



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95446 (13) C2  
(51) МПК  
C12N 9/12 (2006.01)  
A61K 38/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) МУТАЦІЇ В ГЕНАХ OAS1

1

2

(21) a200713492  
(22) 03.05.2006  
(24) 10.08.2011  
(86) PCT/US2006/016983, 03.05.2006  
(31) 60/677,680  
(32) 04.05.2005  
(33) US  
(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.  
(72) ІАДОНАТО ШОН П., US, МАГНЕСС ЧАРЛЬЗ Л., US, ШЕРЕР КРІСТІНА А., US, ФЕЛЛІН П. КАМ-ПЬОН, US, ОЛСОН ЕМІ, US  
(73) ІЛЛЮМІДЖЕН БАЙОСАЙЄНСІЗ, ІНК., US  
(56) HAMANO E ET AL: "Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 329, no. 4, 22 April 2005 (2005-04-22), pages 1234-1239.  
MASHIMO T ET AL: "A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 99, no. 17, 20 August 2002 (2002-08-20), pages 11311-11316.  
(57) 1. Білок олігоаденілатсинтетази 1, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO:

1, де метіонін в положенні 1 видалений, і амінокислотою в положенні 162 є гліцин.  
2. Терапевтична композиція для лікування вірусної інфекції у ссавця або для лікування раку у ссавця, де вказана композиція містить фармацевтично прийнятний носій і білок олігоаденілатсинтетази 1 за пунктом 1.  
3. Терапевтична композиція за п. 2, в якій вірус є флавівірусом.  
4. Терапевтична композиція за п. 2, в якій вірус є вірусом гепатиту С.  
5. Терапевтична композиція для лікування раку у ссавця, де вказана композиція являє собою поліпептид за п. 1 разом з фармацевтично прийнятним носієм.  
6. Терапевтична композиція за п. 5, у якій злоякісна пухлина являє собою рак простати.  
7. Спосіб для лікування вірусного захворювання або раку в ссавця, який включає надання суб'єкту, що потребує такою лікування, терапевтичної композиції за п. 2.  
8. Терапевтична композиція за п. 2, де терапевтична сполука забезпечується як частина набору.  
9. Терапевтична композиція за п. 8, де набір включає одну або більше інструкцій для використання терапевтичної композиції або етикетку, або вкладиш, що визначає дозвіл регуляторного органу для використання терапевтичної композиції.  
10. Полінуклеотид, що кодує білок за п. 1.

Даний винахід стосується способу виявлення мутації в гені олігоаденілатсинтетази людини або приматів, які не є людьми, і білків OAS1, що мають принаймні одну амінокислотну модифікацію.

До цього часу був виявлений ряд хвороб, при яких у людській популяції існує природна стійкість до інфекційних захворювань. Alter і Moyer, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol. 18 Suppl. 1:S6-10 (1998), зазначають, що вірусний гепатит С (HCV) може становити до 90% у групах підвищеного ризику, наприклад, у людей, що одержують ін'єкції. Проте, механізм, за рахунок якого 10%, що залишилися, очевидно, стійкими до інфе-

кції не був описаний у літературі. Білки, які беруть участь у зараженні HCV, містять у собі 2'-, 5'-олігоаденілатсинтетази. OAS являють собою білки, що індукуються інтерфероном, які відрізняються своєю здатністю каталізувати синтез 2'-, 5'-олігомерів аденозину (2-5As). Hovanessian et al., EMBO 6:1273-1280 (1987) виявили, що клітини людини, оброблені інтерфероном, містять у собі деяку кількість OAS, що відповідають білкам 40 (OAS1), 46 (OAS1), 69 і 100 кДа. Marie et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:580-587 (1989) створили високоспецифічні поліклональні антитіла проти р69, OAS розміром 69 кДа. За до-

C2  
(13)

95446  
(11)

UA  
(19)

помогою скринування експресійної бібліотеки клітин людини, оброблених інтерфероном, з антитілами проти р69, Marie і Hovanessian, J. Biol. Chem. 267:9933-9939 (1992) була виділена неповна кДНК OAS2. Також зазначеними авторами минулого проскринувані додаткові бібліотеки з неповною кДНК і виділені кДНК, що кодують дві ізоформи OAS2. Меншу ізоформу кодують дві мРНК, які розрізняються довжиною 3'-нетрансльовані ділянки.

Дослідження за допомогою нозерн-блоту виявило, що OAS2 експресується в клітинах людини у вигляді чотирьох індукованих інтерфероном мРНК. Виведені послідовності для білків OAS2 були загальними і склалися з 683 амінокислот з різними 3'-кінцями. Згідно з даними SDS-PAGE продуктів транскрипції/трансляції *in vitro* дві ізоформи мають молекулярні маси 69 і 71 кДа. Обидві ізоформи проявляють активність OAS *in vitro*. Аналіз послідовності показав, що OAS2 містить у собі домени, гомологічні OAS1, розділені за допомогою передбачуваної багатой проліном лінкерної ділянки. N- і C-термінальні домени схожі з OAS1 на 41% і 53%, відповідно.

За допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* і шляхом включення в картировані клони, Hovanian et al., Genomics 52:267-277 (1998) встановили, що гени OAS1, OAS2 і OAS3 кластеризуються на ділянці в 130 п.о. на 12q24.2. 2-5As зв'язуються із РНКазою I, яка руйнує віруси і клітинні РІЖ, та активують її, призводячи до інгібування синтезу клітинного білка та зниженню вірусної реплікації.

Четвертий ген OAS, названий OASL, відрізняється від OAS1, OAS2 і OAS3 тим, що в нього відсутня ферментативна активність. Ген OASL кодує дводомений білок, що складається із субдиниці OAS, злитої з C-термінальним доменом із 164 амінокислот, що гомологічний тандемному повтору убіквітину (Eskildsen and al., Nuc. Acids Res. 31:3166-3173, 2003; Kakuta et al., J. Interferon & Cytokine Res. 22:981-993, 2002).

Внаслідок ролі OAS1 в інгібуванні вірусної реплікації та вірусної інфекції, у даній галузі існує потреба в способах і композиціях, які пригнічують вірусну реплікацію внаслідок активності OAS1, включаючи надзвичайну потребу в основаній на інгібуванні терапії, що пригнічує реплікацію HCV.

Даний винахід стосується виявлення мутацій, пов'язаних зі стійкістю до гепатиту С, які можна охарактеризувати як мутації в гені олігоаденілатсинтети 1.

В одному із варіантів здійснення винахід стосується способу генетичного скринування. Спосіб включає аналіз зразка нуклеїнової кислоти, виділеної в людини і приматів, які не є людьми, на наявність мутації в гені олігоаденілатсинтети 1, що викликає амінокислотну модифікацію в одному або декількох положеннях: 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 і 335 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1 (OAS1) (включаючи без обмеження SEQ ID NO:1).

В іншому варіанті здійснення винахід стосується способу генетичного скринінгу. Спосіб включає аналіз зразка нуклеїнової кислоти, виділеної в людини і приматів, які не є людьми, на наявність мутації в гені олігоаденілатсинтети 1, що викликає амінокислотну модифікацію в положенні 363 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_002525.1 (включаючи без обмеження SEQ ID NO:3).

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується способу генетичного скринінгу. Спосіб включає аналіз зразка нуклеїнової кислоти, виділеної в людини або приматів, які не є людьми, на наявність мутації в гені олігоаденілатсинтети 1, що викликає амінокислотну модифікацію в одному або декількох амінокислотних положеннях: 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 або 394 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером в Genebank NP\_058132.1 (включаючи без обмеження SEQ ID NO:2).

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується способу генетичного скринінгу. Спосіб включає аналіз зразка нуклеїнової кислоти, виділеної в людини або приматів, які не є людьми, на наявність мутації в гені олігоаденілатсинтети 1, що викликає амінокислотну модифікацію в одному або декількох амінокислотних положеннях: 347, 361, 364, 372, 384, 385 або 399 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP001027581.1 (включаючи без обмеження SEQ ID NO:4).

У наступному варіанті здійснення даний винахід стосується білка, що має принаймні одну амінокислотну модифікацію в положеннях 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 10250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 і 335 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1 (OAS1) (включаючи без обмеження SEQ ID NO:1), і застосування зазначеного білка для створення засобу для діагностики стійкості до вірусної інфекції, переважно, до флавівірусної інфекції, найбільш переважно, до гепатиту С. У певних варіантах здійснення діагностичний засіб являє собою антитіло.

В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується білка OAS1, що має амінокислотну модифікацію в положенні 363 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_002525.1 (включаючи без обмеження SEQ ID NO:3), і застосування зазначеного білка для створення засобу для діагностики стійкості до вірусної інфекції, переважно, до флавівірусної інфекції, найбільш переважно, до гепатиту С. У певних варіантах здійснення діагностичний засіб являє собою антитіло.

У додатковому варіанті здійснення даний винахід стосується білка OAS1, що має принаймні

одну амінокислотну модифікацію в положеннях 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 382, 388, 389 і 394 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером NP\_058132.1 у Genebank (включаючи без обмеження SEQ ID NO:2), і застосування зазначеного білка для створення засобу для діагностики стійкості до вірусної інфекції, переважно, до флавівірусної інфекції, найбільш переважно, до гепатиту С. У певних варіантах здійснення діагностичний засіб являє собою антитіло.

У ще одному з варіантів здійснення даний винахід стосується білка OAS1, що має принаймні одну амінокислотну модифікацію в положеннях 347, 361, 364, 372, 384, 385 або 399 у всіх формах олігоаденілатсинтети 1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP001027581.1 в Genebank (включаючи без обмеження SEQ ID NO:4), і застосування зазначеного білка для створення засобу для діагностики стійкості до вірусної інфекції, переважно, до флавівірусної інфекції, найбільш переважно, до гепатиту С. У певних варіантах здійснення діагностичний засіб являє собою антитіло.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується терапевтичного засобу для профілактики або інгібування вірусної інфекції, переважно, флавівірусної, найбільш переважно, вірусного гепатиту С, де терапевтичний засіб являє собою білок, що має принаймні одну амінокислотну модифікацію за винаходом. В інших варіантах здійснення терапевтичний засіб є полінуклеотидом, таким як ДНК або РНК, що кодує білок.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується терапевтичного засобу для профілактики або інгібування вірусної інфекції, переважно, флавівірусної, найбільш переважно, вірусного гепатиту С, де терапевтичний засіб являє собою білок, кодований OAS1 за винаходом, що має одну або декілька описаних амінокислотних модифікацій.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується терапевтичного засобу для профілактики або інгібування вірусної інфекції, переважно, флавівірусної, найбільш переважно, вірусом гепатиту С, де терапевтичний засіб відтворює сприятливий вплив принаймні однієї мутації за винаходом. Терапевтичний засіб може бути малою молекулою, білком, пептидом, молекулою ДНК або РНК, або антитілом.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується терапевтичного засобу для профілактики або лікування раку, переважно, раку простати, де терапевтичний засіб являє собою білок, кодований геном OAS1, що має принаймні одну мутацію за винаходом. В інших варіантах здійснення терапевтичний засіб являє собою полінуклеотид, що кодує даний білок, а саме ДНК або РНК.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується терапевтичного засобу для профілактики або лікування раку, переважно, раку простати, де терапевтичний засіб являє собою білок OAS1, що

має принаймні одну амінокислотну модифікацію за винаходом.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується терапевтичного засобу для профілактики або лікування раку, переважно, раку простати, де терапевтичний засіб відтворює сприятливий вплив принаймні однієї мутації за винаходом. Терапевтичний засіб може бути малою молекулою, білком, пептидом, молекулою ДНК або РНК, або антитілом.

У ще одному варіанті здійснення терапевтичний засіб здатний інгібувати активність OAS1 або принаймні однієї ділянки, або одну функцію повнорозмірного білка, і такі засоби представлені антисмисловими молекулами, рибозимами і молекулами РНКі, здатними специфічно зв'язуватися з полінуклеотидами OAS1 і здатними за допомогою антитіл та їхніх фрагментів специфічно зв'язуватися з білками і поліпептидами OAS1.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується інгібіторів OAS1. Інгібітори за винаходом включають, але не обмежуються ними, антисмислові молекули, рибозими, РНКі, антитіла або фрагменти антитіла, білки або поліпептиди, а також малі молекули. Приклади антисмислових молекул включають принаймні 10, 15 або 20 послідовних нуклеотидів, або нуклеотидів, які гібридизуються в жорстких умовах із полінуклеотидом, який кодує OAS1, що має принаймні одну амінокислотну модифікацію за винаходом.

У ще одному варіанті здійснення інгібітори OAS1 специфічно зв'язуються з ділянкою білка, визначеною як поліпептид OAS1, що має амінокислотну модифікацію за винаходом. Інгібітори за винаходом включають, але не обмежуються ними, антитіла, фрагменти антитіла, малі молекули, білки або поліпептиди.

У ще одному додатковому варіанті здійснення інгібітори OAS1 складаються з антисмислових молекул або молекул РНКі, які специфічно зв'язуються або гібридизуються з полінуклеотидом, що кодує білок OAS1, який має принаймні одну амінокислотну модифікацію за винаходом.

У додаткових варіантах здійснення винахід стосується композицій, що містять один або декілька інгібіторів OAS1 у фармацевтично прийнятному носії.

Додаткових варіантів здійснення стосуються способи зниження експресії гена OAS1 або біологічної активності.

Додаткових варіантів здійснення стосуються способи специфічного збільшення або зменшення експресії деяких форм гена OAS1, що має принаймні одну мутацію, що розкрита у даному винаході.

Винахід стосується антисмислового олігонуклеотиду, що містить принаймні один модифікований міжнуклеозидний зв'язок.

Винахід також стосується антисмислового олігонуклеотиду, що має фосфоротіоатний зв'язок.

Більше того, винахід стосується антисмислового олігонуклеотиду, що містить принаймні одну модифіковану цукрову групу.

Також винахід стосується антисмислового олігонуклеотиду, що містить принаймні одну модифі-

ковану цукрову групу, що являє собою 2'-О-метильовану цукрову групу.

Крім того, винахід стосується антисмислового олігонуклеотиду, що містить принаймні одну модифіковану нуклеїнову основу.

Більше того, винахід стосується антисмислового олігонуклеотиду, що має модифіковану нуклеїнову основу, де модифікована нуклеїнова основа являє собою 5-метилцитозин.

Також винахід стосується антисмислової сполуки, де антисмислова сполука являє собою химерний олігонуклеотид.

Винахід стосується способу інгібування експресії OAS1 людини у клітинах або тканинах людини, що включає приведення в контакт *in vivo* клітин або тканин і антисмислової сполуки або рибозиму довжиною від 8 до 35 нуклеотидів, спрямованого на молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує OAS1 людини, у результаті чого відбувається інгібування експресії OAS1 людини.

Крім того, винахід стосується способу зниження або збільшення експресії *in vivo* певних форм OAS1 за допомогою застосування антисмислових сполук або сполук РНКі, або рибозимів, такі форми характеризуються тим, що мають принаймні одну мутацію в положенні за даним винаходом.

Даний винахід стосується способу модулювання росту ракових клітин, що включає приведення в контакт *in vivo* ракових клітин та антисмислової сполуки або рибозиму довжиною від 8 до 35 нуклеотидів, спрямованих на молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує OAS1 людини, у результаті чого відбувається інгібування експресії OAS1 людини.

Більше того, винахід стосується ідентифікації ділянок-мішеней полінуклеотидів OAS1. Також винахід стосується мічених зондів для розпізнавання полінуклеотидів OAS1 за допомогою гібридизації *in situ*.

Винахід стосується застосування інгібітора OAS1 за даним винаходом для одержання лікарського засобу для профілактики або інгібування інфекції HCV.

Винахід також стосується орієнтування інгібітора OAS1 на конкретні ділянки білка OAS1 або на конкретні функції зазначеного білка.

Також винахід стосується фармацевтичної композиції для інгібування експресії OAS1, що містить антисмисловий олігонуклеотид за винаходом у суміші з фізіологічно прийнятним носієм або розріджувачем.

Винахід стосується рибозиму, здатного специфічно розщеплювати РНК OAS1, і фармацевтичної композиції, що містить рибозим.

Також винахід стосується низькомолекулярних інгібіторів OAS1, де зазначені інгібітори здатні знижувати активність OAS1 або знижувати або запобігати експресії мРНК OAS1.

Винахід також стосується інгібіторів OAS1, які змінюють специфічні функції білка за винятком синтезу 2'-5'-олігоаденілатів, такі функції включають взаємодію з іншими білками, такими як білок NS5A вірусу гепатиту С.

Винахід стосується сполук, які вносять зміни в посттрансляційні перетворення OAS1, включаючи,

але цим не обмежуючись, глікозилювання і фосфорилування.

Крім того, винахід стосується способу генетичного скринування людини для ідентифікації мутації в гені олігоаденілатсинтетази, що включає (a) проведення (в умовах ампліфікації) на зразку геномної ДНК людини полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із парою праймерів для ампліфікації ділянки геномної ДНК людини, що містить принаймні одну мутацію гена OAS1 за винаходом, зазначений вплив дає продукт ампліфікації, що містить у собі згадану ділянку; і (b) виявлення в продукті ампліфікації з пункту (a) наявності нуклеотидної мутації в нуклеотидному положенні за винаходом, у такий спосіб ідентифікуючи згадану мутацію.

Також винахід стосується способу виявлення в людини алелю стійкості до зараження гепатитом С, що містить мутацію, яка включає в себе заміну нуклеотиду, що не є нуклеотидом дикого типу, на нуклеотид дикого типу в нуклеотидному положенні, що відповідає амінокислотній модифікації за винаходом у білку OAS1, що кодується геном олігоаденілатсинтетази (OAS1), де спосіб включає (a) одержання суміші для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за допомогою об'єднання в буфері для ПЛР зразка геномної ДНК вищезгаданої людини і специфічної пари ПЛР-праймерів на ген олігоаденілатсинтетази; (b) проведення безлічі циклів ПЛР ПЛР-суміші для одержання продукту ампліфікації гена олігоаденілатсинтетази; і (c) обробку в гібридизаційних умовах продукту одержаного в пункті (b) зондом, здатним виявляти згадану мутацію.

Також винахід стосується виділеного інгібітора OAS1, вибраного із групи, яка складається з антисмислового олігонуклеотиду, рибозиму, малої інгібуючої РНК (RNAi), білка, поліпептиду, антитіла і малої молекули. Виділений інгібітор може бути антисмисловою молекулою або її комплексом, що містить принаймні 15 послідовних нуклеїнових кислот полінуклеотидної послідовності, що відповідає мутації гена OAS1, пов'язаній з амінокислотою заміною за винаходом.

Виділений інгібітор OAS1 може бути вибраний із групи, що складає з антитіла і фрагмента антитіла. Також винахід стосується композиції, що складається з терапевтично ефективного кількості принаймні одного інгібітора OAS1 у фармацевтично прийнятному носії.

Також винахід стосується способу інгібування експресії OAS1 у клітині ссавця, що включає введення в клітину інгібітора OAS1, вибраного із групи, яка складається з антисмислового олігонуклеотиду, рибозиму, білка, РНКі, поліпептиду, антитіла і малої молекули.

