекции.

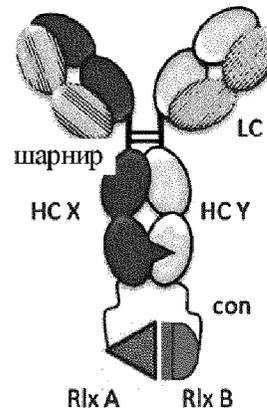
37. Способ по любому из пп. 34-36, где гетеродимерный слитый продукт или фармацевтическую композицию вводят с помощью самостоятельного введения.



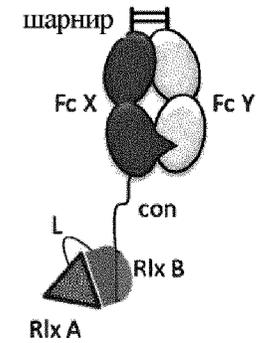
**FcX-con-A/
FcY-con- B**



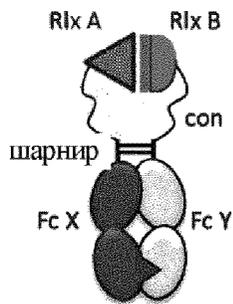
**FcX-con- B/
FcY-con-A**



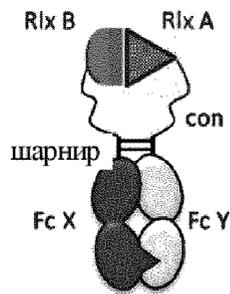
**Fab-FcX-con-A/
Fab-FcY-con- B**



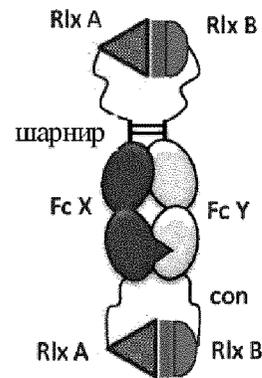
**FcX-con-B-L-A/
FcY**



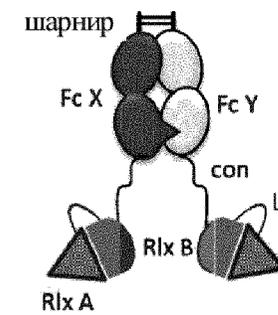
**A-con-FcX/
B-con-FcY**



**B-con-FcX/
A-con-FcY**

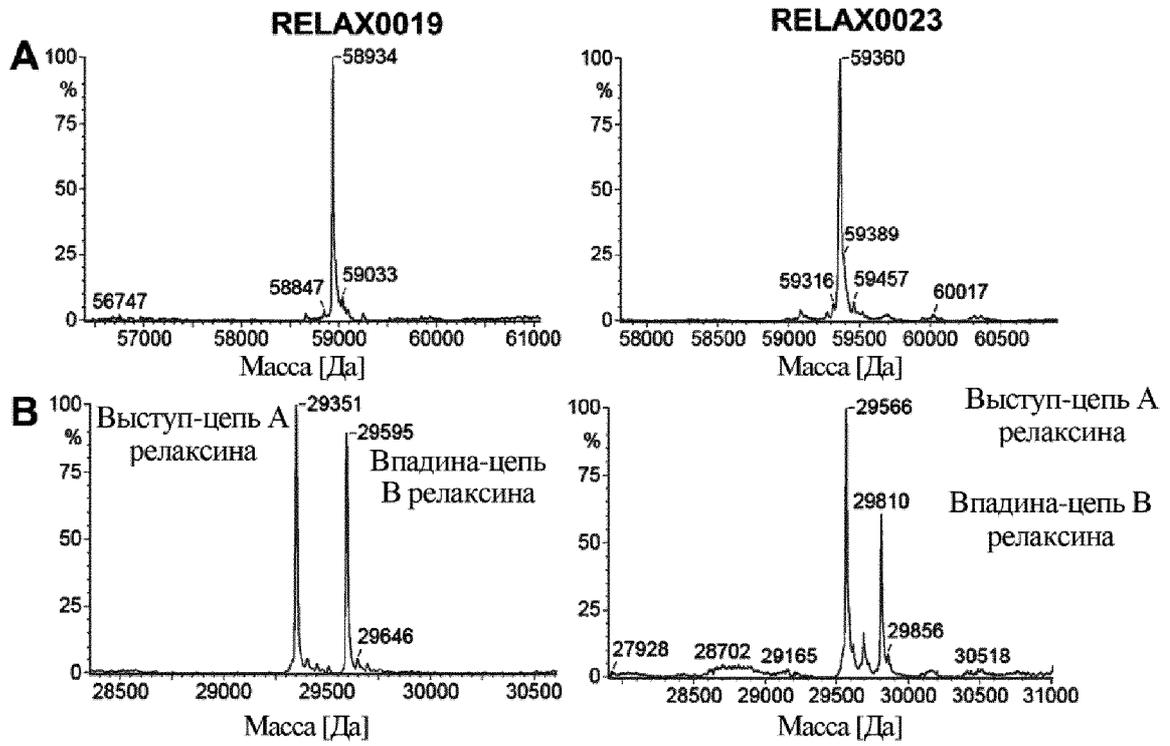


**A-con-FcX-con-A/
B-con-FcY-con- B**

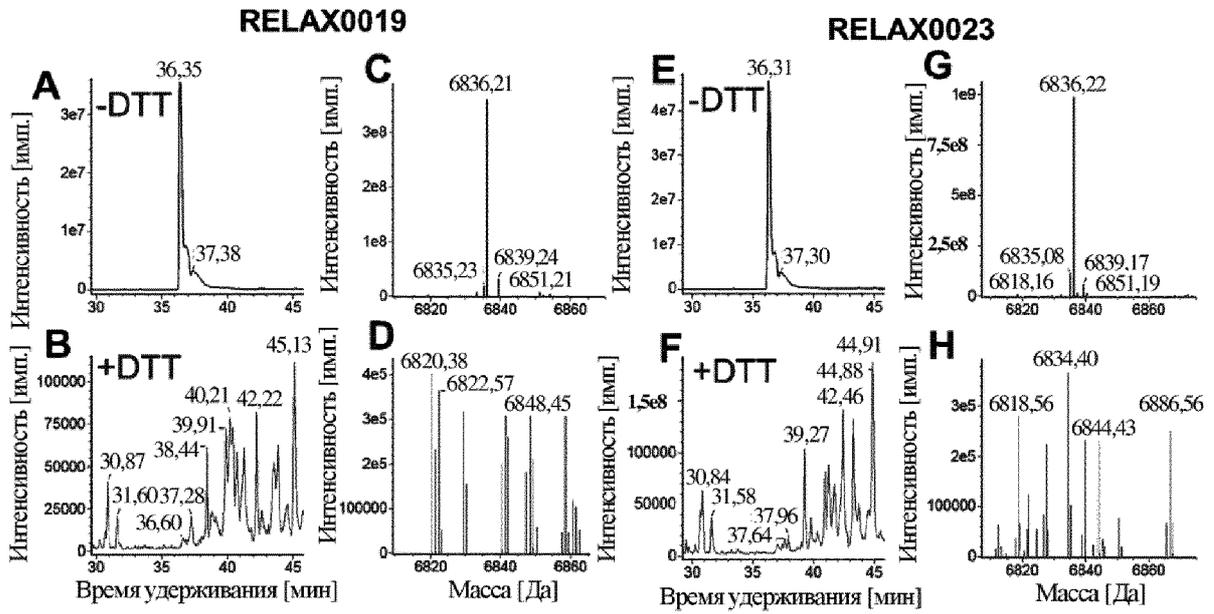
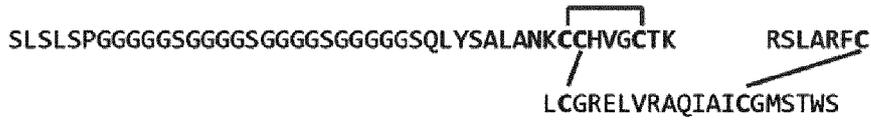