Крім того, винахід стосується способу інгібування в індивіда експресії гена OAS1, що включає введення індивідові разом із фармацевтично ефективним носієм антисмислового олігонуклеотиду в кількості, що є ефективною для специфічної гібридизації з усією вибраною послідовністю-мішенню нуклеїнової кислоти, одержаною з вищезгаданого гена OAS1, або з її частиною.

Більше того, винахід стосується способу профілактики зараження флавівірусом обстежуваної



людини, схильної до зараження, що включає введення обстежуваній людині інгібітора OAS1, вибраного із групи, яка складається з антисмислового олігонуклеотиду, рибозиму, РНКі, білка, поліпептиду, антитіла і малої молекули, де зазначений інгібітор OAS1 запобігає зараженню вищезгаданим флавівірусом.

На фіг. 1 представлена амінокислотна послідовність терапевтичної форми білка OAS1 (SEQ ID NO:1).

На фіг. 2 представлена таблиця амінокислотних замінів, які можуть використовуватися у всіх терапевтичних формах OAS1.

На фіг. 3 представлена таблиця амінокислотних модифікацій OAS1 приматів, які можуть використовуватися в терапевтичних формах OAS1. Положення, відзначені \*, стосуються форм OAS1, які на карбоксильному кінці є гомологічними послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_002525.1. Положення, відзначені +, стосуються форм OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_0581321. Положення, відзначені ^, стосуються форм OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_001027581.1.

На фіг. 4 представлена таблиця, у якій зазначені положення мутацій у генах OAS1 приматів і відповідні амінокислотні модифікації.

На фіг. 5 представлений список додаткових ізоформ OAS1 за даним винаходом, включаючи форми OAS1 людини і приматів, які не є людьми. Також надані мутації ізоформ OAS1 приматів. Ці ізоформи, або окремо, або разом з будь-якими мутаціями, ідентифікованими у даному винаході, можуть бути використані для діагностичних, терапевтичних та інших зазначених в описі цілей.

Даний винахід стосується нових мутацій у гені олігоаденілатсинтети 1, застосування цих мутацій для діагностики схильності або стійкості до вірусної інфекції, до білків, що кодуються геном, який має мутацію за винаходом, і профілактики або інгібування вірусної інфекції, використовуючи білки, антитіла і нуклеїнові кислоти, що їх стосуються. Ці мутації пов'язані зі стійкістю носія до зараження флавівірусом, зокрема, вірусом гепатиту С.

У цей час значна частина досліджень в галузі медицини сфокусована на ідентифікації мутацій і дефектів, які викликають захворювання або вносять вклад у його розвиток. Також дослідження призначені для розробки сполук і способів лікування, спрямованих на ці хворобливі стани. Менша увага спрямована на вивчення генетичних факторів, які дозволяють людям залишатися здоровими, незважаючи на вплив збудників інфекції та інших факторів ризику. Даний винахід стосується успішного застосування способу, розробленого авторами винаходу, за допомогою якого визначається і досліджується задана кількість випробуваних людей для того, щоб виявити генетичні зміни або мутації, які забезпечують стійкість до захворювання. Більше того, ідентифікація субпопуляційної частини, що має природну стійкість до конкретного захворювання або біологічного стану,

дає можливість ідентифікувати гени і білки, які являють собою придатні мішені для фармацевтичного впливу, діагностичної оцінки або профілактичних мір, таких як профілактична вакцинація.

Раніше субпопуляційна частина була виявлена та описана в одночасно розглянутій заявці з порядковим номером 10/972135 і включала індивідумів, які незважаючи на повторний вплив вірусу гепатиту С (HCV) проте залишалися серологічно негативними, у той час як інша група людей інфікувалася (серологічно позитивні). Досліджені популяції включали пацієнтів із гемофілією, яким проводять кількаразове переливання крові, і людей, що одержують внутрішньовенні лікарські препарати, які піддаються небезпеці через використання загальних голок та інших факторів ризику.

Дана заява стосується мутацій, виявлених у генах OAS1 приматів, які не є людьми, як описано в прикладі 1.

У заявці з номером 10/972135 розкриті дані, що стосуються HCV-інфекції; визначення; способів застосування винаходу; аналізу полінуклеотидів; одержання полінуклеотидних праймерів; полімеразної ланцюгової реакції; аналізу послідовності нуклеїнової кислоти; виявлення іммобілізованих на мембрані послідовностей-мішеней; скануючих методик для виявлення замінів основ; терапевтичних агентів для відновлення і/або посилення роботи OAS1; терапевтичних речовин для інгібування функції OAS1; рибозимів; РНКі; білків і поліпептидів; малих молекул; способів оцінки ефективності інгібіторів OAS1 і фармацевтичних композицій. Опис заявки з порядковим номером 10/972135 включений у даний винахід у вигляді посилання в повному обсязі.

Природна функція поліпептидів за даним винаходом дозволяє їм проходити через клітинну мембрану, і опосередковувати противірусні ефекти за відсутності вектора доставки або експресійного носія. Раніше були описані властивості клітинної трансдукції основних, позитивно заряджених білків, і вони добре відомі фахівцям у даній галузі (Ryser and Hancock, Science. 1965 Oct22; 150(695):501-3).

У випадку, коли поліпептиди одержані у вигляді рідкої композиції та вводяться шляхом ін'єкції, переважно, щоб розчин був ізотонічним сольовим розчином, що містить 140 мілімолярний хлорид натрію та 10 мілімолярний кальцій при рН 7,4. Ін'єкцію можна вводити, наприклад, у терапевтично ефективній кількості, переважно, у дозуванні приблизно від 1 мкг/кг маси тіла до приблизно 5 мг/кг маси тіла щодня, беручи до уваги шляхи введення, загальний стан пацієнта і т.д.

Поліпептид(и) за даним винаходом можуть застосовуватися в сполученні з придатним фармацевтичним носієм. Також композиції містять у собі терапевтично ефективну кількість білка і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт. Такий носій включає, але ними не обмежується, фізіологічний розчин, забуферений фізіологічний розчин, декстрозу, воду, гліцерин, етанол та їхні комбінації. Композиція повинна відповідати способу введення.

Поліпептид(и) за даним винаходом також можна модифікувати за допомогою хімічного зшивання поліпептиду з одним або декількома фрагментами або кон'югатами для посилення активності, клітинного розподілу або клітинного засвоєння поліпептиду(ів). Такі фрагменти або кон'югати включають ліпіди, як наприклад, холестерин, холева кислота, тіоефір, аліфатичні ланцюжки, фосфоліпіди та їхні похідні, поліаміни, поліетиленгліколь (ПЕГ), пальмітілові фрагменти та інші, як розкривається, наприклад, у патентах США 5514758, 5565552, 5567810, 5574142, 5585481, 5587371, 5597696 і 5958773.

Також поліпептиди за даним винаходом можна модифікувати для здійснення націленої доставки до специфічних клітинних типів у випадку ознак конкретного захворювання, включаючи, але ними не обмежуючись, клітини печінки у випадку зараження гепатитом С. Фахівці в даній галузі оцінять зручні способи, описані у даному винаході, завдяки яким досягаються поставлені завдання і вони включають, але ними не обмежуються, ліпосомне націлювання, опосередкований рецепторами ендцитоз і зв'язування антитіла з антигеном. В одному з варіантів здійснення може використовуватися асіаглікопротеїновий рецептор для націлювання на клітини печінки шляхом додавання галактозного фрагмента до поліпептиду(ів). В іншому варіанті здійснення манозний фрагмент може бути кон'югований із поліпептидом(ами) для здійснення націленої доставки до рецептора манози, виявленому на макрофагах і клітинах печінки. Фахівцям в даній галузі буде зрозуміло, що, способи одночасної доставки і націлювання можна комбінувати. Наприклад, поліпептид(и) за даним винаходом можуть бути доставлені до клітин печінки за допомогою упакування в ліпосоми, такі ліпосоми кон'юговані з галактозою для націленої доставки до асіаглікопротеїнового рецептора.

Винахід також стосується фармацевтичного упакування або набору, що містить один або декілька контейнерів, заповнених одним або декількома інгредієнтами фармацевтичних композицій за винаходом. До таких контейнерів можуть бути додана інструкція у формі, запропонованій державним органом, що регулює виробництво, застосування або продаж фармацевтичних препаратів або біологічних продуктів, ця інструкція висвітлює атестацію органом виробництва, застосування або продажі для прийому людиною. Крім того, поліпептид за даним винаходом може використовуватися в сполученні з іншими терапевтичними засобами.

Якщо поліпептид(и) за даним винаходом використовуються у ролі фармацевтичного препарату, їх можна вводити свавцеві разом з придатним засобом доставки. Якщо поліпептиди за даним винаходом застосовують у ролі фармацевтичного препарату, як описано вище, то їх призначають, наприклад, у терапевтично ефективних дозах приблизно від 10 мкг/кг маси тіла до приблизно 10 мг/кг маси тіла щодня, з огляду на шлях введення, загальний стан пацієнта і т. д. Переважно, щоб установлена кількість була достатньою для досягнення профілактики або інгібування зараження вірусом, переважно, флавівірусом, найбільш пе-

реважно, RSV і HCV, профілактики або лікування раку, запалення, діабету або інших захворювань.

Білки, їхні фрагменти або інші похідні, або їхні аналоги, або клітини, що їх експресують, можуть використовуватися у ролі імуногена для одержання до них антитіл. Ці антитіла можуть бути, наприклад, поліклональними, моноклональними, химерними, однокланцевими, Fab-фрагментами або продуктом експресійної бібліотеки, основаної на Fab. Для виробництва поліклональних антитіл можуть застосовуватися різні відомі в даній галузі методи.

Антитіла, що виробляються проти поліпептиду(ів) за даним винаходом, можуть бути одержані за допомогою прямої ін'єкції поліпептиду тварині або за допомогою введення поліпептиду тварині, переважно, тій, яка не є людиною. Одержані в такий спосіб антитіла потім зв'язують поліпептид. Таким чином, для одержання антитіл, що зв'язують весь нативний поліпептид, досить послідовності, що кодує тільки фрагмент поліпептиду. Більше того, може використовуватися набір схожих антитіл, специфічних до великої кількості поліпептидів.

Для одержання моноклональних антитіл може застосовуватися будь-який спосіб, який забезпечує вироблення антитіла, безперервними культурами клітинної лінії. Приклади включають гібридомну технологію (Kohler and Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-597), триомну технологію, гібридомну технологію з В-клітинами людини (Kozbor, et al., 1983, *Immunology Today* 4:72) та основу на EBV гібридомну технологію одержання моноклональних антитіл людини (Coe, et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96).

Описані способи одержання однокланцевих антитіл (патент США No. 4946778), можуть бути адаптовані для одержання однокланцевих антитіл до імуногенних поліпептидних продуктів за винаходом.

Антитіла можуть застосовуватися в способах, що стосуються локалізації та активності білкових послідовностей за даним винаходом, наприклад, для візуалізації білків, виміру їхніх рівнів у відповідних фізіологічних зразках і т.ін.

Даний винахід стосується поліпептидів, які відрізняються від поліпептидів, наведених на фіг. 1-5 амінокислотами з 1 по 34, такі розходження можуть включати заміни, інсерції, делеції, об'єднання модифікованих амінокислот або похідних амінокислот і додавання або вилучення амінокислот на С-термінальному кінці або N-термінальному кінці поліпептидів. Винахід стосується терапевтичного і профілактичного застосування цих поліпептидів, включаючи, але ними не обмежуючись, лікування вірусної інфекції, новоутворення, раку, діабету і прискорення клітинного росту і диференціації та регенерації тканини. Винахід стосується полінуклеотидів, що кодують поліпептиди за винаходом, та їхнього застосування, включаючи, але не обмежуючись, застосування у виробництві поліпептидів, при генній терапії, як діагностичних засобів і т. д.

#### Фармацевтичні композиції

Даний винахід стосується фармацевтичної композиції поліпептидів як активних інгредієнтів для терапевтичного застосування. Композиції також можна використати в способі за даним винаходом. У більшості випадків фармацевтична композиція для інгібування вірусної інфекції, раку, новоутворення, запалення або інших захворювань у ссавця або індивідуума містить у собі ефективну кількість принаймні одного поліпептиду, необхідного в практиці винаходу, як описано вище, або його фрагмента, для якого показано, що він має такий же ефект, і фармацевтично фізіологічно прийнятний носій або розріджувач. За даним винаходом фармацевтична композиція може бути складена як сполучення двох або декількох поліпептидів із представлених фіг. 1-5. Більше того, фармацевтична композиція може складатися тільки з поліпептиду, що містить одну або декілька модифікацій, як показано на фіг. 1-5 у безперервній молекулі.

Композиції можуть вводитися перорально, підшкірно або парентерально, включаючи внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревинне та інтраназальне введення, а також інтратекальні та інфузійні методи, якщо потрібно. Фармацевтично прийнятні носії, розріджувачі, допоміжні речовини і засоби доставки, а також носії імплантатів звичайно стосуються інертних, нетоксичних твердих або рідких заповнювачів, розріджувачів або інкапсулюючого матеріалу, які не взаємодіють із активними інгредієнтами за винаходом. Також у композицію можуть бути включені катіонні ліпіди для полегшення поглинання поліпептиду. Також застосовуються імплантати сполук. У більшості випадків фармацевтичні композиції є стерильними.

Даний винахід стосується композицій поліпептидів, до яких приєднана детектована мітка, така як флуоресцентна, хемілюмінесцентна або радіоактивна молекула.

Ще один приклад являє собою фармацевтичну композицію, що може бути складена за допомогою відомих методів із застосуванням відомих матеріалів, дивіться, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pp. 1435-1712, які включені в даний винахід як посилання. Як правило, композиція буде залежати від різних факторів, таких як введення, стабільність, виробничі завдання та інші фактори. Поліпептиди, зазначені на фіг. 1-5, можуть вводитися шляхом ін'єкції або за допомогою легеневого введення за допомогою інгаляції. Також можуть бути доступні ентеральні лікарські форми, і, отже, може бути ефективним пероральне введення. Поліпептиди за винаходом можуть вбудовуватися в ліпосоми або інші мікроносії для доставки, і можуть бути розроблені у вигляді гелів або інших композицій для тривалого вивільнення. Хоча переважні композиції змінюються залежно від застосування, для якого дана композиція складається, як правило, відносно поліпептидів за даним винаходом, переважні фармацевтичні композиції - це композиції, приготовані для підшкірного введення або для легеневого введення за допомогою інгаляції, хоча конкретні композиції для кожного

типу введення залежать від особливостей конкретного поліпептиду.

Терапевтичні композиції поліпептидів або поліпептидних кон'югатів за винаходом як правило вводять у композицію, що містить у собі один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв або ексципієнтів. Такі фармацевтичні композиції можуть бути одержані відомим в даній галузі способом, що дає поліпептидний фармацевтичний препарат, який є досить стабільним при зберіганні і підходить для введення людям або тваринам.

Поліпептиди або поліпептидні кон'югати за винаходом можуть застосовуватися "як є" і/або у вигляді їхньої солі. Придатні солі включають, але ними не обмежуються, солі лужних металів або лужноземельних металів, таких як натрій, калій, кальцій і магній, а також, наприклад, солі цинку. Ці солі або комплекси можуть бути присутніми, у вигляді кристалічної і/або аморфної структури.

"Фармацевтично прийнятний" має на увазі носій або ексципієнт, які при використуванні дозуваннях і концентраціях не викликають яких-небудь несприятливих ефектів у пацієнтів, яким він вводиться. Такі фармацевтично прийнятні носії та ексципієнти добре відомі в даній галузі (дивіться Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); and Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Композиція за винаходом може вводитися самостійно або в сполученні з іншими терапевтичними речовинами. Наприклад, було показано, що рибавірин і інтерферон альфа є ефективними при лікуванні HCV-інфекції, якщо застосовуються спільно. Їхня спільна ефективність перевищує ефективність кожного лікарського препарату, застосовуваного окремо. Композиції за винаходом можуть вводитися окремо або в сполученні з інтерфероном, рибавірином і/або з рядом малих молекул, які розробляються і проти вірусних мішеней (вірусних протеаз, вірусних полімераз, збирання вірусних реплікаційних комплексів), і проти мішеней хазяїна (протеаз хазяїна, необхідних для вірусного процесингу, кіназ хазяїна, необхідних для фосфорилування вірусних мішеней, наприклад, NS5A, та інгібіторів хазяїнських факторів, необхідних для ефективного використання вірусної IRES). Спільно можуть вводитися цитокіни, такі як, наприклад, IL-2, IL-12, IL-23, IL-27 або IFN-гама. Ці агенти можуть бути об'єднані як частина однієї і тієї ж фармацевтичної композиції, або можуть вводитися окремо від поліпептидів або кон'югатів за винаходом, або паралельно, або відповідно до ще однієї схеми лікування. До того ж поліпептиди, поліпептидні кон'югати або композиції за винаходом можуть застосовуватися у ролі допоміжної речовини при інших методах лікування.

Термін "пацієнт" для цілей даного винаходу включає як людей, так і інших ссавців. Таким чином, способи можуть використовуватися для лікування людини, а також для застосування у ветеринарії.

Фармацевтична композиція, що містить у собі поліпептид або кон'югат за винаходом, може бути розроблена в різних формах, наприклад, у вигляді рідини, гелю, ліофілізованої або спресованої твердої речовини. Переважна форма буде залежати від конкретного симптому, що піддається лікуванню, і буде очевидною для фахівця в даній галузі.

Введення композицій за даним винаходом може здійснюватися різними шляхами, включаючи, але не обмежуючись ними, пероральний, підшкірний, внутрішньовенний, інтрацеребральний, інтраназальний, трансдермальний, внутрішньочеревинний, внутрішньом'язовий, внутрішньолегеневий, інтратекальний, вагінальний, ректальний, інтраокулярний або будь-який інший прийнятний спосіб. Композиції можуть уводитися безперервно за допомогою інфузії, хоча є прийнятною й ін'єкція ударної дози речовини, при застосуванні технічних прийомів, добре відомих у даній галузі, таких як насоси (наприклад, підшкірні осмотичні насоси) або імплантація. У деяких випадках композиції можуть бути застосовані безпосередньо у вигляді розчину або спрею.

Прикладом фармацевтичної композиції є розчин, розроблений для парентерального введення. Хоча в багатьох випадках композиції фармацевтичного розчину перебувають у рідкій формі, призначеній для негайного використання, такі парентеральні композиції також можуть перебувати в замороженому або ліофілізованому вигляді. У першому випадку композицію варто розморозити перед використанням. Друга форма часто використовується для підвищення стабільності за різних умов зберігання активної сполуки, яка міститься в композиції, що і є зрозумілим фахівцям у даній галузі, тому що ліофілізовані препарати звичайно стабільніші, ніж їхні рідкі аналоги. Ліофілізовані препарати перед застосуванням розчиняють шляхом додавання декількох придатних фармацевтично прийнятних розвіджувачів, таких як стерильна вода для ін'єкцій або стерильний фізіологічний розчин.

Парентеральні композиції можуть бути одержані для зберігання у вигляді ліофілізованих композицій або водних розчинів шляхом змішування відповідним чином поліпептиду, що має бажаний ступінь чистоти, з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами, звичайно використовуваними в даній галузі (усі з яких називаються "ексципієнти"), наприклад, із буферувальними агентами, стабілізувальними агентами, консервантами, ізотоніками, неіонними детергентами, антиоксидантами і/або іншими різноманітними допоміжними речовинами.

Буферувальні агенти допомагають підтримувати pH в області, що наближається до фізіологічних умов. Звичайно вони присутні в діапазоні концентрації приблизно від 2 мМ до 50 мМ. Придатні буферувальні речовини для застосування за даним винаходом включають і органічні, і неорганічні кислоти та їхні солі, як наприклад, цитратні буфери (наприклад, суміш мононатрієвого цитрату і динатрієвого цитрату, суміш лимонної кислоти і тринатрієвого цитрату, суміш лимонної кислоти і мононатрієвого цитрату і т. д.), сукцинатні буфери

(наприклад, суміш бурштинової кислоти і мононатрієвого сукцинату, суміш бурштинової кислоти і гідроксиду натрію, суміш бурштинової кислоти і динатрієвого сукцинату і т. д.), тартратні буфери (наприклад, суміш винної кислоти і виннокислого натрію, суміш винної кислоти і виннокислого калію, суміш винної кислоти і гідроксиду натрію і т. д.), фумаратні буфери (наприклад, суміш фумарової кислоти і мононатрієвого фумарату, суміш фумарової кислоти і динатрієвого фумарату, суміш мононатрієвого фумарату і динатрієвого фумарату і т. д.), глюконатні буфери (наприклад, суміш глюконової кислоти і глюконату натрію, суміш глюконової кислоти і глюконату калію і т. д.), оксалатні буфери (наприклад, суміш щавлевої кислоти та оксалату натрію, суміш щавлевої кислоти та оксалату калію і т. д.), лактатні буфери (наприклад, суміш молочної кислоти і лактату натрію, суміш молочної кислоти і гідроксиду натрію, суміш молочної кислоти і лактату калію і т. д.) і ацетатні буфери (наприклад, суміш оцтової кислоти та ацетату натрію, суміш оцтової кислоти і гідроксиду натрію і т. д.). Додаткові можливості дають фосфатні буфери, гістидинові буфери і солі триметиламіну, такі як Tris.

Для сповільнення росту мікроорганізмів додають консерванти, і звичайно їх додають у кількості близько 0,2%-1% (маса/об'єм). Придатні консерванти для застосування за даним винаходом включають фенол, бензиловий спирт, метакрезол, метилпарабен, пропілпарабен, хлорид октадецилдиметилбензиламонію, галоїди бензалконію (наприклад, бензалконію хлорид, бромід або йодид), хлорид гексонію, алкілпарабени, такі як метилпарабен або пропілпарабен, катехін, резорцин, циклогексанол і 3-пентанол.

Ізотонічні засоби додають для надання рідким композиціям ізотонічності, і вони включають багатоатомні спирти цукру, переважно, триатомні спирти цукру або вище, такі як гліцерин, еритритол, арабітол, ксиліт, сорбіт і маніт. Багатоатомні спирти можуть бути присутніми у кількості від 0,1% до 25% за масою, звичайно від 1% до 5%, беручи до уваги відносні кількості інших інгредієнтів.

Стабілізатори стосуються великої категорії наповнювачів, які можуть варіювати по функції від наповнювача до допоміжної речовини, що розчиняє терапевтичну речовину або допомагає запобігти денатурації або прилипанню до стінки контейнера. Характерними стабілізаторами можуть бути цукор у спиртовій формі (перераховані вище); амінокислоти, такі як аргінін, лізін, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аланін, орнітин, L-лейцин, 2-фенілаланін, глутамінова кислота, треонін і т. д., органічні цукри або спирти цукру, такі як лактоза, трегалоза, стахіоза, маніт, сорбіт, ксиліт, рибіт, міоїнозит, галактит, гліцерин і т. ін., включаючи циклітоли, такі як інозитол; поліетиленгліколь; полімери амінокислот; сірковмісні відновники, такі як сечовина, глутатіон, ліпоєва кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, альфа-монотіогліцерин і тіосульфат натрію; низькомолекулярні поліпептиди (тобто <10 залишків); білки, такі як сироватковий

альбумін людини, бичачий сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; моносахариди, такі як ксиліоза, манноза, фруктоза і глюкоза; дисахариди, такі як лактоза, мальтоза і сахароза; трисахариди, такі як рафіноза, і полісахариди, такі як декстран. Звичайно стабілізатори присутні в діапазоні від 0,1 до 10000 частин за масою, виходячи з маси активного білка.

Неіонні поверхнево-активні речовини або детергенти (також відомі як "змочувальні речовини") можуть бути присутніми для поліпшення розчинності терапевтичної речовини, а також для захисту терапевтичного поліпептиду від злипання, викликаного перемішуванням, що також дозволяє композиції піддаватися напрузі зсуву без денатурації поліпептиду. Придатні неіонні поверхнево-активні речовини включають полісорбати (20, 80 і т. д.), полуксамери (184, 188 і т. д.), багатоатомні спирти Pluronic®, поліоксіетиленові моноєфіри сорбітану (Tween®-20, Tween®-80 і т. д.).

Додаткові різноманітні ексципієнти включають наповнювачі або заповнювачі (наприклад, крохмаль), хелатуючі агенти (наприклад, EDTA), антиоксиданти (наприклад, аскорбінову кислоту, метіонін, вітамін Е) і спільні розчинники.

Також активний інгредієнт може захоплюватися в мікрокапсули, приготувані, наприклад, за допомогою коацерваційних способів або за допомогою поверхневої полімеризації, наприклад, у мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози, желатину або поліметилметакрилату, у колоїдні системи доставки лікарської речовини (наприклад, у ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемulsії. Такого роду способи розкриті в Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

В одному з аспектів винаходу композиція являє собою рідку композицію, таку як водна композиція, і містить у собі похідну сульфолалкілового ефіру циклодекстрину.

Парентеральні композиції, використовувані для введення *in vivo*, повинні бути стерильними. Це легко досягається, наприклад, за допомогою фільтрації через стерильні мембрани для фільтрації.

Придатні приклади препаратів із тривалим вивільненням включають напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять у собі поліпептид або кон'югат, матриці, що мають придатну форму, як наприклад, плівка або мікрокапсули. Приклади матриць, що тривало вивільняють, містять у собі полієфіри, гідрогелі (наприклад, полі-2-гідроксіетилметакрилат або полівініловий спирт), полілактиди, співполімери L-глутамінової кислоти та етил-L-глутамату, етиленвінілацетат, що не розкладається, співполімери молочної кислоти і гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як ProLease® technology або Lupron Depot® (мікросфери, що складаються зі співполімеру молочної кислоти і гліколевої кислоти та ацетату лейпроліду і вводяться шляхом ін'єкції), і полі-D-(-)-3-гідроксибутанову кислоту. Тоді як полімери, такі як етиленвінілацетат і співполімер молочної кислоти і гліколевої кислоти, здатні вивільняти

молекули протягом тривалого часу, наприклад, до 100 днів або більше, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом коротшого часу. Якщо інкапсульовані поліпептиди залишаються в організмі протягом тривалого часу, вони можуть денатурувати або агрегувати у результаті впливу вологи при 37°C, що призводить до втрати біологічної активності та можливих змін в імуногенності. Можуть бути розроблені доцільні стратегії для стабілізації залежно від порушеного механізму. Наприклад, якщо виявлено, що механізм агрегації являє собою утворення міжмолекулярного S-S зв'язку за допомогою тіодисульфідного обміну, стабілізація може бути досягнута за допомогою видозміни сульфгідрильних залишків, ліофілізації з кислих розчинів, контролю абсолютної вологості при використанні відповідних допоміжних речовин і за допомогою розробки спеціальних композицій із полімерною матрицею.

Винахід стосується перорального прийому пептидів і пептидних кон'югатів. Для перорального прийому фармацевтична композиція може перебувати у твердому або рідкому вигляді, наприклад, у вигляді капсули, таблетки, суспензії, емульсії або розчину. Переважно, фармацевтичну композицію складають у вигляді одиничних доз, що містять встановлену кількість активного інгредієнта. Придатна добова доза для людини або іншого ссавця може коливатися в широких межах залежно від стану пацієнта та інших факторів, і вона може бути визначена фахівцями в даній галузі стандартними способами.

Тверді лікарські форми для перорального прийому включають капсули, таблетки, супозиториї, порошки і гранули. У таких твердих лікарських формах активна сполука може бути з домішкою принаймні одного інертного розріджувача, такого як сахароза, лактоза або крохмаль. Також, у звичайній практиці, схожі лікарські форми можуть містити в собі додаткові субстанції, наприклад, змащувальні речовини, такі як стеарат магнію. Що стосується капсул, таблеток і пігулок, лікарські форми також можуть містити в собі буферувальні агенти. Додатково таблетки і пігулки можуть бути приготувані з ентросолюбільним покриттям.

Поліпептиди або кон'югати можуть бути змішані з допоміжними речовинами, такими як, лактоза, сахароза, крохмальний порошок, ефіри целюлози та алканових кислот, стеаринова кислота, тальк, стеарат магнію, оксид магнію, натрієві та кальцієві солі фосфорної і сірчаної кислот, гумірабік, желатин, альгінат натрію, полівінілпіролідін і/або полівініловий спирт, і можуть бути таблетовані або інкапсульовані для звичайного прийому. В іншому випадку вони можуть бути розчинені у фізіологічному розчині, воді, поліетиленгліколі, пропіленгліколі, етанолі, оліях (таких як, кукурудзяна олія, арахісова олія, бавовняна олія або кунжутна олія), трагакантовій камеді і/або в різних буферах. У фармацевтичній галузі добре відомі інші допоміжні речовини і способи введення. Носій або розріджувач можуть містити в собі інерційний матеріал, такий як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат у чистому вигляді або із твер-

дими вуглеводнями, або інші матеріали, загально-відомі в даній галузі.

Фармацевтичні композиції можуть піддаватися традиційним фармацевтичним маніпуляціям, таким як стерилізація, і/або можуть містити звичайні допоміжні речовини, такі як консерванти, стабілізатори, змочувальні речовини, емульгатори, буфери, заповнювачі і т. д., наприклад, як відзначається де-небудь ще у даному винаході.

Рідкі лікарські форми для перорального прийому можуть мати у своєму складі фармацевтично прийнятні емульсії, розчини, суспензії, сиропи та еліксири, що містять інертні розріджувачі, розповсюджені в даній галузі, наприклад, воду. Схожі композиції також можуть містити допоміжні речовини, наприклад, змочувальні речовини, підсолоджувальні речовини, ароматизуючі речовини і віддушки.

Як частина зазначеного винаходу передбачаються композиції, що підходять для легеневого введення. Композиції, що підходять для застосування з розпилювачем, або струминним, або ультразвуковим, у більшості випадків містять у собі поліпептид або кон'югат, розчинений у воді з концентрацією, наприклад, приблизно від 0,01 до 25 мг кон'югата на мл розчину, переважно приблизно від 0,1 до 10 мг/мл. Також композиція може включати у свій склад буфер і моносахарид (наприклад, для стабілізації білка і регуляції осмотичного тиску), і/або сироватковий альбумін людини, концентрація якого знаходиться в межах від 0,1 до 10 мг/мл. Прикладами буферів, які можуть застосовуватися, служать ацетат натрію, цитрат натрію і гліцин. Переважно, щоб буфер мав склад і молярність, що підходить для доведення зазначеного розчину до рН у діапазоні від 3 до 9. Як правило, молярність буфера від 1 мм до 50 мм підходить для цієї мети. Прикладами цукрів, які можуть використовуватися, служать лактоза, мальтоза, маніт, сорбіт, трегалоза і ксиліоза, звичайно в кількості, що коливається в межах від 1% до 10% від маси композиції.

Аерозольні композиції також можуть містити в собі поверхнево-активну речовину для зменшення або запобігання виникнення в аерозолі, що формується, індукованою поверхнею агрегації білка, викликану пульверизацією розчину. Можуть використовуватися різні стандартні поверхнево-активні речовини, такі як поліоксіетиленові ефіри жирних кислот і спиртів, і поліоксіетиленові ефіри сорбітану і жирних кислот. Кількість, як правило, коливається в межах між 0,001% і 4% від маси композиції. Особливо кращою поверхнево-активною речовиною для цілей винаходу є поліоксіетиленсорбітанмоноолеат.

Конкретні композиції і способи утворення придатних дисперсій із рідких частинок за винаходом описані в WO 94/20069, у патенті США No. 5915378, у патенті США No. 5960792, у патенті США No. 5957124, у патенті США No. 5934272, у патенті США No. 5915378, у патенті США No. 5855564, у патенті США No. 5826570 і в патенті США No. 5522385, які включені в даний винахід як посилання.

Композиції для використання з інгалятором, що відміряє дозу, як правило, містять у собі дрібнодисперсний порошок. Цей порошок може бути одержаний за допомогою ліофілізації і наступного подрібнювання складної рідкої композиції, і також може містити в собі стабілізатор, такий як сироватковий альбумін людини (HSA). Звичайно додають більш ніж 0,5% (мас/мас) HSA. Крім того, якщо необхідно, до препарату можуть бути додані один або декілька цукрів або цукрів у формі спиртів. Приклади включають лактозу, мальтозу, маніт, сорбіт, сорбозу, трегалозу, ксиліт і ксиліозу. Кількість, що додають до композиції, коливається в межах приблизно від 0,01 до 200% (мас/мас), переважно, приблизно від 1 до 50% від присутнього кон'югата. Потім такі композиції ліофілізують і подрібнюють до бажаного розміру частинки.

Потім частинки придатного розміру суспендують у пропеленті за допомогою поверхнево-активної речовини. Пропелент може являти собою будь-який стандартний матеріал, що використовується для цієї мети, наприклад, хлорфторвуглець, гідрохлорфторвуглець, гідрофторвуглець або вуглеводень, включаючи трихлорфторметан, дихлордифторметан, дихлортетрафторетанол і 1,1,1,2-тетрафторетан або їхні комбінації. Придатні поверхнево-активні речовини включають сорбітантриолеат і соєвий лецитин. Також як поверхнево-активна речовина може застосовуватися олеїнова кислота. Потім сумішшю наповнюють подавальний пристрій. Прикладом комерційно доступного інгалятора, що відміряє дозу, придатного для застосування у даному винаході є Ventolin metered dose inhaler, виготовлений Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C., USA.

Композиції для порошкових інгаляторів містять дрібнодисперсний сухий порошок, що містить поліпептиди або поліпептидні кон'югати, і також можуть включати у свій склад наповнювач, такий як лактоза, сорбіт, сахароза або маніт у кількості, що сприяє розпиленню порошку із пристрою, наприклад, від 50% до 90% від маси композиції. У легені частинки порошку повинні мати аеродинамічні властивості, що відповідають частинкам із щільністю приблизно 1 г/см<sup>3</sup>, що мають середній діаметр менший, ніж 10 мікрметрів, переважно, між 0,5 і 5 мікрметрів, найбільш переважно, між 1,5 і 3,5 мікрметрів. Прикладом порошкового інгалятора, придатного для застосування відповідно до ідеї винаходу, є Spinhaler powder inhaler, випущений Fisons Corp., Bedford, Mass., USA. Порошки для цих пристроїв можуть вироблятися і/або постачатися за допомогою способів, розкритих у патенті США No. 5997848, у патенті США No. 5993783, у патенті США No. 5985248, у патенті No. 5976574, у патенті США No. 5922354, у патенті США No. 5785049 і в патенті США No. 5654007.

Механічні пристрої, розроблені для доставки терапевтичних препаратів у легені, включають, але ними не обмежуються, розпилювачі, інгалятори і порошкові інгалятори, що відміряють дозу, всі з яких відомі фахівцям у даній галузі.

Конкретними прикладами комерційно доступних пристроїв, що підходять для використання в цьому винаході, є Ultravent nebulizer, випущений

Mallinckrodt, Inc., St Louis, Mo., USA; Acorn II nebulizer, випущений Marquest Medical Products, Englewood, Colo., USA; Ventolin metered dose inhaler, випущений Glaxo Inc., Research Triangle Parle, N.C., USA; Spinhaler powder inhaler, випущений Fisons Corp., Bedford, Mass., USA, пристрій, що залишається "аерозольним", від Nektar Pharmaceuticals, Inc., San Carlos, Calif., USA; AIR inhaler, випущений Alkermes, Cambridge, Mass., USA; i AERx pulmonary drug delivery system, випущена Aradigm Corporation, Hay ward, Calif, USA.

Також даний винахід стосується наборів, що містять у своєму складі поліпептиди, кон'югати, полінуклеотиди, експресійні вектори, клітини, способи, композиції і системи, і прилади за винаходом. Набори за винаходом довільно містять у собі принаймні одне з нижченаведеного за винаходом: (1) прилад, систему, компонент системи, або компонент приладу, які описані у даному винаході; (2) принаймні один компонент набору, що включає в себе поліпептид або кон'югат або полінуклеотид за даним винаходом; плазмідний експресійний вектор, що кодує поліпептид за винаходом; клітину, що експресує поліпептид за винаходом; або композицію, що включає в себе принаймні кожний із таких компонентів; (3) інструкції для застосування будь-якого способу, описаного тут, включаючи терапевтичний або профілактичний спосіб, інструкції для застосування будь-якого компонента, описаного в пункті (2), або будь-якої композиції кожного з таких компонентів; і/або інструкції для керування будь-яким приладом, системою або компонентом, описаним тут; (4) контейнер для зберігання принаймні одного такого згаданого компонента або композиції, і (5) пакувальні матеріали.

У наступному аспекті даний винахід стосується застосування будь-якого приладу, компонента, композиції або набору, описаного вище у даному винаході, застосування будь-якого способу або дослідження, описаного в описі, і/або застосування будь-якого приладу, компонента, композиції або набору для застосування на практиці будь-якого дослідження або методу, описаного тут.

Хімічні модифікації, кон'югати і злиття

Будь-який поліпептид за винаходом може являти собою частину більшої поліпептидної послідовності, наприклад, злитого білка, що виникає при додаванні одного або декількох доменів або підпослідовностей для стабілізації, або детекції, або очищення поліпептиду. Підпослідовність для очищення поліпептиду може містити в собі, наприклад, епітопну мітку, FLAG-мітку, полігістидинову послідовність, GST, або будь-яку іншу підпослідовність для детекції/очищення або "мітку", відому в даній галузі. Ці додаткові домени або підпослідовності або мають незначний вплив на активність поліпептиду за винаходом, або не мають ніякого впливу, або можуть бути вилучені за допомогою етапів постсинтетичного процесингу, таких як обробка протеазою, введення інтеїну або т. ін.