**FcX-con-B-L-A/
FcY-con-B-L-A**

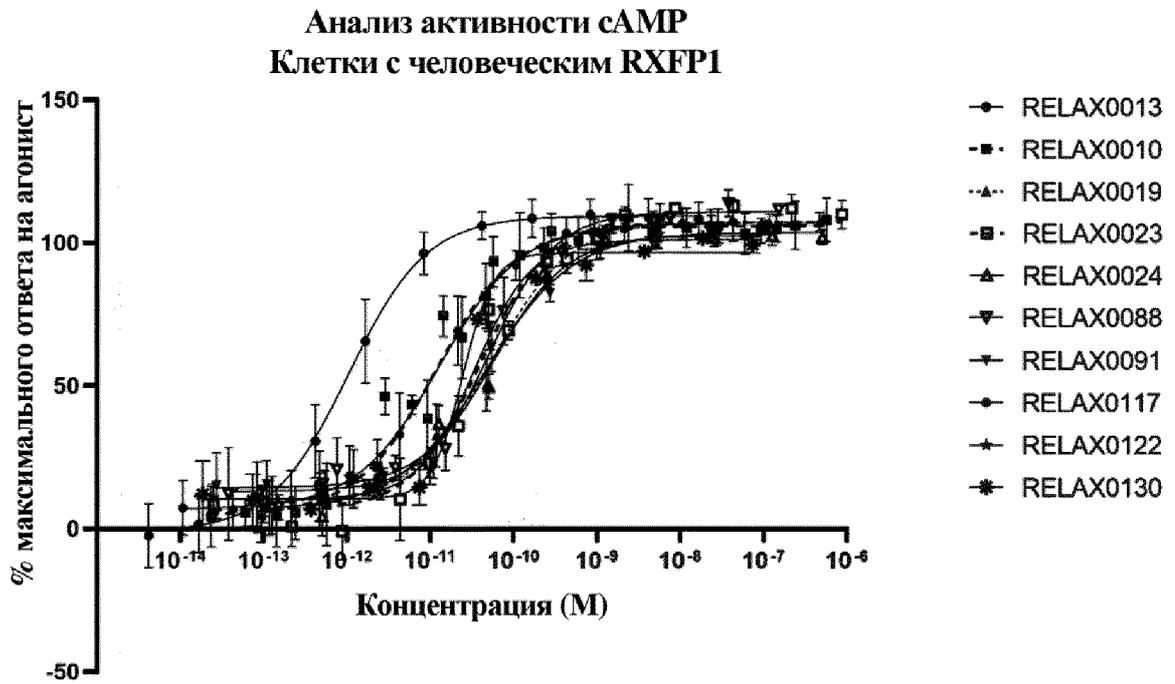
Фиг. 2



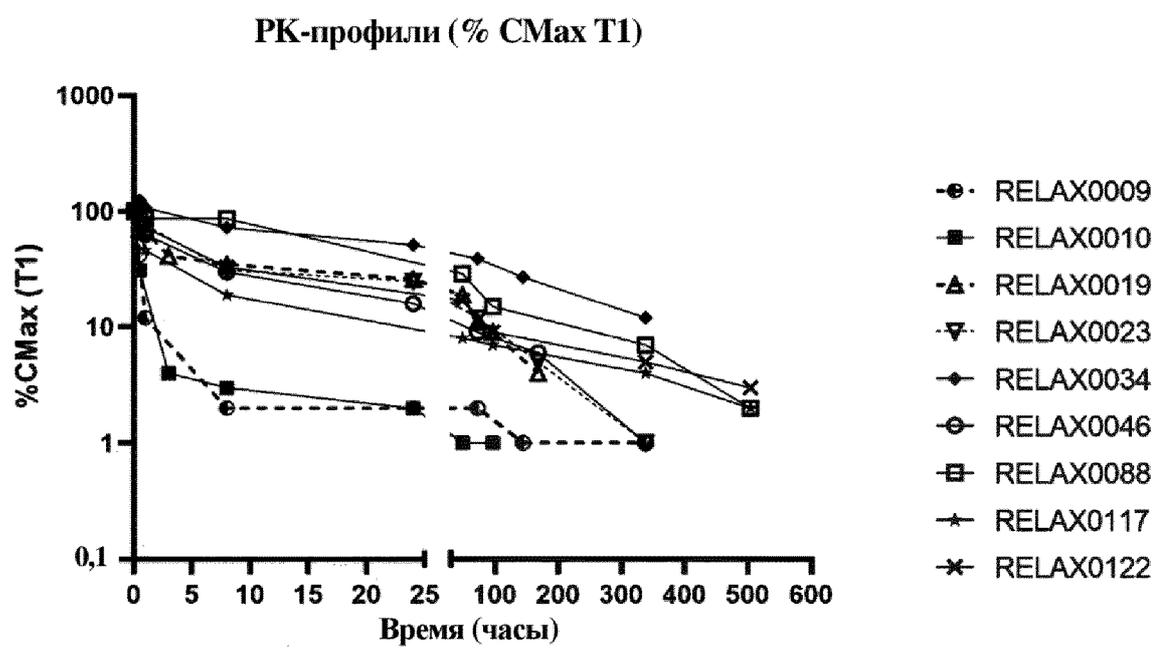