Даний винахід включає злиті білки, що включають у поліпептид за винаходом, злитий, наприклад, як описано тут, з молекулою Ig, наприклад, з Fc-петлею IgG людини ("фрагментом, що криста-

лізується," або фрагментом зв'язування комплексу), з  $\text{CH}_2$ -доменом і  $\text{CH}_3$ -доменом, і нуклеотидні послідовності, що кодують такий злитий білок. Fc являє собою частину антитіла, відповідальну за зв'язування з рецепторами антитіла на клітинах і з C1q-елементом комплексу. Ці злиті білки і кодуючі їх нуклеїнові кислоти придатні як профілактичні і/або терапевтичні лікарські препарати або як засоби діагностики (також дивіться, наприклад, Challita-Eid, P. et al. (1998) J. Immunol 160:3419-3426; Sturmhoefel, K. et al. (1999) Cancer Res 59:4964-4972). Також винахід включає злиті білки, що містять у собі поліпептид за винаходом, злитий із молекулою альбуміну, такого як сироватковий альбумін людини (HSA), як описано, наприклад, у патенті США No. 5876969, і нуклеотидні послідовності, що кодують даний злитий білок. Білки, злиті з Ig і альбуміном, можуть демонструвати підвищений час напівжиття пептиду в сироватці і/або функціональний час напівжиття *in vivo*, знижену антигенність поліпептиду, збільшену стабільність поліпептиду при зберіганні або зростаючу біодоступність, наприклад, збільшену AUC<sub>SC</sub>, і, таким чином, можуть застосовуватися як профілактичні і/або терапевтичні лікарські препарати.

Всі поліпептиди за винаходом мають специфічну здатність проходити через клітинні мембрани і впливати на терапевтичні функції усередині клітин. Отже, даний винахід стосується застосування поліпептидів за винаходом для поліпшення клітинної проникності або передачі сигналу будь-якою іншою молекулою. Більше того, винахід стосується застосування будь-якого фрагмента або підфрагмента поліпептидів за винаходом, для посилення клітинної проникності для будь-якої іншої молекули, довжина таких фрагментів або підфрагментів становить близько 5 амінокислот, близько 10 амінокислот, наприклад, 15 амінокислот, наприклад, близько 20 амінокислот, приблизно 25 амінокислот, приблизно 30 амінокислот, наприклад, 35 амінокислот, близько 35-50 амінокислот, приблизно 50-100 амінокислот, наприклад, 75 амінокислот, наприклад, 100-125 амінокислот.

Також будь-який поліпептид за винаходом може включати у свій склад одну або декілька модифікованих амінокислот. Модифікована амінокислота може бути, наприклад, глікозильованою амінокислотою, ПЕГильованою амінокислотою, фарнезильованою амінокислотою, ацетилюваною амінокислотою, біотинильованою амінокислотою, амінокислотою, кон'югованою з ліпідним фрагментом, або амінокислотою, кон'югованою з органічною речовиною, що створює похідні. Наявність модифікованих амінокислот може бути сприятливою, наприклад, (а) при збільшенні часу напівжиття поліпептиду в сироватці і/або функціонального часу напівжиття *in vivo*, (b) при зниженні антигенності поліпептиду, (c) при збільшенні стабільності поліпептиду при зберіганні або (d) при збільшенні біодоступності, наприклад, при збільшенні AUC<sub>SC</sub>. Амінокислота(-и) модифікується, наприклад, під час трансляції або після трансляції під час рекомбінантної продукції (наприклад, глікозилювання на N-кінці в мотивах N-X-S/T під час експресії в кліти-

нах ссавців) або модифікується за допомогою синтетичних способів.

Термін "кон'югат" (або рівнозначні терміни "поліпептидний кон'югат" або "кон'югований поліпептид") позначає гетерогенні (за складом) молекули, утворені за допомогою ковалентного приєднання одного або декількох поліпептидів за винаходом до одного або декількох неполіпептидного фрагмента. Термін "ковалентне приєднання" має на увазі, що поліпептид і неполіпептидний фрагмент або безпосередньо ковалентно з'єднані один з одним, або ж опосередковано ковалентно з'єднані один з одним через фрагмент, що перебуває між ними, або фрагменти, такі як місток, спейсер або зв'язувальний фрагмент або фрагменти. Переважно, кон'югований поліпептид є розчинним при відповідних концентраціях і за відповідних умов, тобто розчинний у фізіологічних рідинах, наприклад, у крові. Приклади кон'югованих поліпептидів за винаходом включають глікозильовані і/або ПЕГильовані поліпептиди. Термін "некон'югований поліпептид" може застосовуватися щодо поліпептидної частини кон'югованого поліпептиду.

Термін "неполіпептидний фрагмент" позначає молекулу, що здатна кон'югувати із приєднуючою групою поліпептиду. Переважні приклади неполіпептидних фрагментів включають полімерні молекули, фрагменти цукрів, ліпофільні сполуки або органічні речовини, що утворюють похідні, зокрема полімерні молекули або фрагменти цукрів. Очевидно, що неполіпептидний фрагмент пов'язаний із поліпептидом через приєднуючу групу поліпептиду. Крім випадків, коли явно зазначена кількість неполіпептидних фрагментів, таких як полімерна молекула(и), з'єднана з поліпептидом, кожне посилення на "неполіпептидний фрагмент", приєднаний до поліпептиду або іншими способом застосовуваний у даному винаході, варто відносити до одного або декількох неполіпептидних фрагментів, приєднаних до поліпептиду.

Термін "полімерна молекула" визначається як молекула, утворена за допомогою ковалентної сполуки двох або декількох мономерів, де жоден із мономерів не є амінокислотним залишком. Термін "полімер" може рівнозначно використовуватися з терміном "полімерна молекула".

Термін "фрагмент цукру" позначає молекулу вуглеводу, прикріплену за допомогою глікозилювання *in vivo* або *in vitro*, такого як N- або O-глікозилювання. "Сайт N-глікозилювання" має послідовність N-X-S/T/C, де X являє собою будь-який амінокислотний залишок, крім проліну, N являє собою аспарагін і S/T/C являє собою або серин, або треонін, або цистеїн, переважно, серин або треонін, і найбільш переважно, треонін. "Сайт O-глікозилювання" включає OH-групу залишку серину або треоніну.

Термін "приєднуюча група" означає групу амінокислотного залишку, здатну з'єднуватися з відповідним неполіпептидним фрагментом, таким як, полімерна молекула або фрагмент цукру.

Стосовно N-глікозилювання *in vivo* термін "приєднуюча група" застосовується нетрадиційним чином для зазначення амінокислотних залишків, що становлять сайт N-глікозилювання (із послідо-

вністю N-X-S/T/C, де X являє собою будь-який амінокислотний залишок, крім проліну, N являє собою аспарагін і S/T/C являє собою або серин, або треонін, або цистеїн, переважно, серин або треонін, і найбільш переважно, треонін). Незважаючи на те, що залишок аспарагіну N-глікозилюваного сайту є тим залишком, до якого кріпиться фрагмент цукру під час глікозилювання, таке прикріплення не може бути досягнутим, якщо не присутні інші амінокислотні залишки сайту N-глікозилювання. Отже, якщо неполіпептидний фрагмент є фрагментом цукру і злиття досягається за допомогою N-глікозилювання, термін "амінокислотний залишок, що містить у собі групу для неполіпептидного фрагмента, яка приєднує", застосовуваний у зв'язку зі змінами в амінокислотній послідовності поліпептиду за винаходом, має на увазі один, два або всі амінокислотні залишки, що утворюють сайт N-глікозилювання, які змінюються таким чином, що або функціональний сайт N-глікозилювання вводиться в дану амінокислотну послідовність, вилучається зі згаданої послідовності, або функціональний сайт N-глікозилювання зберігається в амінокислотній послідовності (наприклад, за допомогою заміщення серинового залишку, який вже складає частину сайту N-глікозилювання, залишком треоніну і навпаки).

Термін "уводити" (тобто, "уведений" амінокислотний залишок, "уведення" амінокислотного залишку) насамперед призначений для позначення заміни існуючого амінокислотного залишку на інший амінокислотний залишок, але також може означати інсерцію додаткового амінокислотного залишку.

Термін "вилучати" (тобто, "вилучений" амінокислотний залишок, "вилучення" амінокислотного залишку) насамперед призначений для позначення заміни амінокислотного залишку, який необхідно замінити іншим амінокислотним залишком, але також може означати делецію (без заміни) амінокислотного залишку, який варто вилучити.

Термін "амінокислотний залишок, що містить у собі приєднуючу групу для неполіпептидного фрагмента" позначає, що даний амінокислотний залишок є тим залишком, з яким зв'язується неполіпептидний фрагмент (у випадку уведеного амінокислотного залишку) або з яким зв'язався б (у випадку вилученого амінокислотного залишку).

Термін "функціональний час напівжиття *in vivo*" застосовується в його звичайному значенні, тобто являє собою час, протягом якого в організмі/органі-мішені усе ще виявляється 50% біологічної активності поліпептиду, або час протягом якого активність поліпептиду становить 50% від вихідного значення. Функціональний час напівжиття *in vivo* може бути визначений на експериментальній тварині, такий як щур, миша, кролик, собака або мавпа. Переважно, функціональний час напівжиття *in vivo* визначається на приматах, що не є людиною, таких як мавпа. Крім того, функціональний час напівжиття *in vivo* може бути визначений для зразка, що був уведений внутрішньовенно або підшкірно.

Як альтернатива при визначенні функціонального часу напівжиття *in vivo*, може бути визначе-



ний "час напівжиття в сироватці", тобто час, протягом якого 50% поліпептиду циркулює в плазмі або в кров'яному руслі до виведення. Визначення часу напівжиття в сироватці часто є простішим, ніж визначення функціонального часу напівжиття *in vivo*, і значення часу напівжиття в сироватці звичайно є гарним показником значення функціонального часу напівжиття *in vivo*. Альтернативно терміни, що позначають час напівжиття в сироватці, включають "час напівжиття в плазмі", "напівперіод циркулювання", "очищення сироватки", "очищення плазми" і "напівперіод очищення".

Полінуклеотиди і способи мутагенезу

Даний винахід включає нуклеїнові кислоти і полінуклеотиди, які кодують поліпептиди за винаходом. Винахід включає композиції, одержані за допомогою розрізування будь-якого одного або декількох полінуклеотидів за винаходом ендонуклеазою рестрикції, РНКазою або ДНКазою (наприклад, як виконано в деяких рекомбінантних схемах де-небудь у специфікації); і композиції, одержані за допомогою дезінтегрування або відрізання одного або декількох полінуклеотидів за винаходом за допомогою механічних способів (наприклад, за допомогою руйнування ультразвуком, інтенсивного перемішування і т. ін.), які також можуть застосовуватися для забезпечення субстратів для рекомбінації в описаних тут способах. Також винахід стосується композицій, утворених при відщепленні принаймні одного з полінуклеотидів за винаходом. Розщеплення може включати в себе механічне, хімічне або ферментативне розщеплення, і ферментативне розщеплення може включати в себе розщеплення ендонуклеазою рестрикції, РНКазою або ДНКазою.

Також у винахід включені композиції, одержані способом, що включає інкубацію одного або декількох дезінтегрованих полінуклеотидів за винаходом у присутності трифосфатів рибонуклеотиду або дезоксирибонуклеотиду і полімерази нуклеїнової кислоти. Ці підсумкові композиції утворюють рекомбінаційну суміш для багатьох рекомбінантних схем, описаних вище. Полімераза нуклеїнової кислоти може бути РНК-полімеразою, ДНК-полімеразою або РНК-залежною ДНК-полімеразою (наприклад, "зворотною транскриптазою"); полімераза може бути, наприклад, термостабільною ДНК-полімеразою (наприклад, VENT, TAQ або т.ін.).

Аналогічним чином композиції, що містять у собі серії олігонуклеотидів, що відповідають декільком нуклеїновим кислотам за винаходом, можуть бути використані як рекомбінаційні субстрати і є особливою зазначеного винаходу. Для зручності ці дезінтегровані, розщеплені або синтезовані олігонуклеотидні суміші іменуються як серії дезінтегрованих нуклеїнових кислот.

Також винахід стосується виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, одержаної за допомогою мутування або рекомбінації принаймні одного полінуклеотиду за винаходом.

Полінуклеотиди, олігонуклеотиди і фрагменти нуклеїнової кислоти за винаходом можуть бути одержані за допомогою стандартних твердофаз-

них способів, відповідно до відомих синтетичних способів. У більшості випадків фрагменти приблизно до 100 основ синтезуються окремо, потім з'єднуються (наприклад, за допомогою ферментативних або хімічних способів лігування, або за допомогою рекомбінаційних способів, опосередкованих полімеразою) для утворення фактично будь-якої бажаної безперервної послідовності. Наприклад, полінуклеотиди та олігонуклеотиди за винаходом можуть бути одержані за допомогою хімічного синтезу при використанні, наприклад, класичного фосфорамідитного способу, описаного наприклад, Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-69, або способу, описаного Matthes et al. (1984) *EMBO J* 3:801-05, що, наприклад, звичайно використовується в автоматизованих синтетичних способах. Відповідно до фосфорамідитного способу, олігонуклеотиди синтезують, наприклад, в автоматичному пристрої, що синтезує ДНК, очищають, відпалюють, зшивають і клонують у відповідні вектори.

Крім цього, фактично будь-який полінуклеотид може бути замовлений у будь-якому з багатьох комерційних джерел, таких як Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.) і багатьох інших. Аналогічним чином пептиди та антитіла можуть бути замовлені в будь-якому з безлічі джерел, наприклад, у Celtek Peptides (Nashville, Tenn.); Washington Biotechnology, Inc. (Baltimore Md.); Global Peptide Services (Ft. Collin Colo.) і в багатьох інших.

Деякі полінуклеотиди за винаходом також можуть бути одержані за допомогою скринування бібліотек кДНК (наприклад, бібліотек, створених за допомогою рекомбінування гомологічних нуклеїнових кислот, як при звичайній рекомбінації рекурсивної послідовності) із застосуванням олігонуклеотидних зондів, які можуть гібридизуватися з полінуклеотидами, ампліфікованими в результаті ПЛР, які кодують поліпептиди OAS і фрагменти цих поліпептидів. Способи скринування і виділення клонів кДНК добре відомі фахівцям у даній галузі. Такі технічні прийоми описані, наприклад Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymol.* Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, Calif. ("Berger"); J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, ("Sambrook"); and EM. Ausubel et al. (1987-2005) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York, NY ("Ausubel"). Деякі полінуклеотиди за винаходом можуть бути одержані за допомогою зміни природної послідовності, наприклад, за допомогою мутагенезу, рекомбінації рекурсивної послідовності (наприклад, перемішування) або за допомогою олігонуклеотидної рекомбінації. У деяких випадках такі полінуклеотиди можуть виготовлятися *in silico* або за допомогою олігонуклеотидних рекомбінаційних способів, описаних у цитованих тут посиланнях.

Як описано детальніше у даному винаході, полінуклеотиди за винаходом включають полінуклеотиди, які кодують поліпептиди за винаходом, полінуклеотидні послідовності, комплементарні до цих полінуклеотидних послідовностей, і полінукле-

отиди, які гібридизуються принаймні в жорстких умовах з охарактеризованою тут послідовністю. Послідовність, що кодує, співвідноситься з полінуклеотидною послідовністю, що кодує конкретний поліпептид або домен, ділянку або фрагмент згаданого поліпептиду. Полінуклеотиди за винаходом можуть існувати у вигляді РНК або у вигляді ДНК, і включають мРНК, кРНК, синтетичні РНК і ДНК, і кДНК. Полінуклеотиди можуть бути дволанцюговими або одноланцюговими, і в іншому випадку можуть являти собою ланцюг, що кодує, або що не кодує (антисмисловий, комплементарний) ланцюг. Полінуклеотиди за даним винаходом включають послідовність, що кодує, поліпептид за винаходом (i) окремо, (ii) разом з однією або декількома додатковими послідовностями, що кодують, так, що кодують, наприклад, злитий білок, пребілок, пре-пробілок або т. ін., (iii) разом із послідовностями, що не кодують, такими як інтрони, елементами, що керують, наприклад, із промотором (наприклад, природним або рекомбінантним, або переміщенням промотором), із термінуючим елементом або з 5' і/або 3' нетрансльованими ділянками, ефективними при експресії послідовності, що кодує, у придатного хазяїна, і/або (iv) у векторі, у клітині або в середовищі хазяїна, у якій послідовність, що кодує, являє собою гетерологічний ген.

Полінуклеотиди за винаходом також можуть зустрічатися разом з характерними композиційними формулами з нуклеїнових кислот, включаючи присутні носії, буфери, допоміжні речовини, ексципієнти і т. ін., що відомо звичайним фахівцям у даній галузі. Полінуклеотидні фрагменти звичайно складаються принаймні приблизно з 200 нуклеотидних основ, наприклад, принаймні приблизно з 250, 300, 350, 400, 450, 460, 470 або більше основ. Нуклеотидні фрагменти полінуклеотидів за винаходом можуть гібридизуватися в дуже жорстких умовах з описаною тут полінуклеотидною послідовністю і/або кодувати амінокислотні послідовності, що мають принаймні одну із властивостей поліпептидів відповідно до описаного тут винаходу.

Полінуклеотиди за винаходом мають різноманітне застосування, наприклад, у рекомбінантній продукції (тобто, в експресії) поліпептидів за винаходом, звичайно за допомогою експресії плазмідного експресійного вектора, який містить у собі послідовність, що кодує поліпептид або його фрагмент; як терапевтичний засіб; як профілактичний засіб; як діагностичні засоби; як імуногени; як допоміжні речовини; як діагностичні зонди для визначення наявності комплементарних або частково комплементарних нуклеїнових кислот (включаючи детекцію нуклеїнової кислоти олігоаденілатсинтетази дикого типу), як субстрати для наступних реакцій, наприклад, реакцій рекомбінації рекурсивної послідовності або реакцій мутації для одержання нових і/або поліпшених варіантів і т. ін.

Експресійні вектори, способи одержання, генна терапія

В описі розкриті рекомбінантні способи одержання і виділення поліпептидів за винаходом. Крім рекомбінантної продукції, поліпептиди можуть бути одержані за допомогою прямого синтезу пептиду із

застосуванням твердофазної технології (дивіться, наприклад, Stewart et al. (1969) *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield J. (1963) *J Am Chem Soc* 85:2149-2154). Пептидний синтез може здійснюватися вручну або за допомогою автоматики. Автоматизований синтез може здійснюватися, наприклад, при використанні Applied Biosystems 43 IA Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, Calif.) відповідно до інструкцій, передбачених виробником. Наприклад, підпослідовності можна хімічно синтезувати роздільно і разом із застосуванням хімічних способів для одержання повнорозмірних поліпептидів або їхніх фрагментів. В іншому випадку такі послідовності можна замовити в кожній із безлічі компаній, які спеціалізуються на випуску поліпептидів. Найчастіше поліпептиди за винаходом можуть бути одержані за допомогою експресії кодуючих нуклеїнових кислот і виділення поліпептидів, наприклад, як описано нижче.

Також представлені способи одержання поліпептидів за винаходом. Один такий спосіб містить у собі введення в популяцію клітин будь-якої нуклеїнової кислоти за винаходом, що функціонально пов'язана з регуляторною послідовністю, ефективною для одержання кодованого поліпептиду, культивування клітин у культуральному середовищі для експресії зазначеного поліпептиду і виділення поліпептиду із клітин або з культурального середовища. Використовується кількість нуклеїнової кислоти, достатня для полегшення поглинання клітиною (трансфекції) і/або експресії поліпептиду. Нуклеїнова кислота вводиться в такі клітини за допомогою будь-якого відомого в даній галузі способу доставки, включаючи, наприклад, ін'єкцію, генну гармату, пасивне поглинання і т. д. Як буде зрозумілим будь-якому фахівцеві в даній галузі, нуклеїнова кислота може бути частиною вектора, такого як рекомбінантний експресійний вектор, включаючи плазмідний вектор ДНК, або будь-яким вектором, відомим у даній галузі. Нуклеїнова кислота або вектор, що містить у собі нуклеїнову кислоту за винаходом, можуть бути підготовлені і розроблені за допомогою стандартних технологій на основі рекомбінантної ДНК і способів виділення, відомих у даній галузі. Така нуклеїнова кислота або експресійний вектор можуть уводитися в популяцію клітин *in vivo*, або вибрані клітини ссавця (наприклад, пухлинні клітини) можуть виділятися зі ссавця, і експресійний вектор нуклеїнової кислоти може вводитися *ex vivo* у популяцію таких клітин у кількості, достатній настільки, що відбувається поглинання та експресія кодованого поліпептиду. У протилежному випадку відтворюється нуклеїнова кислота, або вектор, що містить у собі нуклеїнову кислоту за винаходом, при застосуванні культури клітин *in vitro*. В одному аспекті спосіб одержання поліпептиду за винаходом містить у собі введення в популяцію клітин рекомбінантного експресійного вектора, що містить будь-яку описану тут нуклеїнову кислоту за винаходом у кількості та у композиції такий, що це призведе до поглинання вектора та експресії кодованого поліпептиду; введення експресійного вектора ссавцеві за допомогою будь-якої описаної тут схеми введен-

ня/доставки; і виділення поліпептиду в ссавця або з побічного продукту від ссавця.

Винахід стосується виділених або рекомбінантних нуклеїнових кислот (які також називають полінуклеотидами), що спільно називають "нуклеїнові кислоти (або полінуклеотидами) за винаходом", які кодують поліпептиди за винаходом. Полінуклеотидами за винаходом придатні для різного застосування. Як розглянуто вище, полінуклеотидами можуть використовуватися для одержання поліпептидів за винаходом. Крім того, полінуклеотидами за винаходом можуть бути включені в експресійні вектори, використовувані для генної терапії, ДНК-вакцинації та імунотерапії, як описано в інших місцях у цій заявці.

Кожен із полінуклеотидів за винаходом (які включають описані вище полінуклеотидами) може кодувати злитий білок, що включає в себе принаймні одну додаткову амінокислотну послідовність, таку як, наприклад, послідовність для секреції/локалізації, послідовність, зручну для розчинення або іммобілізації (наприклад, при дослідженні поверхні клітини) поліпептиду, послідовність, застосовну для детекції і/або очищення зазначеного поліпептиду (наприклад, підпослідовність для очищення поліпептиду, як наприклад, епітопна мішень, поліглістидинова послідовність і т.ін.). У ще одному аспекті винахід стосується клітин, що містять один або декілька полінуклеотидів за винаходом. Такі клітини можуть експресувати один або декілька поліпептидів, що кодуються полінуклеотидами за винаходом.

Також винахід стосується векторів, що містять у собі будь-який із полінуклеотидів за винаходом. Такі вектори можуть містити в собі плазмід, космід, фаг, вірус або фрагмент вірусу. Такі вектори можуть вміщувати в себе експресійний вектор, і при бажанні нуклеїнову кислоту, функціонально пов'язану із промотором, включаючи ті, що описані тут і нижче. Крім усього іншого в ще одному аспекті даний винахід стосується композицій, що містять ексципієнт або носій і принаймні будь-який із полінуклеотидів за винаходом, або вектори, клітини, або хазяїна, що містить у собі такі нуклеїнові кислоти. Такі композиції можуть бути фармацевтичними композиціями, і ексципієнт або носій можуть бути фармацевтично прийнятними ексципієнтом або носієм.

Також винахід включає композиції, що містять у собі дві або декілька нуклеїнових кислот за винаходом або їхні фрагменти (наприклад, субстрати для рекомбінації). Композиція може містити в собі бібліотеку рекомбінантних нуклеїнових кислот, де дана бібліотека вміщує в себе принаймні 2, принаймні 3, принаймні 5, принаймні 10, принаймні 20, принаймні 50 або принаймні 100 або більше нуклеїнових кислот, описаних вище. При бажанні нуклеїнові кислоти клонують в експресійні вектори, забезпечуючи експресійні бібліотеки.

Полінуклеотидами за винаходом та їхні фрагменти, а також вектори, що містять такі полінуклеотидами, можуть застосовуватися для терапевтичних або профілактичних цілей у сполученні з придатним носієм, таким як фармацевтичний носій. Такі композиції вміщують терапевтично і/або профілак-

тично ефективну кількість сполуки і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт. Такий носій або ексципієнт включають, але ними не обмежуються, фізіологічний розчин, забуферений фізіологічний розчин, декстрозу, воду, гліцерин, етанол та їхні сполучення. Композиція повинна відповідати способу введення. Способи введення нуклеїнових кислот, поліпептидів і білків добре відомі в даній галузі.

Повні тексти, які описують молекулярно-біологічні технічні прийоми, що застосовуються тут, включаючи застосування векторів, промоторів і багато інших актуальних тем, включають Berger *supra*; Sambrook (1989) *supra* і Ausubel *supra*. Приклади технічних прийомів, достатніх для того, щоб зазначити фахівцям шлях за способами ампліфікації *in vitro*, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), лігазну ланцюгову реакцію (LCR), Q-бета-репліказну ампліфікацію та інші опосередковані РНК-полімеразою технічні прийоми (наприклад, NASBA), наприклад, при продукції гомологічних нуклеїнових кислот за винаходом, перебувають у Berger, Sambrook, і Ausubel, *vs supra*, а також Mullis et al. (1987) патент США No. 4683202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds.) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990) ("Innis"); Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3:81-94; (Kwoh et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86: 1173-1177; Guatelli et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1874-1878; Lomeli et al. (1989) J Clin Chem 35:1826-1831; Landegren et al. (1988) Science 241:1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294; Wu and Wallace (1989) Gene 4:560-569; Barringer et al. (1990) Gene 89:117-122, and Sooknanan and Malek (1995) Biotechnology 13:563-564. Поліпшені способи клонування ампліфікованих нуклеїнових кислот *in vitro* описані в Wallace et al., патент США No. 5426039. Удосконалені способи ампліфікації більших нуклеїнових кислот за допомогою ПЛР резюмовані в Cheng et al. (1994) Nature 369:684-685 і у внутрішніх посиланнях, у яких одержані ПЛР-амплікони розміром до 40 тисяч основ (kb). Фахівець оцінить те, що фактично будь-яка РНК може бути перетворена у дволацюгову ДНК, що підходить для рестрикції, збільшення за допомогою ПЛР і секвенування при використанні зворотної транскриптази і полімерази. Дивіться Ausubel, Sambrook і Berger, *vs supra*.

У клітинах-хазяїнах ссавця може використовуватися безліч експресійних систем, таких як системи, основані на вірусах. У випадках, коли як експресійний вектор застосовується аденовірус, що кодує послідовність при бажанні вшивається в транскрипційно-трансляційний комплекс аденовірусу, що складається з пізнього промотору і складається із трьох частин лідерної послідовності. Введення в незначущу ділянку E1 або E3 вірусного геному призводить до одержання життєздатного вірусу, здатного експресувати поліпептид за винаходом в інфікованих клітинах-хазяїнах (Logan and Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655-3659). Крім цього, для посилення експресії в клітинах-хазяїнах ссавця використовуються енхансери

транскрипції, такі як енхансер вірусу саркоми Рауса (RSV). Клітини-хазяїни, середовище, експресійні системи і способи продукції включають такі для клонування та експресії різноманітних білків ссавців, відомі в даній галузі. Ефективність експресії може бути збільшена за допомогою введення енхансерів, що відповідають використовуваній клітинній системі (дивіться, наприклад, Scharf D. et al. (1994) *Results Probl cell Differ* 20:125-62; i Bittner et al. (1987) *Methods in Enzymol* 153:516-544).

Специфічні сигнали ініціації можуть сприяти ефективній трансляції поліпептиду, що кодує послідовність за винаходом і/або їхні фрагменти. Ці сигнали можуть містити в собі, наприклад, кодони ATG, що ініціює, і суміжні послідовності. У випадку, коли послідовність, що кодує, її ініціюючий кодон і послідовності розташовані в 3'-5' напрямку вбудовані у відповідний експресійний вектор, немає необхідності в додаткових регулюючих трансляції сигналах. Проте, у випадках, коли вбудована єдина послідовність, що кодує (наприклад, послідовність, яка кодує зрілий білок) або її частина, повинні забезпечуватися зовнішні транскрипційні регулюючі сигнали нуклеїнової кислоти, включаючи ініціюючий кодон ATG. Крім того, кодони, що ініціює, повинні перебувати у вірній рамці читування для забезпечення транскрипції всієї вставки. Зовнішні транскрипційні елементи та ініціюючі кодони можуть походити з різних джерел, і природних, і синтетичних.

Введення конструкції в клітину-хазяїна може здійснюватися за допомогою трансфекції з фосфатом кальцію, трансфекції, опосередкованої DEAE-Декстраном, за допомогою електропорації, генної або вакцинної гармати, ін'єкції або інших звичайних технічних прийомів (дивіться, наприклад, Davis, L., Dibner, M., and Battey, I. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*) для способів *in vivo*, *ex vivo* або *in vitro*.

Як відзначалося, багато рекомендацій є придатними для культивування і продукції безлічі клітин, включаючи бактеріальні клітини, рослинні, тваринні (особливо клітини ссавців) і клітини археобактеріального походження. Дивіться, наприклад, Sambrook, Ausubel, i Berger (всі *supra*), а також Sambrook, Ausubel, and Berger (all *supra*), as well as Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York and the references cited therein; Doyle and Griffiths (1997) *Mammalian Cell Culture: Essential Techniques* John Wiley and Sons, New York; Humason (1979) *Animal Tissue Techniques*, fourth edition W.H. Freeman and Company; and Ricciardelli et al. (1989) *In vitro Cell Dev Biol* 25:1016-1024. Про культивування і відновлення рослинної клітини дивіться, наприклад, Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and *Plant Molecular Biology* (1993) R.R.D. Croy (ed.) Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6. Середовище для культури клітин звичайно друкується в Atlas and Parks (eds.) *Handbook of*

*Microbiological Medium* (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla. Додаткова інформація за культивування клітин перебуває в доступній комерційній літературі, такій як Life Science Research Cell Culture Catalogue від Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, Mo.) ("Sigma-LSRCCC") і, наприклад, Plant Culture Catalogue і додаток, також від Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, Mo.) ("Sigma-PCCC").

Поліпептиди за винаходом можуть бути виділені та очищені з культур рекомбінантних клітин за допомогою будь-якої кількості способів, добре відомих у даній галузі, включаючи осадження сульфатом амонію або етанолом, екстрагування кислотою, аніонну або катіонну обмінну хроматографію, фосфоцелюлозну хроматографію, хроматографію, основу на гідрофобних взаємодіях, афінну хроматографію (наприклад, застосовуючи будь-яку зі згаданих тут мічених систем), хроматографію з гідроксилапатитом і хроматографію з лецитином. За бажанням можуть використовуватися етапи рефолдингу білка при завершенні конформації зрілого білка або його фрагментів. І, нарешті, може застосовуватися високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) на фінальних етапах очищення. На додаток до рекомендацій, згаданих вище, у даній галузі добре відомий цілий ряд способів очищення, включаючи, наприклад, способи, викладені в Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) *Protein Methods*, 2.sup.nd Edition Wiley-Liss, New York; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, New Jersey; Harris and Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach* IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3.sup.rd Edition Springer Verlag, New York; Janson and Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Second Edition Wiley-VCH, New York; and Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM* Humana Press, New Jersey.

Відома деяка кількість вірусних векторів, що підходять для трансдукції в організмі *in vivo* і для експресії. Такі вектори включають ретровірусні вектори (дивіться, наприклад, Miller, Curr Top Microbiol Immunol (1992) 158:1-24; Salmons and Gunzburg (1993) *Human Gene Therapy* 4:129-141; Miller et al. (1994) *Methods in Enzymology* 217:581-599) і аденоасоційовані вектори (розглянуті в Carter (1992) *Curr Opin Biotech* 3:533-539; Muzyczka (1992) *Curr Top Microbiol Immunol* 158:97-129). Інші вірусні вектори, що застосовуються, включають аденовірусні вектори, вектори на основі вірусу герпесу і вектори на основі вірусу Sindbis, які в основному описані, наприклад, у Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1:51-64; Latchman (1994) *Molec Biotechnol* 2:179-195; і в Johanning et al. (1995) *Nucl acids Res* 23:1495-1501.

В одному з аспектів може використовуватися вектор на основі вірусу віспи. Вектор на основі вірусу віспи трансфікується поліпептидною послідовністю, що кодує поліпептид за винаходом і може використовуватися для профілактичного,

терапевтичного і діагностичного застосування, де бажане посилення імунної відповіді, такої як, наприклад, збільшена або поліпшена проліферація Т-клітин. Дивіться вірусні вектори, описані, наприклад, у Berencsi et al., *J Infect Dis* (2001)183(8):1171-9; Rosenwirth et al., *Vaccine* 2001 February 8;19(13-14):1661-70; Kittlesen et al., *J Immunol* (2000) 164(8):4204-II; Brown et al. *Gene Ther* 2000 7(19):1680-9; Kanesa-athan et al., *Vaccine* (2000) 19(4-5):483-91; Sten (2000) *Drug* 60(2):249-71. Композиції, що містять у своєму складі такі вектори і прийнятний експіцієнт, також є особливістю зазначеного винаходу.

Генна терапія і генетичні вакцини забезпечують способи боротьби із хронічними інфекційними захворюваннями (наприклад, із ВІЛ-інфекцією, вірусним гепатитом), а також із неінфекційними захворюваннями, включаючи рак і деякі форми вроджених дефектів, таких як ферментативна недостатність, і схожі способи можуть застосовуватися з полінуклеотидами за винаходом, включаючи, наприклад, вектори і клітини, що містять такі полінуклеотиди. Використовувалося декілька підходів до введення нуклеїнових кислот і векторів у клітини *in vivo*, *ex vivo* і *in vitro*, і вони можуть застосовуватися з полінуклеотидами за винаходом і векторами, що містять такі полінуклеотиди. Ці підходи включають доставку гена із застосуванням ліпосом (Debs and Zhu (1993) WO 93/24640 і патент США No. 5641662; Mannino and Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7):682-691; Rose, патент США No. 5279833; Bringham (1991) WO 91/06309; and Feigner et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7413-7414; Bringham et al. (1989) *Am J Med Sci* 298:278-281; Nabel et al. (1990) *Science* 249:1285-1288; Hazinski et al. (1991) *Am J Resp Cell Molec Biol* 4:206-209; and Wang and Huang (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7851-7855); доставку гена, опосередковану аденовірусними векторами, наприклад, для лікування злоякісної пухлини (дивіться, наприклад, Chen et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3054-3057; Tong et al. (1996) *Gynecol Oncol* 61:175-179; Clayman et al. (1995) *Cancer Res.* 5:1-6; O'Malley et al. (1995) *Cancer Res* 55:1080-1085; Hwang et al. (1995) *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:7-16; Haddada et al. (1995) *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995 (Pt. 3):297-306; Addison et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8522-8526; Colak et al. (1995) *Brain Res* 691:76-82; Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Elshami et al. (1996) *Human Gene Ther* 7:141-148; Vincent et al. (1996) *J Neurosurg* 85:648-654), і багато інших. Також використовувалися ретровірусні вектори з порушеною реплікацією, що містять терапевтичну полінуклеотидну послідовність як частину ретровірусного геному, зокрема - прості вектори на основі MuLV. Дивіться, наприклад, Miller et al. (1990) *Mol cell Biol* 10:4239 (1990); Kolberg (1992) *J NIH Res* 4:43 і Cornetta et al. (1991) *Hum Gene Ther* 5 2:215). Також застосовувалося перенесення нуклеїнової кислоти, пов'язане з ліганд-специфічними, основанийими на катіонах транспортними системами (Wu and Wu (1988) *J Biol Chem*, 263:14621-14624). Також описані експресійні вектори з депротейнізованою ДНК (Nabel et al. (1990), *supra*); Wolff et al. (1990) *Science*, 247:1465-

1468). Як правило, ці підходи можуть бути адаптовані до даного винаходу завдяки включенню нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди за винаходом, у відповідні вектори.

Основні тексти, які описують протоколи генної терапії, які можуть бути адаптовані до даного винаходу за допомогою введення нуклеїнових кислот за винаходом пацієнтам, включають, наприклад, Robbins (1996) *Gene Therapy Protocols*, Humana Press, New Jersey і Joyner (1993) *Gene Targeting: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, England.

#### Противірусне лікування

Полінуклеотиди і поліпептиди за винаходом можуть використовуватися терапевтично або профілактично для лікування або профілактики вірусної інфекції. Приклади вірусів включають, але ними не обмежуються, віруси сімейства *Flaviviridae*, такі як, наприклад, вірус гепатиту С, вірус жовтої лихоманки, вірус Західного Нілу, вірус японського енцефаліту, вірус тропічної лихоманки і вірус вірусної діареї великої рогатої худоби; віруси сімейства *Herpesviridae*, такі як, наприклад, вірус гепатиту В; віруси сімейства *Picornaviridae*, такі як, наприклад, вірус енцефаломіокардиту, риновірус людини і вірус гепатиту А; віруси сімейства *Retroviridae*, такі як, наприклад, вірус імунodefіциту людини, вірус імунodefіциту мавп, Т-лімфотропний вірус людини і вірус саркоми Рауса; віруси сімейства *Coronaviridae*, такі як, наприклад, коронавірус SARS; віруси сімейства *Rhabdoviridae*, такі як, наприклад, вірус сказу і вірус везикулярного стоматиту, віруси сімейства *Paramyxoviridae*, такі як, наприклад, респіраторно-синцитіальний вірус і вірус парагрипу, віруси сімейства *Papillomaviridae*, такі як, наприклад, вірус папіломи людини і віруси сімейства *Herpesviridae*, такі як, наприклад, вірус простого герпесу.

Ще однією метою винаходу, є кон'югати, такі кон'югати включають у свій склад один або декілька неполіпептидних фрагментів, пов'язаних із поліпептидом за винаходом, такий кон'югат проявляє противірусну властивість і факультативно проявляє інші бажані властивості, такі як збільшення часу напівжиття в сироватці і/або функціонального часу напівжиття *in vivo* і/або зменшує антигенність у порівнянні з некон'югованим поліпептидом. Деякі схожі кон'югати можуть проявляти підвищену ефективність при очищенні вірусу від клітин, заражених даним вірусом, при порівнянні з контрольною олігоаденілатсинтезазою. Понад те, деякі такі кон'югати можуть мати знижену токсичність у порівнянні з контрольною олігоаденілатсинтезазою.