Фиг. 3



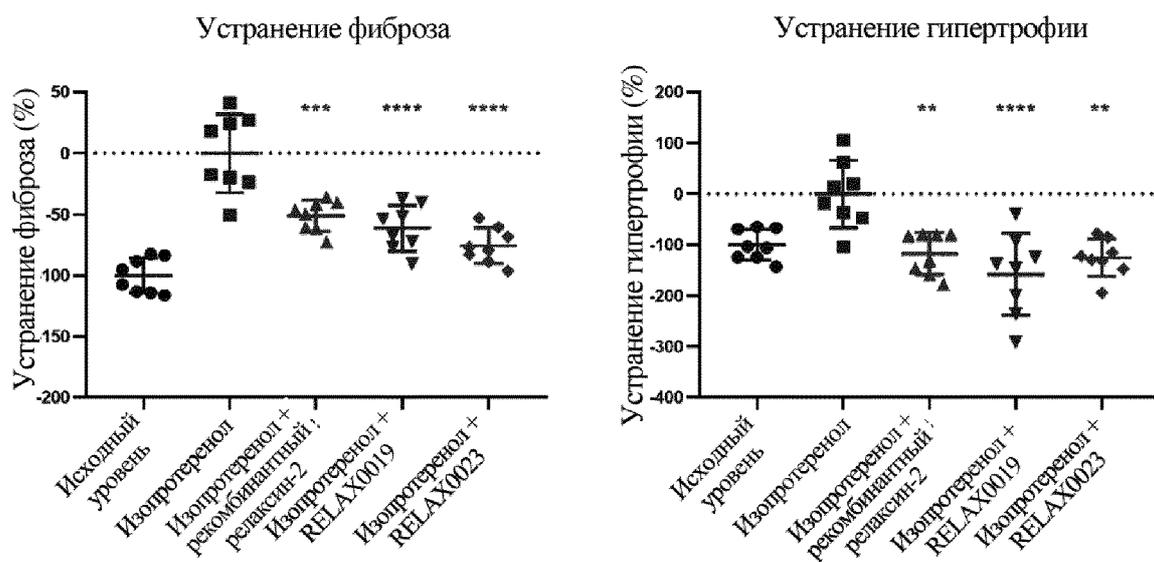
Фиг. 4



Фиг. 5

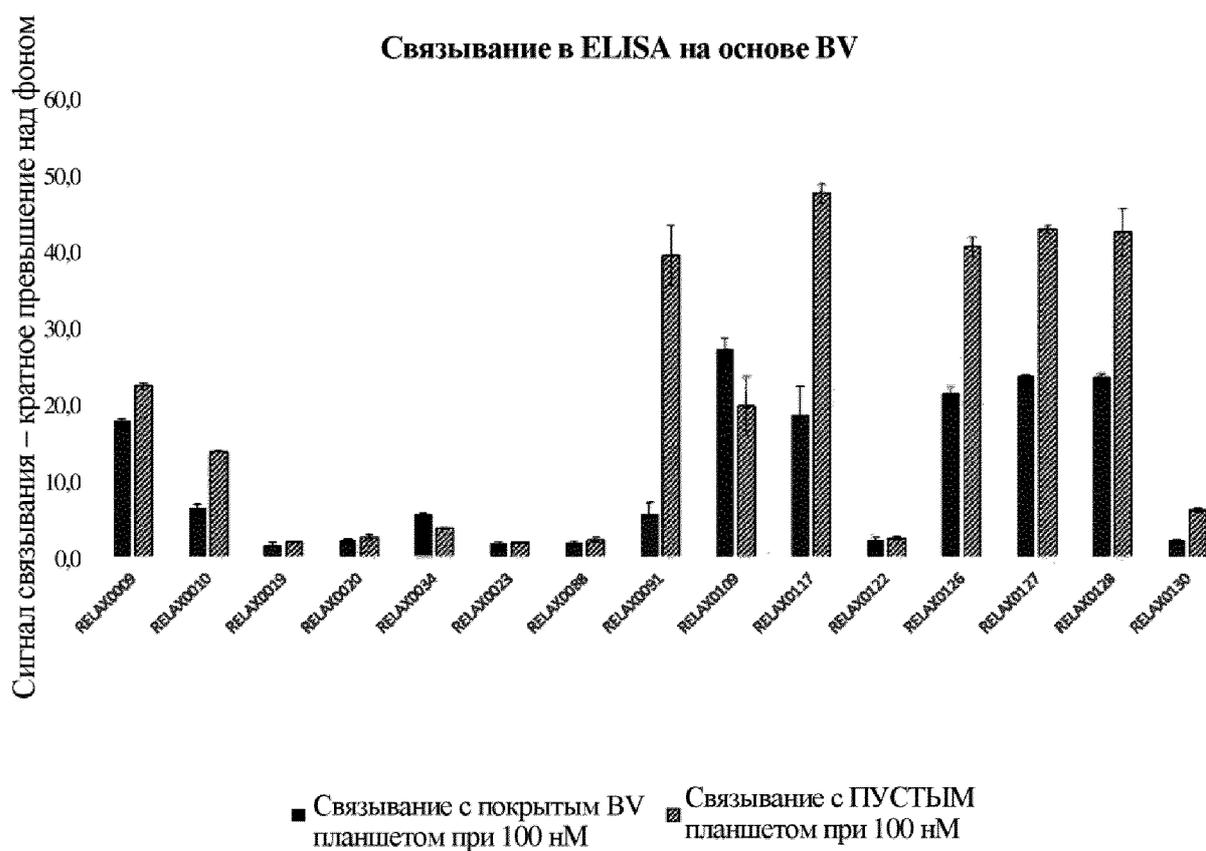