Іншою метою винаходу є спосіб інгібування вірусної реплікації в клітинах, заражених вірусом, даний спосіб містить у собі введення в заражені вірусом клітини поліпептиду або кон'югата за винаходом у кількості, ефективній для інгібування вірусної реплікації в згаданих клітинах. Також винахід стосується способу зменшення кількості копій вірусу в клітинах, заражених вірусом, що включає в себе введення в заражені вірусом клітини поліпептиду або кон'югата за винаходом у кількості, ефективній для зменшення кількості копій вірусу в згаданих клітинах. Дані клітини можуть існувати в культурі або в іншому випадку можуть бути виді-

лені в ссавця (тобто, *in vitro* або *ex vivo*), або можуть існувати *in vivo*, наприклад, в індивідуума, у ссавця, у приматів або в людини.

Лікування раку і запалення

Було показано, що поліпептиди за винаходом можуть викликати апоптоз у деяких типів клітин і клітинних ліній або можуть викликати сповільнення росту згаданих клітинних ліній або типів клітин. Такі клітинні лінії або типи клітин включені в ілюстративний варіант здійснення, де вони походять із простати і грудей.

Винахід стосується способу сповільнення проліферації популяції клітин, що включає в себе зіткнення популяції клітин із поліпептидом за даним винаходом в кількості, ефективній для зменшення проліферації популяції клітин. Популяція клітин може існувати в культурі або в іншому випадку може бути виділена в ссавця (тобто, *in vitro* або *ex vivo*), або може існувати *in vivo*, наприклад, в індивідуума, у ссавця, у приматів або в людини.

Винахід стосується лікування раку і новоутворень при застосуванні поліпептидів і полінуклеотидів за винаходом. Приклади злоякісних пухлин і новоутворень включають, але ними не обмежуються: аденокарциному карциному, СНІД-асоційовану злоякісну пухлину, таку як, наприклад, саркома Капоші, СНІД-асоційовану лімфому, злоякісну пухлину заднього проходу, астроцитому, базаліому, рак жовчних шляхів, як наприклад, рак позапечінкової природи, рак діафрагми, рак кісток, як наприклад, остеосаркоми і злоякісні фіброзні гістіоцити, гліому стовбурної частини мозку, пухлини мозку, такі як, наприклад, гліоми, астроцити, злоякісні гліоми, епендимоми, медуллобластоми і нейробластоми, надмозочкову пухлину первинної нейроектодерми, гліому зорового шляху і гіпоталамуса, рак грудей, аденому бронха, лімфому Беркіта, карциноїдні пухлини, лімфому центральної нервової системи, рак шийки матки, лейкої, такі як, наприклад, лейкоз ворсистих клітин, гостра лімфобластна лейкемія, гостра мієлоїдна лейкемія, хронічний лімфолейкоз і хронічний мієлолейкоз, хронічні мієлопроліферативні порушення, колотеральний рак, Т-клітинну лімфому шкіри, рак ендометрію, рак стравоходу, сімейство пухлин Юінга, екстракраніальну гоноцитому, позаконядну гоноцитому, злоякісні пухлини ока, такі як, наприклад, внутрішньоочна меланома і ретинобластома, злоякісну пухлину жовчного міхура, рак шлунка, трофобластну пухлину матки, злоякісну пухлину голови і шиї, гепатоклітинну карциному, лімфому Ходжкіна, неходжкінську лімфому, первинну лімфому ЦНС, носоглоткову злоякісну пухлину, карциному острівцеві клітини, рак нирки (клітини ниркового епітелію), рак гортані, злоякісну пухлину губи і ротової порожнини, рак печінки, рак легень, як наприклад, недрібноклітинний і дрібноклітинний рак легень, макроглобулінемію Вальденстрема, карциному клітин Меркеля, мезотеліому, метастатичний плоскоклітинний рак шиї, множинні ендокринні новоутворення, множинну мієлому, плазмоклітинне новоутворення, фунгоїдну гранульому, мієлодиспластичні синдроми, мієлопроліферативні синдроми, злоякісну пухлину носової порожнини і навколосової пазухи, рак яєчників,

наприклад, статевих клітин і епітелію, низькозлоякісну потенційну пухлину яєчників, злоякісну пухлину підшлункової залози, злоякісну пухлину парашитовидної залози, рак статевого члена, феохромоцитому, пухлину гіпофіза, плевролегеневу бластому, рак простати, рабдіоміосаркому, злоякісну пухлину слинних залоз, саркоми, синдром Сезарі, рак шкіри, такий як, наприклад, меланома і плоскоклітинна карцинома, рак яєчок, тимому, карциному тимуса, рак щитовидної залози, перехідно-клітинний рак, трофобластичну пухлину, злоякісну пухлину уретри, рак матки, рак піхви, злоякісну пухлину вульви і пухлину Вільмса.

Крім того винахід стосується лікування автоімунних захворювань і запалення із застосуванням поліпептидів і полінуклеотидів за винаходом, згадані автоімунні і запальні захворювання включають, але ними не обмежуються: астму, хворобу Крона, синдром Гійєна-Барре, розсіяний склероз, злоякісну міастенію, неврит зорового нерва, псоріаз, ревматоїдний артрит, базедову хворобу, хворобу Хашимото (тиреоїдит), тиреоїдит Орда, діабет, цукровий діабет, синдром Рейтера, автоімунний гепатит, біліарний первинний цироз печінки, цироз печінки, фіброз печінки, антифосфоліпідний синдром, синдром танцюючих очей, скроневий артерит, гострий розсіяний енцефаломієліт, синдром Гудпасчера, гранулематоз Вегенера, целіакію, пухирчатку, поліартрит, теплову автоімунну гемолітичну анемію, синдром Такаюсу, хворобу коронарних артерій, ендометріоз, інтерстиціальний цистит, нейроміотонію, склеродерму, вітіліго, вульводинію, хворобу Шагаса, саркоїдоз, синдром хронічної втоми, синдром гострої дихальної недостатності, тендиніт, бурсит, ревматичну поліміалгію, запальне захворювання кишечника, хронічне обструктивне захворювання легень, алергічний риніт, серцево-судинне захворювання, хронічний холецистит, бронхоектази, пневмоконіоз, як наприклад, силікоз, остеоартрит, саркоїдоз, вегетативну дистонію, анкілозуючий спондилоартрит, гострий передній увеїт, червоний вовчак, інсулінозалежний цукровий діабет, звичайну пухирчатку, експериментальний алергічний енцефаломієліт, експериментальний автоімунний увеїт, змішане захворювання сполучної тканини, синдром Шагреня, автоімунну гемолітичну анемію, автоімунну тромбоцитопенічну пурпуру, гостру ревматичну атаку, змішану основну кріоглобулінемію, ювенільний ревматоїдний артрит, дегенеративну поразку суглоба, анкілозуючий спондилоартрит, псоріатичний артрит, невралгію, синовіт, гломерулонефрит, васкуліт, запалення, що зустрічається у вигляді залишкового явища після грипу, застуду та інші вірусні інфекції, подагру, контактний дерматит, біль у нижній частині спини і у шиї, дисменорею, головний біль, зубний біль, розтягання зв'язок, розтягання сухожилля, міозит, опіки, травми і біль, і запалення після хірургічних і стоматологічних процедур в індивіда.

Терапія клітинного росту і регенерації тканини

Було показано, що поліпептиди за винаходом індукують мітогенну програму, що підсилює ріст клітини, в певних типах клітин і клітинних ліній, таких як, наприклад, клітини гепатоми Huh7 і фе-

тальні фібробласти легені MRC5. Ця мітогенна програма виявлена при застосуванні дослідження експресійної мікроматриці і дослідження життєздатності клітин і клітинних ліній, оброблених поліпептидами за винаходом. Даний винахід стосується застосування поліпептидів за винаходом для стимуляції клітинного росту і регенерації тканини *in vitro*, *in vivo* і *ex vivo* при використанні тканин і клітин, одержаних від індивідумів або ссавців.

Похідні поліпептидів за винаходом

Винахід стосується поліпептидів, які відрізняються від будь-якого поліпептиду, зазначеного на фіг. 1-5, амінокислотами з 1 по 34, такі розходження можуть включати заміни, інсерції, делеції, об'єднання модифікованих амінокислот або похідних амінокислот, і додавання або вилучення амінокислот з С-термінального або N-термінального кінця поліпептидів. Одна або декілька амінокислотних заміни можуть бути одержані в поліпептидах за винаходом відповідно, наприклад, до замінюваної групи (такої як, група консервативної заміни), такої як викладені нижче. Як альтернатива або додатково в поліпептидах можуть бути одержані одна або декілька амінокислотних заміни, які вводять або вилучають амінокислотний залишок, що містить приєднуючу групу для неполіпептидного фрагмента. Приклади включають введення одного або декількох сайтів N-глікозилювання, введення одного або декількох залишків цистеїну або залишків лізину, вилучення одного або декількох сайтів N-глікозилювання і/або вилучення одного або декількох залишків лізину або гістидину. Деякі схожі поліпептиди проявляють олігоаденілатсинтетазну активність. Групи консервативних заміни включають: Групу 1, Аланін (A) Гліцин (G) Серин (S) Треонін (T), Групу 2, Аспарагінова кислота (D) Глутамінова кислота (E), Групу 3, Аспарагін (N) Глутамін (Q), Групу 4, Аргінін (R) Лізин (K) Гістидин (H), Групу 5, Ізолейцин (I) Лейцин (L) Метіонін (M) Валін (V), і Групу 6, Фенілаланін (F) Тирозин (Y) Триптофан (W). Можуть бути перераховані інші групи заміни амінокислот. Наприклад, амінокислоти можуть бути згруповані за схожою функцією або хімічною структурою, або за композицією (наприклад, кислотна, основна, аліфатична, ароматична, сірковмісна). Наприклад, Аліфатичне угруповання може містити в собі: Гліцин (G), Аланін (A), Валін (V), Лейцин (L), Ізолейцин (I). Інші групи, що містять амінокислоти, які вважаються консервативними замінами одна для одної, включають: Ароматичну групу: Фенілаланін (F), Тирозин (Y), Триптофан (W); Сірковмісну групу: Метіонін (M), Цистеїн (C); Основну групу: Аргінін (R), Лізин (K), Гістидин (H); Кислотну групу: Аспарагінова кислота (D), Глутамінова кислота (E), Аспарагін (N), Глутамін (Q). Додаткові угруповання амінокислот дивіться також у Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company. У даному винаході в списку поліпептидної послідовності додається спеціальний список всіх консервативно заміщених поліпептидних послідовностей у сполученні зі згаданими вище групами заміни.

В одному аспекті винахід стосується виділених або рекомбінантних поліпептидів, кожен з яких містить послідовність, що має принаймні 90% схо-

жості послідовності (наприклад, принаймні приблизно 91%, принаймні приблизно 92%, принаймні приблизно 93%, принаймні приблизно 94%, принаймні приблизно 95%, принаймні приблизно 96%, принаймні приблизно 97%, принаймні приблизно 98% або принаймні приблизно 99% схожості амінокислотної послідовності) із будь-яким поліпептидом із фіг. 5. В окремих випадках поліпептид проявляє олігоаденілатсинтетазну активність.

Ступінь схожості однієї послідовності (поліпептиду або нуклеїнової кислоти) з іншою дає відображення схожих структурних і функціональних властивостей двох послідовностей. Відповідно до цього, у контексті даного винаходу, послідовності, які мають схожу послідовність із будь-якою заданою ілюстративною послідовністю, є характерною рисою даного винаходу. Зокрема, послідовності, які мають відсоток схожості послідовності згідно з наведеними нижче даними, є характерною рисою винаходу. Може застосовуватися безліч способів визначення споріднення послідовностей, включаючи вирівнювання вручну і вирівнювання і аналіз послідовності, що здійснюють за допомогою комп'ютера. Доступний ряд комп'ютерних програм для здійснення вирівнювання послідовностей, або вирівнювання може проводитися фахівцем вручну.

Як відзначено вище, послідовності поліпептидів і нуклеїнових кислот, використані в тематичі винаходу, не повинні бути ідентичними, але можуть бути в достатній мірі схожими з відповідною послідовністю поліпептиду за винаходом або нуклеїнової кислоти за винаходом. Наприклад, поліпептиди за винаходом можуть піддаватися різним змінам, таким як одна або більше амінокислотних інсерцій, делецій і/або заміни, або консервативних, або неконсервативних, включаючи випадки, коли, наприклад, такі зміни могли б забезпечити деякі переваги в їхньому застосуванні, такому як, їхнє терапевтичне або профілактичне застосування або призначення, або діагностичне застосування. Також нуклеїнові кислоти за винаходом можуть піддаватися різним змінам, таким як одна або декілька заміни однієї або декількох нуклеїнових кислот в одному або декількох кодонах, таких, що певний кодон кодує ту ж саму амінокислоту або іншу, що призводить або до варіанта, що мовчить (як визначено у даному винаході), або до варіанта, що не мовчить, або однієї або декількох делецій однієї або декількох нуклеїнових кислот (або кодонів) у послідовності. Також нуклеїнові кислоти можуть бути модифіковані для внесення одного або більше кодонів, що забезпечить оптимум експресії в експресійній системі (наприклад, у системі бактерій або ссавців), тоді як, якщо потрібно, один або декілька згаданих кодонів як і раніше кодують ту саму амінокислоту(-и). Такі зміни нуклеїнової кислоти можуть передбачати деякі переваги при їхньому терапевтичному або профілактичному застосуванні або призначенні, або при діагностичному застосуванні. Нуклеїнові кислоти і поліпептиди можуть бути модифіковані цілим рядом способів, оскільки вони містять у собі послідовність у значній мірі схожу (як описано нижче) із послідовністю відповідної нуклеїнової кислоти або поліпептиду за винаходом.

Термін "схожий" або "схожість" стосовно двох або декількох послідовностей нуклеїнової кислоти або поліпептиду стосується двох або декількох послідовностей, які є однаковими або мають встановлений відсоток однакових амінокислотних залишків або нуклеотидів при порівнянні і вирівнюванні на максимальну схожість, що встановлено при використанні алгоритму порівняння послідовності або при візуальному дослідженні.

"Відсоток схожості послідовності" ("% схожості") аналізованої послідовності з вихідною (тобто із запитуваною) послідовністю має на увазі, що аналізована послідовність ідентична (тобто, за принципом амінокислота за амінокислотою для поліпептидної послідовності або за принципом нуклеотид за нуклеотидом для полінуклеотидної послідовності) запитуваної послідовності по всій порівнюваній довжині відповідно до встановленого відсотка.

Сайт-спрямований мутагенез для створення поліпептидів за винаходом

Поліпептиди за даним винаходом можуть бути сконструйовані при застосуванні будь-якої стандартної технології сайт-спрямованого мутагенезу. Послідовності нуклеїнової кислоти, що відповідають поліпептидам за винаходом, синтезуються за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів і високоточної ДНК-полімерази. Послідовність-мішень обмежена дволанцюговою плазмідною, виділеною зі сприйнятливого до метилування штаму *E. coli*. Комплементарні олігонуклеотиди, що несуть бажану мутацію, синтезують і очищають, застосовуючи електрофорез у поліакриламідному гелі. Термоциклер служить для регулювання температури змінюваних циклів, денатурації зразка дволанцюгової плазмиди (94°C протягом 30 секунд), випалення олігонуклеотидних праймерів (55°C протягом 1 хвилини) і подовження праймерів високоточною полімеразою (68°C протягом 1 хвилини на тисячу основ довжини плазмиди). Приблизно після 15 циклів суміш тільки що синтезованої і вихідної ДНК обробляють рестрикційним ферментом, специфічним до метильованих залишків (Dpn I) для розщеплення вихідної плазмиди. ДНК, що утворилася, вводять у хімічно або електрично компетентні бактеріальні штами для відбору і виділення плазмід, що містять бажані мутації. Плазмідну ДНК виділяють із трансформантів і перевіряють за допомогою секвенування із флуоресцентним барвником, що обриває ланцюг, для підтвердження мутантної послідовності.

Експресія діючої речовини препарату у великому об'ємі, ферментація та очищення

Штам *E. coli*, що містить лізогенний  $\lambda$ DE3 і, отже, несе хромосомну копію гена РНК-полімерази T7 під контролем промотору lacUV5, трансформують бактеріальним експресійним вектором, що містить IPTG-індуцибельний промотор, який кодує послідовність нуклеїнової кислоти, що відповідає одному або декільком поліпептидам за даним винаходом. Культури вирощують при 37°C на середовищі Luria, доповненої 34 мкг/мл хлорамфеніколу і 15 мкг/мл канаміцину. Коли OD600 досягає >0,4, температуру зменшують до 18°C, і на клітини впливають 0,5 mM IPTG протягом 17 годин. Потім бактеріальні клітини ресуспендують у буфері, що

містить 50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM імідазол, 10% гліцерин, 0,1% NP40, 2 mM DTT та інгібітори протеаз (VWR), лізують у гомогенізаторі Gaulin і центрифугують для вилучення клітинного дебриса перед очищенням білка.

В одному з варіантів здійснення очищення поліпептидів за даним винаходом може досягатися при застосуванні поліістидинової мітки на амінокінці. При афінному очищенні поліістидинових міток застосовують нікелеву колонку, наприклад, колонку об'ємом 5 мл використовують для лізату, одержаного з 4 л *E. coli*. Лізат завантажують у колонку і потім промивають Буфером А (50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 30% гліцерин, 20 mM імідазол, 2 mM DTT при pH 7,5). Потім проводять етап елюції 7% Буфером В (50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 30% гліцерин, 2M імідазол, 2 mM DTT при pH 6,8) в об'ємі, що дорівнює 3,2 об'єму колонки. Потім досягається 100% градієнт Буфера В більше ніж 3 об'ємами колонки. Потім поліпептид за даним винаходом може пройти гель-фільтрацію в Буфері С (50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 40% гліцерин, 1 mM EDTA, 2 mM DTT при pH 6,8) і може бути завантажений у катіонообмінну колонку для наступного очищення. Після завантаження білка, колонку промивають Буфером С, потім йде етап елюції до 75% Буфера D (50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 1M NaCl, 40% гліцерин, 1 mM EDTA, 2 mM DTT при pH 6,8), потім досягається 100% градієнт Буфера D при використанні 5 об'ємів колонки. Потім білок проходить гель-фільтрацію в Буфері Е (50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 40% гліцерин, 1 mM EDTA, 2 mM DTT при pH 6,8) і зберігається при -20°C.

Різні варіанти здійснення поліпептидів за винаходом, включаючи, але ними не обмежуючись: поліпептиди без поліістидинової мітки, поліпептиди, що мають поліаргінінову мітку, поліпептиди зі зменшеним вмістом цистеїну, поліпептиди з модифікаціями амінокислотної послідовності, задуманими для одержання більш термостабільної можливої діючої речовини лікарського засобу, поліпептиди з модифікаціями для збільшення або зниження специфічної активності можливої діючої речовини лікарського засобу можуть мати потребу в альтернативних підходах до очищення. Наприклад, варіанти здійснення можливої поліпептидної діючої речовини препарату без поліістидинової мітки можуть безпосередньо наноситися на катіонообмінну колонку. Можуть проводитися додаткові етапи, наприклад, хроматографія, основана на гідрофобній взаємодії, при розміщенні білка в Буфері F (50 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30% гліцерин, 1 mM EDTA, 2 mM DTT при pH 6,8) і пропусканні 10 об'ємів колонки до 100% градієнта Буфера Е. Можуть використовуватися інші афінні колонки або колонки, що сортують за величиною, для очищення різних варіантів здійснень можливих поліпептидних діючих речовин препарату.

Також можуть застосовуватися альтернативні способи при зміні буферів, концентрації можливих діючих речовин лікарського засобу і при очищенні діючих речовин лікарських засобів. Ці способи можуть включати, але ними не обмежуються, ультрафільтрацію, контактну фільтрацію вздовж потоку



і діалітрацію при концентруванні можливої діючої речовини препарату і при заміні буферів. Також можуть застосовуватися технічні прийоми, такі як преципітація можливих діючих речовин лікарського засобу за допомогою  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  або якої-небудь іншої хімічної речовини. Також може застосовуватися денатурування можливої діючої речовини препарату в сечовині або в якій-небудь іншій денатурованій речовині і рефолдинг.

Поліпептиди за даним винаходом стабілізовані за допомогою ексципієнтів, що містять солі; розчини, стабільні при 300 мМ NaCl можуть почати випадати в осад при 150 мМ NaCl. Із цієї причини суміші ексципієнтів тяжіють до цих стабілізуючих концентрацій солі, які можуть включати, але не обмежуються цим, фосфат натрію, хлорид натрію, хлорид кальцію і хлорид магнію.

Доведено, що додавання ексципієнтів, основаних на амінокислотах, таких як аргінін, стабілізує поліпептиди за даним винаходом. 10% розчин сахарози дає можливість поліпептидам за винаходом бути стабільними при 1 мг/мл, додавання 2% (маса/об'єм) аргініну дає можливість деяким варіантам здійснення поліпептидів бути стабільними при 3 мг/мл. Із цієї причини інші сполуки, основані на амінокислотах, включаючи, але не обмежуючись цим, гістидин, глутамін, гліцин і альбумін людини, можуть застосовуватися як ексципієнти.

Внесення ексципієнтів, таких як гліцерин, стабілізує поліпептиди за даним винаходом. Наприклад, в одному із варіантів здійснення поліпептидів має максимальну концентрацію, що дорівнює 1 мг/мл, при 10% гліцерину (об'єм/об'єм); тоді як при 40% гліцерину можливі діючі речовини лікарського засобу стабільні при концентрації до 12 мг/мл. Суміші ексципієнтів, що містять сполуки зі схожими хімічними властивостями, передбачають включення, але не обмежуються цим, багатоатомних спиртів, таких як маніт, ксиліт і сорбіт. Виявлено, що дисахариди, такі як сахароза, стабілізують при концентрації 10% маса/об'єм; також можуть застосовуватися інші дисахариди, включаючи, але ними не обмежуючись, мальтозу і трегалозу. Також у даному винаході можуть використовуватися моносахариди. Також при застосуванні даного винаходу можуть використовуватися полісорбати, поліетилеогліколи і подібні сполуки.

Фахівцям в даній галузі очевидно, що для забезпечення стабільності поліпептидів під час зберігання також можуть використовуватися антиоксиданти і консерванти. Антиоксиданти, включаючи, але не обмежуючись цим, цитрат натрію, можуть бути стабілізаторами при тривалому зберіганні поліпептидів за винаходом. Консерванти, включаючи, але не обмежуючись цим, бензиловий спирт, також можуть стабілізувати поліпептиди під час зберігання і можуть застосовуватися в підсумкових сумішах ексципієнтів.

Вимір олігоаденілатсинтезної активності поліпептидів

Олігоаденілатсинтезна активність поліпептидів за винаходом вимірюється відповідно до раніше опублікованих способів (Justesen, J., et al. *Nuc Acids Res.* 8:3073-3085, 1980). Коротко: білок активують полііозиновою:поліцитидиловою кис-

лотою (200 мкг/мл) у буфері, що містить 20 мМ Tris-HCl, pH 7,8, 50 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 0,2 мМ EDTA, 2,5 мМ ATP, a [<sup>32</sup>P]ATP, 0,5 мг/мл BSA і 10% гліцерин. Реакція протікає при 37°C протягом від 30 хвилин до 24 годин і зупиняється за допомогою нагрівання до 90°C протягом 3 хвилин. 2-4 мкл реакційної суміші наноситься на пластинку для тонкошарової хроматографії з PEI-целюлози. Після висихання пластинку обробляють 0,4М Tris-HCl, 30 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 8,7. Пластинку підсушують і візуалізують за допомогою люмінесцентного дослідження. Або ж крім того можна інкубувати реакційну суміш із 0,05 У/мкл шлункової фосфатази теляти для вилучення термінального фосфату. Тонкошаровий хроматографічний поділ досягається при використанні буферної системи з 0,76М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3,6. Потім пластинку висушують і візуалізують за допомогою люмінесцентного дослідження.

Вимірювання противірусної активності поліпептидів

Здатність поліпептидів за даним винаходом захищати клітини, що культивують, від цитотоксичних вірусів доводять, застосовуючи інфекційну модель із вірусом мишачого енцефаломіокардиту (EMCV, штам VR-129B в ATCC). Інші моделі вірусної інфекції *in vitro* включають, але ними не обмежуються, флавівіруси, такі як вірус діареї великої рогатої худоби, вірус Західного Нілу і вірус GBV-C, інші РНК-віруси, такі як респіраторно-синцитіальний вірус, і репліконні системи HCV (наприклад, Blight, K.J., et al. 2002. *J. Virology*, 76:13001-13014). У противірусних дослідженнях може використовуватися будь-яка придатна для вірусної реплікації клітина, що культивується.

Клітини гепатоми людини HuH7 засівають у 96-ямокву культуральну плашку при густині  $1 \times 10^4$  клітин/ямку та інкубують всю ніч у повнім середовищі (у DMEM, що містить 10% ембріональної бичачої сироватки). На наступний ранок середовище замінюють повним середовищем, що має у своєму складі 0-10 мкМ білка або еквівалентні кількості білкового буфера для розведення. Якщо потрібно, додають інтерферон-альфа в концентрації 100 Од./мл. Проводять попередню обробку клітин протягом 2-8 годин перед зараженням вірусом. Після попередньої обробки в ямки вносять однаковий об'єм середовища, що містить розведення вірусу ЕМС у повнім середовищі. В описаних тут експериментах на ямку додають 50-500 бляшкоутворюючих одиниць (БУО).

Вірусна інфекція розвивається протягом ночі (приблизно 18 годин), і підраховується відсоткова частка життєздатних клітин при використанні будь-яких доступних реагентів для оцінки клітинної життєздатності або цитотоксичності. Описані тут результати одержують, застосовуючи аналіз життєздатності клітин, у якому оцінюється перетворення сполуки тетразолію [3-(4,5-диметил-2-іл)-5-(3-карбоксиметоксифеніл)-2-(4-сульфофеніл)-2Н-тетразолій, внутрішня сіль; MTS] у пофарбовану сполуку формазану в життєздатних клітинах. Перетворення MTS у формазан детектують у спектрофотометрі для читання 96-ямкових плашок при оптичній густині 492 нм. Одержувані оптичні густини

ни або негайно наносять на схему для оцінки клітинної життєздатності, або нормалізують із контрольними зразками для підрахунку відсотка життєздатних клітин після обробки.

ПЕГілювання поліпептиду; сульфгідрил

Приєднання поліетиленгліколю (ПЕГ) до поліпептидів за винаходом досягали за допомогою змішування вільного від дитіотреїтолу (DTT) очищеного поліпептиду з активованим mPEG-MAL (Nektar Therapeutics) у молярному відношенні 0,5-10:1. Реакція розвивалася при кімнатній температурі протягом 5 хвилин - 2 годин, і її пригнічували за допомогою додавання 2 мМ DTT. Спостерігали злиття із численними сайтами цистеїну при застосуванні лінійного ПЕГ (20 кДа) і розгалуженого ПЕГ (40 кДа), (фіг. 6A і 6B). НеПЕГілювані форми і форми, що містять один або декілька ПЕГ, можуть бути відділені один від одного при застосуванні ряду хроматографічних методів, відомих фахівцям у даній галузі. В ілюстративних варіантах здійснення даного винаходу для виділення різних форм ПЕГ можуть використовуватися іонообмінні колонки, колонки, основані на гідрофобних взаємодіях, гель-фільтрація та ексклюзивна хроматографія розмірів, кожна окремо або в сполученні одна з одною.

ПЕГілювання поліпептиду на N-кінці

N-термінальний амін поліпептидів за винаходом може бути ПЕГілюваний. До поліпептидів у 50 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, 30% гліцерині, 1 мМ EDTA, 2 мМ DTT при pH 5, що містить 20 мМ натрію ціаноборогидрид і перемішаним на льодяній бані, додають 5-кратну перевищуючу кількість mPEG butyrALD-40K. Реакція розвивається до десяти годин і потім пригнічується при додаванні 50-кратно перевищуючої кількості гліцерину. Продукти реакції досліджують за допомогою SDS-PAGE.

Нижченаведені приклади надаються як ілюстрація, але не як обмеження.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1

Амінокислотні модифікації в білках OAS1 приматів, які не є людьми

Гени OAS1 приматів, які не є людьми, секвенували і порівняли за мутаціями, виявленими в гені людини OAS1. Такі мутації створюють додаткове правильне уявлення про еволюції гена і білка OAS1. Еволюційно консервативні амінокислоти наводять на думку про сайти, важливі або критичні для функціонування OAS1 або для ферментативної активності. З іншого боку амінокислотні сайти OAS1, які мутували недавно, наприклад, тільки в людей, і демонструють сукупність амінокислотних замінів серед приматів, зазначають на сайти менш критичні для функціонування або ферментативної активності. Відносний вміст сайтів, які мутували у межах окремого мотиву білка OAS1 корелює з толерантністю цього функціонального домену до зміни. Такі сайти і мотиви забезпечують найбільше поліпшення функції білка або специфічної активності. Аналогічним чином, мутації в генах і білках з імунними або противірусними функціями, як OAS1, гіпотетично є результатом історичної зміни внаслідок вірусної інфекції. Виходячи із цього, мутації в білках OAS1 приматів гіпотетично поліпшують

противірусну ефективність і являють собою можливість для досягнення найкращої якості терапевтичного білка людини OAS1.

В ілюстративному варіанті здійснення успадкована від приматів амінокислота певного сайту OAS1 може бути відновлена в терапевтичній формі білка людини OAS1 для оптимізації специфічної білкової активності або противірусної ефективності. В інших варіантах здійснення альтернативні амінокислоти, ідентифіковані в OAS1 приматів, які не є людьми, але необов'язково спадково консервативні, замінені в терапевтичній формі людини OAS1 для поліпшення специфічної білкової активності або противірусної ефективності. Послідовності ДНК і мРНК, які кодують природні білки приматів, а також гібридні форми білків приматів і людини є оригінальними і мають застосування. Деякі приклади їхнього застосування: як агенти для виявлення відповідних їм варіантів ДНК або мРНК; в експресійних векторах, застосовуваних у виробництві терапевтичних білків; і при виявленні нових сполук, які зв'язують відповідну мРНК.

Фіг. 1 надає терапевтичну форму OAS1 (SEQ ID NO:1). Модифікації цієї форми для надання додаткових терапевтичних форм здійснюються при застосуванні принаймні однієї амінокислотної модифікації, як запропоновано на фіг. 2. Як зображено на фіг. 2, корисні модифікації являють собою відщеплення ініціюючого метіоніну з SEQ ID NO:1 та інших форм OAS1. Як показано на фіг. 3, створені додаткові модифікації. Попередні модифікації, описані на фіг. 2 і 3, також застосовуються для інших терапевтичних ізоформ OAS1, запропонованих на фіг. 5. Фіг. 3 також надає специфічні модифікації білків OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером в Genebank NP\_002525.1 (наприклад, SEQ ID NO:3), специфічні модифікації білків OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_0058132.1 (наприклад, SEQ ID NO:2) і специфічні модифікації білків OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером у Genebank NP\_001027581.1 (наприклад, SEQ ID NO:4). На Фігурі 4 перераховані ілюстративні мутації, ідентифіковані в приматів, які не є людьми, включаючи горилу, шимпанзе, орангутана і макаку. На фіг. 5 наведений список додаткових ізоформ OAS1 людини і приматів, що не є людьми, які є придатними для діагностичних і терапевтичних цілей за даним винаходом, а також конкретні мутації в приматів, описані у даному винаході.

##### Приклад 2

Одержання і секвенування кДНК

Із лімфобластів, що культивуються, або фібробластів пацієнтів, що мають стійкий до гепатиту С фенотип, очищають тотальну клітинну РНК. Процедuru очищення проводять, як описано Chomczynski, et al., Anal. Biochem., 162:156-159 (1987). Для формування клітинного лізату клітини гомогенізують у 10 мілілітрах (мл) денатуруючого розчину, що містить 4,0М гуанідиніотіоанат, ОДМ Tris-HCl при pH 7,5, і ОДМ бета-меркаптоетанол. Потім до клітинного лізату додають лаурилсаркозинат натрію до кінцевої концентрації 0,5%, після

чого суміш центрифугують при 5000хg протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Одержаний супернатант, що містить тотальну РНК, нашаровують на буфер з 5,7М хлориду цезію і 0,01М EDTA при рН 7,5 та осаджують за допомогою центрифугування. Одержаний осад РНК розчиняють у розчині 10 мМ Tris-HCl при рН 7,6 і 1 мМ EDTA (TE), що містить 0,1% додецилсульфату натрію (SDS). Після екстракції фенолом і хлороформом і осадження етанолом, оцінюють концентрацію очищеної тотальної клітинної РНК за допомогою виміру оптичної щільності при 260 нм.

Тотальну РНК, одержану вище, застосовують як матрицю для синтезу кДНК, використовуючи зворотну транскриптазу для синтезу першого ланцюга і ПЛР із олігонуклеотидними праймерами, розробленими таким чином, щоб ампліфікувати кДНК у вигляді двох фрагментів, що перекриваються, позначених як 5' і 3' фрагменти. Олігонуклеотиди, використовувані при застосуванні цього винаходу, синтезують на Applied Biosystems 381A DNA Synthesizer, додержуючись інструкцій виробника. Проводять ПЛР, застосовуючи методи, відомі в даній галузі. Методи ПЛР-ампліфікації детально описуються в патентах США No. 4683192,

4683202, 4800159 і 4965188, і принаймні в декількох текстах, включаючи PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, New York (1989); і PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, et al., eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990), а праймери на основі нуклеотидних послідовностей, що кодують модифіковані ділянки амінокислот, розкриваються у даному винаході.

Аналізуються послідовності, визначені безпосередньо за ПЛР-ампліфікованим ДНК пацієнтів з інфекцією HCV і без неї. Наявність мутації, що знаходиться в 3'-5' напрямку, щодо кодуєчої області гена OAS, може бути виявлена в пацієнтів, які є серологічно негативними до HCV, незважаючи на повторні впливи вірусу.

Попередня специфікація, включаючи конкретні варіанти здійснення і приклади, є ілюстративною стосовно даного винаходу і не розглядається як обмежуюча. Можуть вироблятися інші численні зміни і модифікації без відступу від справжньої сутності винаходу і його рамок. Всі згадані патенти, патентні публікації і непатентні публікації включені в даний винахід як посилання.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; Illumigen Biosciences Inc.

&lt;120&gt; МУТАЦІЇ В ГЕНАХ OAS1

&lt;130&gt; 55382-52

&lt;140&gt; PCT/US06/016983

&lt;141&gt; 2006-05-03

&lt;150&gt; 60/677,680

&lt;151&gt; 2005-05-04

&lt;160&gt; 16

&lt;170&gt; FastSEQ for windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 346