Фиг. 6

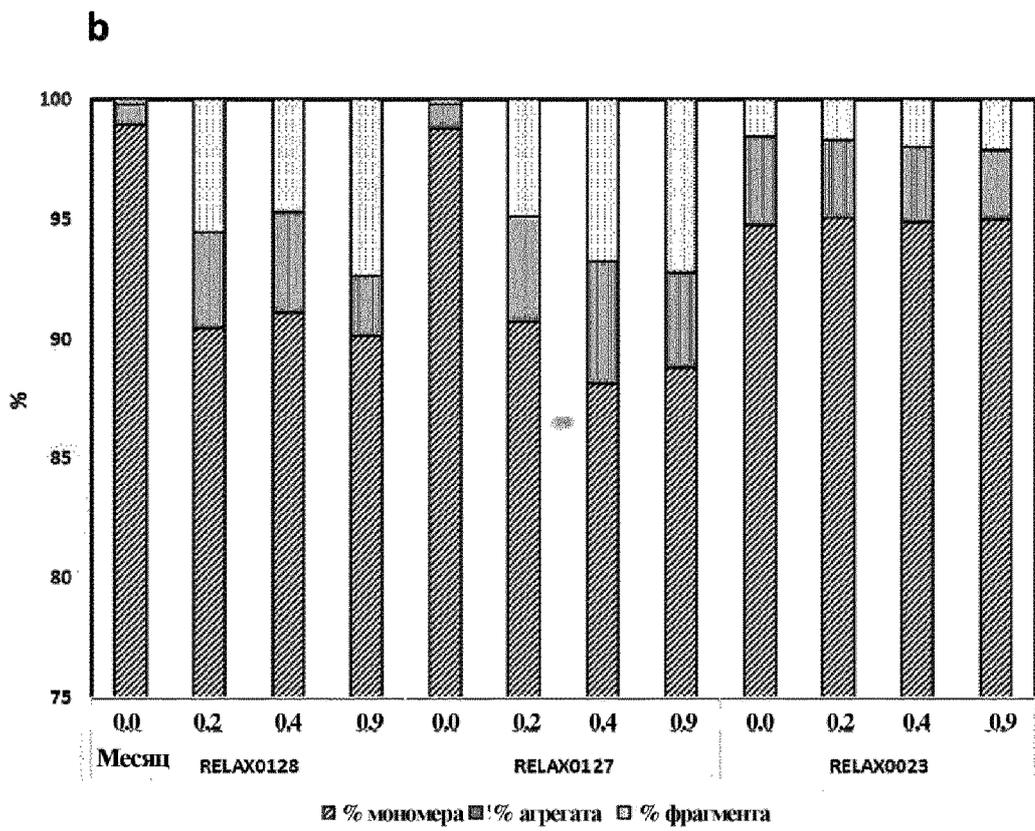
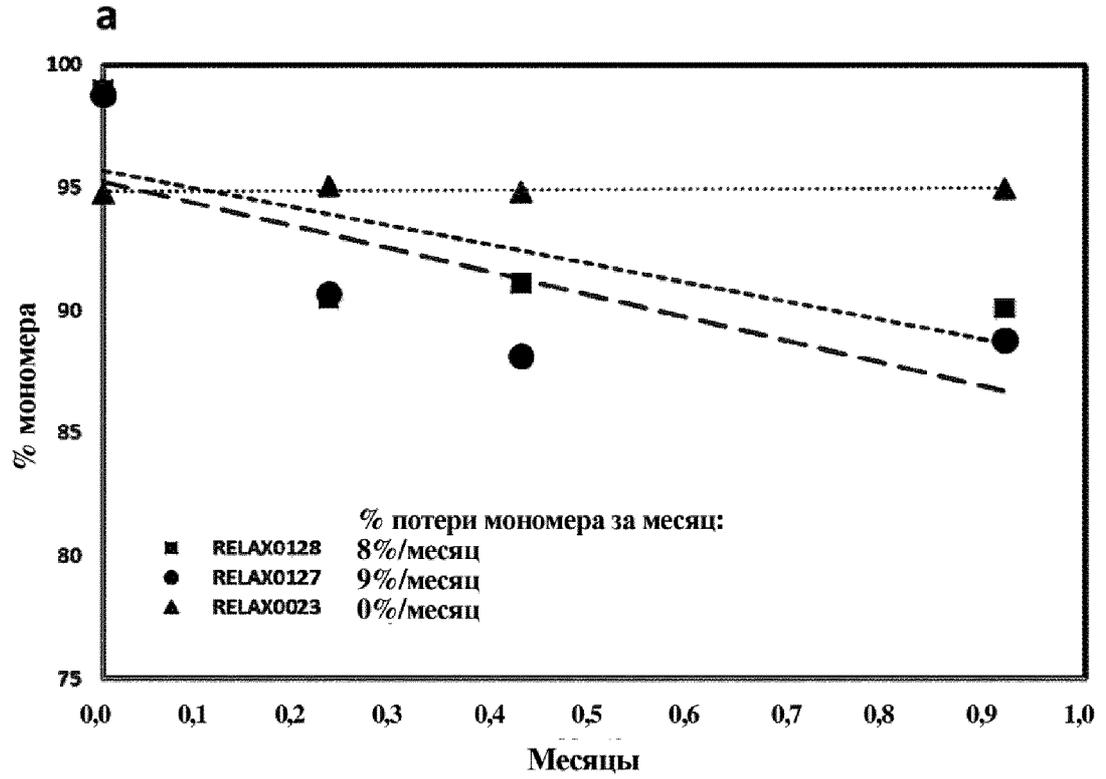


*** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ в сравнении с изопротеренолом *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ в сравнении с изопротеренолом

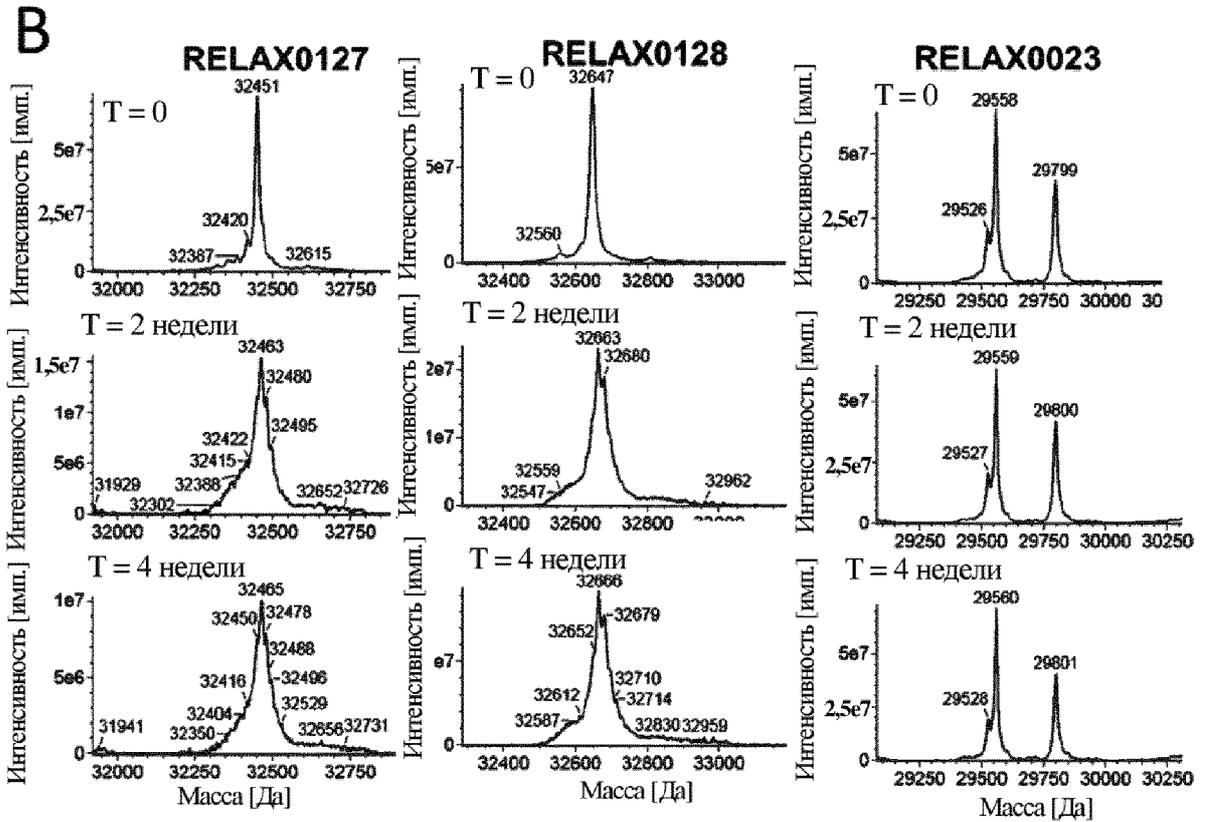
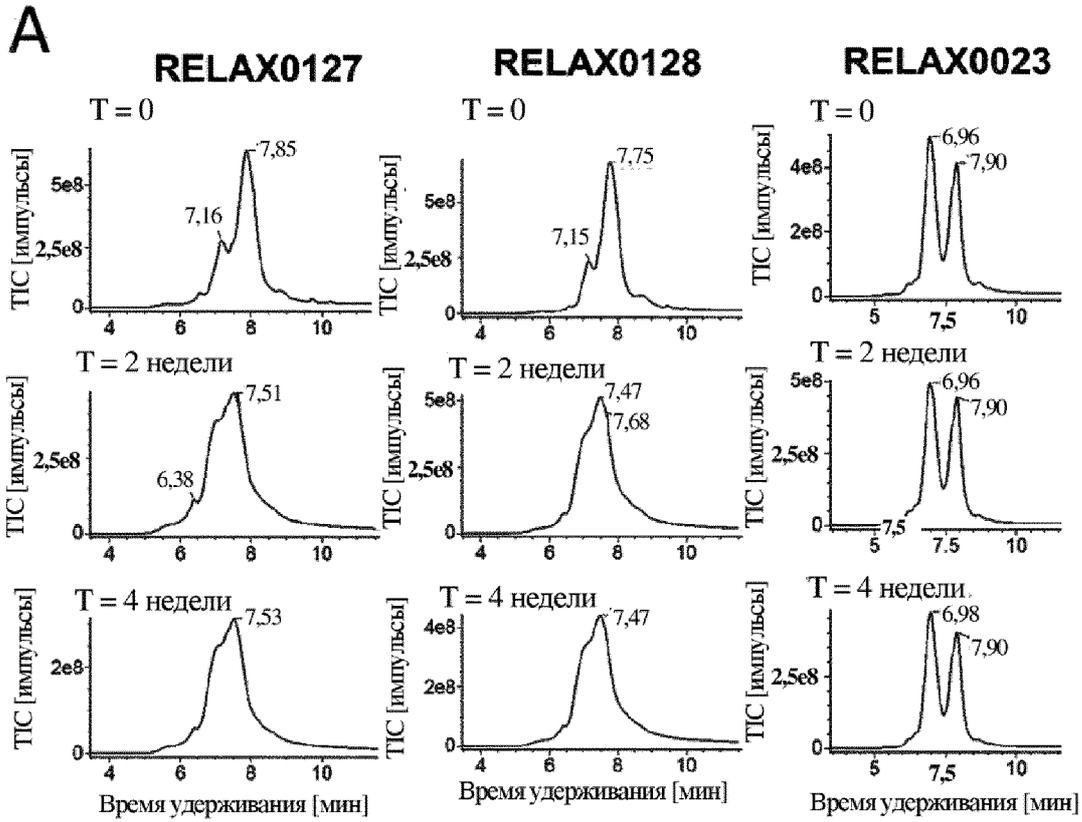
Фиг. 7



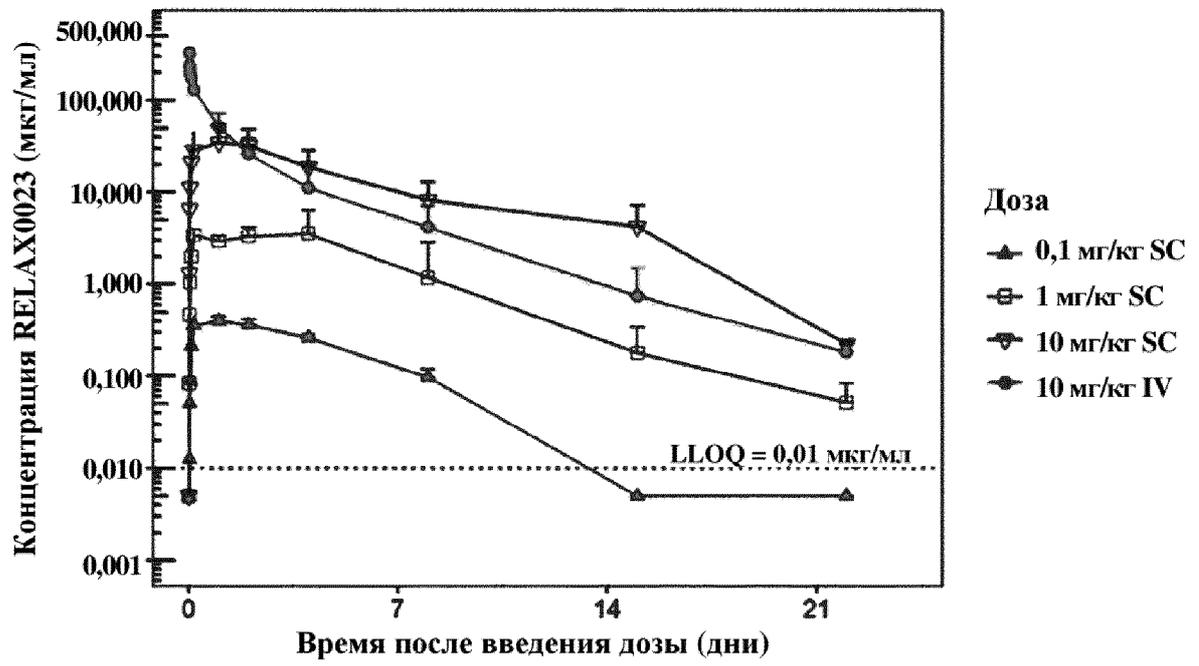
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 11



Фиг. 11**Релаксин А**

CAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTC
TGC

Релаксин В

AGCTGGATGGAAGAAGTGAATTAACCTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGC
ATGAGCACCTGGAGC

FcH01

GACAAGACCCATACATGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTACCAGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCAGACAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAAAGCTTGTCCCTGAGCCCCGGC

FcK01

GACAAGACCCATACATGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTACCAGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCTGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCAGACAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTAACCTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAAAGCTTGTCCCTGAGCCCCGGC

RELAX0010

GATAAAACCCATACCTGCCCGCCGTGCCCGGCGCCGGAAGTGTGGGCGGCCCGAGCGTGTTTCTGTTT
CCGCCGAAACCGAAAGATACCCTGATGATTAGCCGCACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
AGCCATGAAGATCCGGAAGTGAATTTAACTGGTATGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAACGCGAAAACC
AAACCGCGCGAAGAACAGTATAACAGCACCTATCGCGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGCATCAGGAT
TGGCTGAACGGCAAAGAATATAAATGCAAAGTGAAGCAACAAAGCGCTGCCGGCGCCGATTGAAAAACC
ATTAGCAAAGCGAAAGGCCAGCCGCGGAACCGCAGGTGTATACCCTGCCCGCGAGCCGCGATGAACTG
ACCAAAAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGCTTTTATCCGAGCGATATTGCGGT

Фиг. 11 (продолж.)

GGAATGGGAAAGCAACGGCCAGCCGGAAAACAACCTATAAAAACCACCCCGCCGGTGTCTGGATAGCGATGG
 CAGCTTTTTTCTGTATAGCAAACCTGACCGTGGATAAAAAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTG
 CAGCGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGAGCCCGGGCAAAGG
 CGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
 ATGCTGCCATGTGGGCTGCACCAAACGCAGCCTGGCGCGCTTTTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
 CGG
 CGG
 CGG

R1x011

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGT GGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAGCG
 CTCGCTAATAAGTGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x011b

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGT GGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAGCG
 CTCGCTAATAAGTGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x011DD

GACAAGACCCACACCTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTC
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAA

Фиг. 11 (продолж.)

AGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAG
 AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGG
 AATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCT
 CATCTTCTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCT
 CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTG
 GTGGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAG
 CGCTCGCTAATAAGTGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x012

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
 TTCCCCCAAAGGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCGACCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCTCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAGCG
 CTCGCTAATAAGTGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x012b

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
 TTCCCCCAAAGGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCGACCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCTCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCAGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAGCG
 CTCGCTAATAAGTGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x012DD

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTT
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAA

Фиг. 11 (продолж.)

AGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAG
 AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGG
 AATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCT
 CATCTTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCT
 CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTG
 GTGGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAG
 AAGTGATTAACCTGTGTGGCCGCGAAGTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGA
 GC

R1x013

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCCCTCCATGCCCCGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAA
 GTGATTAACCTGTGTGGCCGCGAAGTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x013b

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCCCTCCATGCCCCGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAA
 GTGATTAACCTGTGTGGCCGCGAAGTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x013DD

GACAAGACCCAYACMTGTCCTCCATGCCCCGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
 CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG

Фиг. 11 (продолж.)

TGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGA
 CCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG
 ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGA
 CCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGA
 TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAAT
 GGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCAT
 TCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCG
 TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTG
 GAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGC
 TCGCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x014

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAA
 GTGATTAAACTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x014b

GGAGGAGCGGGTGGAGCTTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
 TTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
 GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAA
 GTGATTAAACTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x014DD

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGG
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTG
ATTAAACTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x020

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCTGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGG
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGTGGAGGGGGCGGATCCAGCTCTACTCAGCGCTCGTAATAAGTGTGT
CATGTGGGATGCACAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x021

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGG
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGTGGAGGGGGCGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAAACTGTGTGGC
CGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x022

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGAGGTGGC
TCTGGTGGAGGGGGCGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTGTCATGTGGGATGCACA
AAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x023

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGAGGTGGC
TCTGGTGGAGGGGGCGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAAACTGTGTGGCCGCGAACTGGTGCGC
GCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x024

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGGGGC
GGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCC
AGATTCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x025

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGTGGAGGGGGC
GGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTATTAACTGTGTGGCCGCGAAGTGGTGCGCGCGCAGATTGCGATT
TGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x026

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCCTGACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGCACCTGCTCCC
GCACCAGCCCCTGCTCCCGCACCAGCCCCTGCTCCCGCACCAGCCGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x027

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGCACCTGCTCCC
GCACCAGCCCCTGCTCCCGCACCAGCCCCTGCTCCCGCACCAGCCGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTG
ATTAAACTGTGTGGCCGCGAAGTGGTGCGCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x028

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGCAGCTCCTGCT
CCCGCACCAGCCCCTGCTCCCGCACCAGCCGGATCCAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTGTG
CATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x029

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGCAGCTCCTGCT
CCCGCACCAGCCCCTGCTCCCGCACCAGCCGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAACCTGTGTGGC
CGGAACTGGTGCAGCGCAGATTGCGATTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x030

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGCACCAGCCCCT
GCTCCCGCACCAGCCGGATCCAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACA
AAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x031

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGCACCAGCCCCCT
GCTCCCGCACCAGCCGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAACCTGTGTGGCCGCGAACTGGTGGC
GCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

R1x041E

GACAAGACCCACACCGCTTGTCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATGAGTGTGTCTATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x041H

GACAAGACCCACACCGCTTGTCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATCACTGTGTCTATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x041L

GACAAGACCCACACCGCTTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGT GGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATTTGTGTTGTCATGTGGGATGCACA AAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x041M

GACAAGACCCACACCGCTTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGT GGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATATGTGTTGTCATGTGGGATGCACA AAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x044E

GACAAGACCCACACCGCTTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGT GGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATAAGTGTGTTGTCATGTGGGATGCACA AAGGAGTCTCTCGCCAGATTCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x044H

GACAAGACCCACACCGCTTGTCCCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
TCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCCTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCCTGTA CTCCAAGCTGACCCTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATAAGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCACTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x051A

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTT
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCCTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCCTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGG
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCGCTTCTGC

R1x051I

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTT
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCCTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCCTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGG
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCATCTTCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x051M

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCATGTTCTGC

R1x051Q

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGTTCTGC

R1x051S

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCCTCCTTCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x051Y

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCTACTTCTGC

R1x052E

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGAGAGTGC

R1x052I

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCCCTGTTCC
CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGAATCTGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x055

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTC
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
 GAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
 TTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGAA
 AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCTCCTGGATGGAGGAGGTT
 ATCAAGCTGTGTGGACGCGAACTGGTGC GCGCTCAGATCGCGATATGCGGGATGTCCACATGGTCAGGC
 GCGGGCAGCGGCGGCGGCGGAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTGTGCATGTGGGATGC
 ACAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x056

GACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTC
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCCAGCCGGGAAGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
 GAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
 TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGAA
 AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCTCCTGGATGGAGGAGGTT
 ATCAAGCTGTGTGGACGCGAACTGGTGC GCGCTCAGATCGCGATATGCGGGATGTCCACATGGTCAGGC
 GCGGGCAGCGGCGGCGGCGGAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAGTGTGTGCATGTGGGATGC
 ACAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x061H

TCCTGGATGGAAGAAGTGATCAAGCTCTGCGGCAGAGAACTCGTGCGGGCCAGATCGCTATCTGCGGC
 ATGTCTACTTGGAGCGCGGCCGCGGGTGGAGGTGGATCCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGAGGTGGAAGC
 GGAGGAGGTGGAAGCGCTTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAG
 ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCCAGCCGGGAAGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCCCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
 TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTC

Фиг. 11 (продолж.)

CGACGGCTCATTTCTTCTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT
 CTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCCCTGAGCCCCGG
 C

R1x062K

CAGCTGTACTCTGCCCTGGCCAACAAGTGTGGCCACGTGGGCTGCACCAAGAGATCCCTGGCCAGATTC
 TGTGCGGCCGCGGGTGGAGGTGGATCCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGAGGTGGA
 AGCGCTTGTCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCACCCCAAAG
 CCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAG
 GACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA
 GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC
 GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAG
 GCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTAAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGTCCAAC
 GGCCAGCCCAGAAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTAC
 TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAG
 GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCCCTGAGCCCCGGC

R1x076

CAGCTGTACTCTGCCCTGGCCAACAAGTGTGGCCACGTGGGCTGCACCAAGAGATCCCTGGCCAGATTC
 TGTGCGGCCGCGGGTGGAGGTGGATCCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGAGGTGGA
 AGCGCTTGTCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCACCCCAAAG
 CCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAG
 GACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA
 GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC
 GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAG
 GCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTAAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGTCCAAC
 GGCCAGCCCAGAAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTAC
 TCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAG
 GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGAAAGCGGAGGA
 GGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTCGCTAATAAG
 TGTGTGTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTTCTGC

R1x077

TCCTGGATGGAAGAAGTGAATCAAGCTCTGCGGCAGAGAACTCGTGCGGGCCAGATCGCTATCTGCGGC
 ATGTCTACTTGGAGCGCGGCCGCGGGTGGAGGTGGATCCGGAGGAGGTGGAAGCGGAGGAGGTGGAAGC
 GGAGGAGGTGGAAGCGCTTGTCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGT
 TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGTCCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
 ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCAT

Фиг. 11 (продолж.)

CGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCG
 GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC
 TGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGA
 CGGCTCATTCCTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTC
 CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGG
 AGGTGGTGGGAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGGAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGAT
 GGAAGAAGTGATTAACCTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCAC
 CTGGAGC

R1x014DDdel2aa

GACAAGACCCACACCTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTC
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGACAACGCCAAGACC
 AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGAAGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
 GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
 TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGG
 AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGGAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTG
 ATTAACCTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACC

R1x014DDdel3aa

GACAAGACCCACACCTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTC
 CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
 TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGACAACGCCAAGACC
 AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAGACC
 ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGAAGAGATG
 ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
 GAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
 TTCCTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGG
 AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGGAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAAGTG
 ATTAACCTGTGTGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGC

R347R1x011DD

GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCAGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACA
 ACCTCTGGATTACCTTTAACACGTATGCCATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAA
 TGGCTCTCAGGTATTAATAACAATGGTCCGACTGCATTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTC

Фиг. 11 (продолж.)

R347 L

GAGCTCGTGTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACT
 GGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCC
 AAACATCATGATTTATGATGTCAGTAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCT
 GGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCA
 TATACAAGCAGCAGCACTTTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCTAGGTGAGCCCAAGGCT
 GCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGT
 CTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCG
 GGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTG
 ACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG
 AAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

RELAX0126

GATAAAACCCATACCTGCCCGCCGTGCCCGGCGCCGGAAGTCTGGGCGGCCCGAGCGTGTTCCTGTTTT
 CCGCCGAAACCGAAAGATACCCTGATGATTAGCCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
 AGCCATGAAGATCCGGAAGTGAATTTAACTGGTATGTGGATGGCGTGGAAAGTGCATAACGCGAAAACC
 AAACCGCGCGAAGAACAGTATAACAGCACCTATCGCGTGGTGGAGCTGCTGACCGTGTCTGCATCAGGAT
 TGGCTGAACGGCAAAGAATATAAATGCAAAGTGAGCAACAAGCGCTGCCGGCGCCGATTGAAAAACC
 ATTAGCAAAGCGAAAGGCCAGCCGCGCGAACCAGGTGTATACCCTGCCGCCGAGCCGCGATGAACTG
 ACCAAAAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTAAAAGGCTTTTATCCGAGCGATATTGCGGTGGAATGG
 GAAAGCAACGGCCAGCCGGAAAACAACATAAAAACCACCCCGCCGGTGTGGATAGCGATGGCAGCTTT
 TTTCTGTATAGCAAACCTGACCGTGGATAAAAAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTG
 ATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGAGCCCGGGCAAAGCGGCAGC
 CCGCAGCTGTATAGCGCGCTGGCGAACAATGCTGCCATGTGGCTGCACCAAACGCAGCCTGGCGCGC
 TTTTGCGGGCGGCAGCGCGCGGCAGCGGCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAACTGTGTGGCCGC
 GAACTGGTGCAGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

RELAX0127

GATAAGACACACACCTGTCCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGTCTCGGCGGACCCTCTGTGTTCCCTGTTT
 CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
 TCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGAT
 TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACC
 ATCTCCAAGGCTAAGGGCCAGCCTCGGGAACCTCAGGTTTACACACTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTG
 ACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGG
 GAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAACATAAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
 TTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGTTCTGTG
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTGTCCCCTGGAAAAGCGGTTCT
 GGTGGCTCTCCTCAGCTGTACTCTGCCCTGGCCAACAAGTGTGTCACGTGGGCTGCACCAAGCGGTCC
 CTGGCTAGATTTTGTGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGATCCGGCTCTGGATGGAAGAGGTTATCAAGCTG
 TCGGGCAGAGAAGTCTGTGGGGCCAGATCGCTATCTGTGGCATGTCCACCTGGTCC

Фиг. 11 (продолж.)

RELAX0128

GATAAGACACATACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTC
CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
TCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAT
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCCTCCATCTCGGGACGAGCTG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGG
GAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAAGGTGGCAGC
GGAGGTTCGGGAGGATCTCCTCAGCTGTACTCTGCCCTGGCCAACAAGTGTGCCACGTGGGCTGCACC
AAGAGATCCCTGGCCAGATTTTGTGGCGGCGGATCTGGCGGAGGTTCCGGCTCTTGGATGGAAGAAGTG
ATCAAGCTCTGCGGCAGAGAACCTCGTGCGGGCCAGATCGCTATCTGCGGCATGTCTACCTGGTCC

RELAX0009

TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAAC
TCCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCC
CGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAAC
AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTG
GACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC
TACACCCAGAAGTCTCTGTCCCTGAGCCCCGGC

R1x014d

GACAAGACCCACACCGCTTGTCTCCATGCCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCTTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTGCACACTGCCCCCAGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGTGCGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCTTGGTGTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCCTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGGAAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCAGCTGGATGGAAGAA
GTGATTAACCTGTGTGGCCGCGAAGTGGTGCAGCAGATGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGAGC

Фиг. 11 (продолж.)

R1x042R

GACAAGACCCACACCGCTTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAA
TGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA
TTCTTCCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGT
GGAAGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCG
CTCGCTAATAAGTGTTCGAGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGATTCTGC

R1x052A

GACAAGACCCACACCTGTCCCTCCATGCCCGGCGCCTGAGTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTT
CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGAC
TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCATCGAAAAGACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTGCCGGGAAGAGATG
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGG
GAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTC
TTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTAAGCTTGAGCCCCGGCGGAGGTGGTGGGA
AGCGGAGGAGGTGGCTCTGGAGGGGGTGAAGCGGAGGTGGAGGTGGATCCCAGCTCTACTCAGCGCTC
GCTAATAAGTGTTCATGTGGGATGCACAAAGCGGTCTCTCGCCAGAGCGTGC