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1      5      10      15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20      25      30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35      40      45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50      55      60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
 65      70      75      80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
 85      90      95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
100      105      110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
115      120      125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
130      135      140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
145      150      155      160
Gly Ser Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
165      170      175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
180      185      190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
195      200      205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Leu Gly
210      215      220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225      230      235      240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245      250      255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260      265      270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
275      280      285
Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
290      295      300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
305      310      315      320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325      330      335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu

```

340

345

<210> 2  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
 115 120 125  
 Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly  
 130 135 140  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu  
 165 170 175  
 Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 180 185 190  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 260 265 270  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Ala Glu Ser Asn Ser Ala  
 340 345 350  
 Asp Asp Glu Thr Asp Asp Pro Arg Arg Tyr Gln Lys Tyr Gly Tyr Ile  
 355 360 365  
 Gly Thr His Glu Tyr Pro His Phe Ser His Arg Pro Ser Thr Leu Gln  
 370 375 380  
 Ala Ala Ser Thr Pro Gln Ala Glu Glu Asp Trp Thr Cys Thr Ile Leu  
 385 390 395 400

<210> 3  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15

Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 Ala Ile Asp 20 Ile Ile Cys Gly Phe 25 Leu Lys Glu Arg Cys 30 Phe Arg Gly  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val 40 Ser Lys Val Val Lys 45 Gly Gly Ser Ser  
 Gly 50 Lys Gly Thr Thr Leu 55 Arg Gly Arg Ser Asp 60 Ala Asp Leu Val Val  
 65 Phe Leu Ser Pro Leu 70 Thr Thr Phe Gln Asp 75 Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 Glu Phe Ile Gln 85 Glu Ile Arg Arg Gln 90 Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 Arg Ala Phe 100 Ser Val Lys Phe 105 Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
 Pro Arg Ala 115 Leu Ser Phe Val 120 Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly  
 Val 130 Glu Phe Asp Val Leu 135 Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 Gly Gly Tyr Lys Pro 150 Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu  
 Cys Thr Asp Leu 165 Gln Lys Glu Gly Glu 170 Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 Leu Gln Arg 180 Asp Phe Leu Lys Gln 185 Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 Ile Arg 195 Leu Val Lys His Trp 200 Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 Lys 210 Leu Pro Pro Gln Tyr 215 Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 Glu Arg Gly Ser Met 230 Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 Thr Val Leu 245 Glu Leu Val Ile Asn Tyr 250 Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 Thr Lys Tyr 260 Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg  
 Arg Gln 275 Leu Thr Lys Pro Arg 280 Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly 295 Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 Gln Glu Ala Glu Ala 310 Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 Gly Ser Pro Val 325 Ser Ser Trp Ile Leu 330 Leu Val Arg Pro Pro Ala Ser  
 Ser Leu Pro 340 Phe Ile Pro Ala Pro 345 Leu His Glu Ala  
 355 360

<210> 4  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val 55 Ser Lys Val Val Lys 60 Gly Gly Ser Ser  
 50 65  
 Gly Lys Gly Thr Thr Leu 70 Arg Gly Arg Ser Asp 75 Ala Asp Leu Val Val  
 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu 85 Thr Thr Phe Gln Asp 90 Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln 105 Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 110  
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu 120 Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
 115 125  
 Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly

130 135 140  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu  
 Cys Thr Asp Leu 165 Gln Lys Glu Gly Glu 170 Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 Ile Arg 195 Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr 250 Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg  
 Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro Gly  
 Ser Ile His 340 Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro Leu  
 Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp Gln  
 Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser Ser  
 385 Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser 400  
 405 410

<210> 5  
 <211> 353  
 <212> PRT  
 <213> Горила горила

<400> 5  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
 115 Pro Cys Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Lys Glu  
 Cys Thr Tyr Leu 165 Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 195 200 205

Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Thr Val Leu Glu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 260 265 270  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ser Gly  
 340 345 350  
 Arg

<210> 6  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Горила горила

<400> 6  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
 115 120 125  
 Pro Cys Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly  
 130 135 140  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Lys Glu  
 165 170 175  
 Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 180 185 190  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 260 265 270  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp



Gly Ser Pro Val 325 Ser Ser Trp Ile Leu 330 Leu Val Arg Pro Pro 335  
 Ser Leu Pro Phe 340 Ile Pro Ala Pro Leu 345 His Lys Ala 350 Ala Ser  
 355 360

<210> 7  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> Горила горила

<400> 7  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn  
 115 120 125  
 Pro Cys Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly  
 130 135 140  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Lys Glu  
 165 170 175  
 Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 180 185 190  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 260 265 270  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu Lys Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro Gly  
 340 345 350  
 Ser Ile His Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro Leu  
 355 360 365  
 Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp Gln  
 370 375 380  
 Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser  
 405 410

<210> 8  
 <211> 401

<212> PRT  
 <213> Pan paniscus

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 336  
 <223> Xaa € Trp a6o Cys

<400> 8  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Thr Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Val Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp  
 115 120 125  
 Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu  
 130 135 140  
 Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu  
 165 170 175  
 Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr  
 180 185 190  
 Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu  
 210 215 220  
 Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala  
 225 230 235 240  
 Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe  
 245 250 255  
 Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr  
 260 265 270  
 Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu  
 275 280 285  
 Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp  
 290 295 300  
 Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa  
 325 330 335  
 Asp Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ser  
 340 345 350  
 Ala Asp Asp Glu Thr Asp Asp Pro Arg Arg Tyr Gln Lys Tyr Gly Tyr  
 355 360 365  
 Ile Gly Thr His Glu Tyr Pro His Phe Ser His Arg Pro Ser Thr Leu  
 370 375 380  
 Gln Ala Ala Ser Ala Pro Gln Ala Glu Glu Asp Trp Thr Cys Thr Ile  
 385 390 395 400  
 Leu

<210> 9  
 <211> 365  
 <212> PRT  
 <213> Pan paniscus  
 <220>

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; 336

&lt;223&gt; Xaa ε Trp a6o Cys

&lt;400&gt; 9

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Thr Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Val Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp  
 115 120 125  
 Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu  
 130 135 140  
 Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu  
 165 170 175  
 Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr  
 180 185 190  
 Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu  
 210 215 220  
 Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Thr Val Tyr Ala  
 225 230 235 240  
 Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe  
 245 250 255  
 Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr  
 260 265 270  
 Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu  
 275 280 285  
 Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp  
 290 295 300  
 Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa  
 325 330 335  
 Asp Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Ala  
 340 345 350  
 Ser Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Glu Ala  
 355 360 365

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 415

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pan paniscus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; 336

&lt;223&gt; Xaa ε Trp a6o Cys

&lt;400&gt; 10

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Lys Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly

Ser 35 Tyr Pro Val Cys Val 40 Ser Lys Val Val 45 Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Val Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp  
 115 120 125  
 Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu  
 130 135 140  
 Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu  
 165 170 175  
 Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr  
 180 185 190  
 Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu  
 210 215 220  
 Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Thr Val Tyr Ala  
 225 230 235 240  
 Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe  
 245 250 255  
 Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr  
 260 265 270  
 Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu  
 275 280 285  
 Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp  
 290 295 300  
 Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa  
 325 330 335  
 Asp Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro  
 340 345 350  
 Gly Ser Ile Arg Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro  
 355 360 365  
 Leu Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp  
 370 375 380  
 Gln Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser  
 405 410 415

<210> 11  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes verus

<400> 11  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Lys Cys Phe Arg Lys Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Gln Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110

Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp  
 Asn Pro 115 Arg Ala Leu Ser Phe 120 Val Leu Ser Ser Leu 125 Gln Leu Gly Glu  
 Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu  
 145 Thr Asp Gly Tyr Lys 150 Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu  
 165 Glu Cys Thr Tyr 180 Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr  
 190 Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys 200 Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser  
 205 Leu Ile Arg Leu Val Lys His 215 Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu  
 220 Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Thr Val Tyr Ala  
 225 Trp Glu Gln Gly Ser 230 Met Glu Thr Asp Phe Asn Thr Ala Gln Glu Phe  
 245 Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr  
 260 Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu 280 Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu  
 275 Arg Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp  
 290 Pro Thr Gly Asn Leu Gly 310 Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu  
 305 Ala Gln Glu Ala Glu 325 Trp Leu Asn Tyr 330 Pro Cys Phe Lys Asn 335

<210> 12

<211> 335

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<220>

<221> VARIANT

<222> 117

<223> Xaa ε Ser a6o Ala

<400> 12

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Lys Cys Phe Arg Lys Gln Ile Asn His  
 20 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Gln Gly  
 35 Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 Glu Arg Ala Phe Xaa Val Lys Phe 105 Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp  
 115 Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu  
 130 Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu  
 145 Thr Asp Gly Tyr Lys 150 Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu  
 165 Glu Cys Thr Tyr 180 Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr  
 190 Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys 200 Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser  
 205 Leu Ile Arg Leu Val Lys His 215 Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu  
 220

Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala  
 225 230 235 240  
 Trp Glu Gln Gly Ser Met Glu Thr Asp Phe Asn Thr Ala Gln Glu Phe  
 245 250 255  
 Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr  
 260 265 270  
 Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu  
 275 280 285  
 Arg Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp  
 290 295 300  
 Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn  
 325 330 335

<210> 13  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Pongo pygmaeus abelii

<400> 13  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Ala Arg Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Lys Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Ser Ile Phe Arg Glu Val  
 115

<210> 14  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> Pongo pygmaeus abelii

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 113  
 <223> Xaa is Ser a6o Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 114  
 <223> Xaa e Ile a6o Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 116  
 <223> Xaa e Arg a6o Ser

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 117  
 <223> Xaa e Glu a6o Val

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 118  
 <223> Xaa e Val a6o Lys

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 119  
 <223> Xaa € Phe a6o term

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 142  
 <223> Xaa € Arg a6o Gly

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 363  
 <223> Xaa € Pro a6o Gln

<400> 14  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Lys Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp Asn  
 115 120 125  
 Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Phe Gln Leu Xaa Glu Gly  
 130 135 140  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu  
 165 170 175  
 Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 180 185 190  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 260 265 270  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Leu Ser  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Ile Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Ala Glu Ser Asp Ser Glu  
 340 345 350  
 Asp Asp Glu Thr Tyr Asp Pro Arg Met Tyr Xaa Lys Tyr Gly Tyr Ile  
 355 360 365  
 Arg Thr His Glu Tyr Ser His Phe Ser His Ser Pro Ser Thr Leu Gln  
 370 375 380  
 Ala Ala Ser Thr Pro Gln Ala Glu Glu Asn Trp Thr Cys Thr Ile Leu  
 385 390 395 400

<210> 15  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Pongo pygmaeus abelii

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 113  
 <223> Xaa € Ser a6o Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 114  
 <223> Xaa € Ile a6o Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 116  
 <223> Xaa € Arg a6o Ser

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 117  
 <223> Xaa € Glu a6o Val

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 118  
 <223> Xaa € Val a6o Lys

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 119  
 <223> Xaa € Phe a6o term

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 142  
 <223> Xaa € Arg a6o Gly

<400> 15  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly  
 85 90 95  
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Lys Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu  
 100 105 110  
 Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp Asn  
 115 120 125  
 Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Phe Gln Leu Xaa Glu Gly  
 130 135 140  
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu  
 165 170 175  
 Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu  
 180 185 190  
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu  
 195 200 205  
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly  
 210 215 220



Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp  
 225 230 235 240  
 Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg  
 245 250 255  
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp  
 260 265 270  
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu Asn Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Leu Ser  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro  
 290 295 300  
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Ile Gly Trp Arg Gln Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp  
 325 330 335  
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Ala Ser  
 340 345 350  
 Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Glu Ala  
 355 360

<210> 16  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> Pongo pygmaeus abelii

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 113  
 <223> Xaa € Ser a6o Arg

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 114  
 <223> Xaa € Ile a6o Ala

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 116  
 <223> Xaa € Arg a6o Ser

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 117  
 <223> Xaa € Glu a6o Val

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 118  
 <223> Xaa € Val a6o Lys

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 119  
 <223> Xaa € Phe a6o term

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 142  
 <223> Xaa € Arg a6o Gly

<400> 16  
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His  
 20 25 30  
 Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser  
 50 55 60

Gly 65	Lys	Gly	Thr	Ala	Leu 70	Arg	Gly	Arg	Ser	Asp 75	Ala	Asp	Leu	Val	Val 80
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu 85	Thr	Thr	Phe	Gln	Asp 90	Gln	Leu	Asn	Arg	Arg	Gly
Glu	Phe	Ile	Gln	Glu 100	Ile	Arg	Lys	Gln	Leu	Glu	Ala	Cys	Gln	Arg	Glu
Xaa	Xaa	Phe 115	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Glu 120	Val	Gln	Ala	Pro	Arg 125	Trp	Asp	Asn
Pro	Arg 130	Ala	Leu	Ser	Phe	Val 135	Leu	Ser	Ser	Phe	Gln 140	Leu	Xaa	Glu	Gly
Val 145	Glu	Phe	Asp	Val	Leu 150	Pro	Ala	Phe	Asp	Ala 155	Leu	Gly	Gln	Leu	Thr 160
Gly	Gly	Tyr	Lys	Pro 165	Asp	Pro	Gln	Ile	Tyr 170	Val	Lys	Leu	Ile	Glu	Glu
Cys	Thr	Asp	Leu 180	Gln	Lys	Glu	Gly	Glu 185	Phe	Ser	Thr	Cys	Phe 190	Thr	Glu
Leu	Gln 195	Arg	Asp	Phe	Leu	Lys	Gln	Arg	Pro	Thr	Lys	Leu 205	Lys	Ser	Leu
Ile	Arg 210	Leu	Val	Lys	His	Trp 215	Tyr	Gln	Asn	Cys	Lys 220	Lys	Lys	Leu	Gly
Lys 225	Leu	Pro	Pro	Gln	Tyr 230	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu 235	Thr	Val	Tyr	Ala	Trp 240
Glu	Arg	Gly	Ser	Met 245	Lys	Thr	His	Phe	Asn 250	Thr	Ala	Gln	Gly	Phe 255	Arg
Thr	Val	Leu	Glu 260	Leu	Val	Ile	Asn	Tyr 265	Gln	Gln	Leu	Cys	Ile 270	Tyr	Trp
Thr	Lys	Tyr 275	Tyr	Asp	Phe	Glu	Asn 280	Pro	Ile	Ile	Lys	Lys 285	Tyr	Leu	Ser
Arg	Gln 290	Leu	Lys	Lys	Pro	Arg 295	Pro	Val	Ile	Leu	Asp 300	Pro	Ala	Asp	Pro
Thr 305	Gly	Asn	Leu	Gly	Gly 310	Gly	Asp	Pro	Ile	Gly 315	Trp	Arg	Gln	Leu	Ala 320
Gln	Glu	Ala	Glu	Ala 325	Trp	Leu	Asn	Tyr	Pro 330	Cys	Phe	Lys	Asn	Trp	Asp 335
Gly	Ser	Pro	Val 340	Ser	Ser	Trp	Ile	Leu	Leu	Pro	Gln	His	Thr 350	Pro	Gly
Ser	Ile	His 355	Pro	Thr	Gly	Arg	Arg 360	Glu	Leu	Asp	Val	His 365	His	Pro	Leu
Asn	Ala 370	Ser	Ala	Ser	Trp	Gly 375	Lys	Gly	Leu	Gln	Cys 380	Tyr	Leu	Asp	His
Leu 385	Leu	His	Phe	Gln	Val 390	Gly	Leu	Leu	Ile	Gln 395	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser 400
Ser	Val	Ser	Trp	Cys 405	Ile	Ile	Gln	Asp	Arg 410	Gln	Val	Ser			

Переважна терапевтична форма OAS1

SEQ ID NO: 1

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK 60  
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRROLEACQRERAFSVKFE 120  
 121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGSYKPNPQIYVKLIEECTDL 180  
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW 240  
 241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTKYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD 300  
 301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKNWDGSPVSSWILL 346

Фіг. 1

Список амінокислотних замін, які можуть бути використані  
 для терапевтичних форм OAS1

Положення	Амінокислотні заміни
1	<b>M</b> або <b>-</b> (Виделена)
31	<b>D</b> або <b>N</b>
115	<b>L</b> або <b>F</b>
127	<b>G</b> або <b>R</b>
162	<b>S</b> або <b>G</b>
295	<b>R</b> або <b>T</b>
315	<b>G</b> або <b>R</b>

Фіг. 2

Список амінокислотних модифікацій у приматів, які можуть бути використані для терапевтичних форм OAS1

Положення	Амінокислотні заміни
24	Lys або Thr
25	His або Cys
28	Thr або Lys або Met
36	Thr або Ile
47	Gln або Arg
53	Ala або Val
54	Arg або Cys
54	Arg або His або Cys
64	Phe або Ser
69	Ala або Thr
69	Ala або Ser або Thr
74	Ile або Ser
104	Lys або Arg
108	Val або Ala
112	Введення Glu
113	Ser або Arg
114	Ile або Ala
116	Arg або Ser або Ala
117	Glu або Val
118	Val або Lys
119	Термінація або Phe
127	Asp або Gly
130	Cys або Arg
139	Phe або Leu
142	Arg або Gly
160	Ile або Thr
161	Asp або Gly
166	Asp або Asn
175	Lys або Glu
179	Tyr або Asp
200	Glu або Gln
226	Введення Pro
242	Gln або Arg
246	Glu або Lys
248	Asp або His
250	Ile або Asn
254	Glu або Gly
274	Val або Lys
279	Glu або Lys
282	Ser або Ile
284	Lys або Glu
288	Ser або Arg
289	Arg або Arg
292	Glu або Thr

Фіг. 3

292	Arg або Thr
292	Ser або Thr
314	Ile або Lys
335	Термінація або Trp
347+	Thr або Ala
347^	Pro або Thr
349+	Ser або Ser
350+	Asp або Asn
352+	Gly або Glu або Ala
353+	Arg або Asp
354+	Термінація або Asp
356+	Ser або Thr
357+	Tyr або Asp
361+	Met або Arg
361^	Glu або Gly
363*	Lys або Glu
363+	Pro або Gln
364+	Gln або Lys
364^	Val або Leu
365+	His або Tyr
369+	Gln або Arg або Gly
371+	Tyr або His
372^	Ala або Ala
373+	Cys або Tyr
374+	Ser або Pro
375+	Tyr або His
378+	Gln або His
379+	Ser або Arg
382+	Ile або Thr
384^	His або Gln
385 ^	Leu або Phe
388+	Ala або Thr
389+	Arg або Pro
394+	Asn або Asp
399^	Arg або Ser

\*Положення, які відмічені \*, стосуються форм OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером в Genebank NP\_002525.1 (наприклад, SEQ ID NO:3)

+Положення, які відмічені +, стосуються форм OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером в Genebank NP\_058132.1 (наприклад, SEQ ID NO:2)

^Положення, які відмічені ^, стосуються форм OAS1, які на карбоксильному кінці гомологічні послідовності з реєстраційним номером в Genebank NP\_001027581.1 (наприклад, SEQ ID NO:4)

Всі інші немарковані положення стосуються всіх форм OAS1

## Мутації в OAS1 приматів

Змінена/вихідна послідовність ДНК у видів приматів і людини														Кодони змін/вихідні	Положення амінокислоти	Положення кодона	Модифікації амінокислот (змін/вихідні)
Положення першої основи при мутації в початковому послідовності GENE BANK NT_009775.15	Alouatta palliata (Alouatta)	Leontideus rosalia (Leontideus)	Macaca assamensis (Macaca)	Macaca fascicularis (Macaca)	Macaca mulatta (Macaca)	Macaca nemestrina (Macaca)	Macaca speciosa (Macaca)	Macaca thibetana (Macaca)	Macaca tonkinensis (Macaca)	Macaca uropygialis (Macaca)	Macaca vitiensis (Macaca)	Macaca mulatta (Macaca)	Macaca mulatta (Macaca)				
3914389														CTACTG	13		3 Leu/Leu
3914424														AAGACG	24		2 Lys/Thr
3914430														CATTGT	25	1+2	1 Ileu/Cys
3914431														TTTTCG	26		3 Phe/Pro
3914436														ACGAAAGATG	28		2 Thr/Lys/Met
3914455														ATGATT	34		3 Ile/His
3914460														ACCATC	36		2 Thr/Ile
3914483														CAACGA	47		2 Glu/Arg
3914511														GCAGTG	63		2 Ala/Val
3914512														GTACGTGATGTGT	63-64	3+1	Val/Arg/Val/Cys
3914513														CGTACATGTGT	64		2 Arg/His/Cys
3915840														TCGTCA	64	2+3	1 Phe/Ser
3915881 G/A	G/A	G/A	T/A	T/A	T/A	T/A	G/A	G/A						TCGTCTTCA	64		3 Ser/Ser
3915887 A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G						AAG	68		3 Lys/Lys
3915873														ACTGCCAACCAC	68-69	3+1	1 Thr/Ala/Thr/Thr
3915974 G/A	G/A													GAAAGCCAC	69		1 Ala/His/Thr
3915986 A/C	A/C													AAC	73		1 Asp/Arg
3915989														ATTTCT	74		1 Ile/Ser
3915990														AAAGAA	104		2 Lys/Arg
3915992														GTCCGCC	108		2 Val/Ala
3916003														GAGT	112		1 Glu
3916008														AG-CAGAGAGCA	113-118	3сув рамки читування	1 Ser/1 Phe/Arg/Val/1 Asp/1 Arg/1 Phe/1 Ser/1 Val/1 Phe
3916015														GCATCC	118		1 Ala/Ser
3916022	A/G													AGGAGG	120		3 Glu/Glu
3916046														GACGGC	120		2 Asp/Gly
3916057														TGTCGT	130		1 Cys/Arg
3916064														CTCTCT	130		1 Phe/Leu
3916065														CTCTCT	130		3 Leu/Leu
3916083														AGGAGG	142		1 Arg/Gly
3916101														GGAGGG	144		3 Gly/Gly
3916274														ATTAGT	180		2 Ile/Thr
3916377														GACGCG	181		3 Asp/Gly
3916391														GACIAC	181		1 Asp/Asn
3916417														ATTATC	174		3 Ile/His
3916430	A/G													AAAGAG	175		1 Lys/Glu
3916430	Thr													TACGAC	175		1 Tyr/Asp
3916493														GAGCAG	200		1 Glu/Asn
3923444 CCA														CCACTGCTG	225		1 Pro/Leu/Leu
3923446														CTACTG	226		3 Leu/Leu
3923476 A/G														AGAACG	236		3 Thr/Thr
3923492														AGAACG	242		1 Arg/Arg
3923493 A/G	A/G													CAATCA	242		3 Glu/Arg
3923504														GAAGAA	240		1 Glu/Lys
3923910 G/C														GATCAT	248		1 Asp/Ile
3923917 T/A														ATCAAC	250		3 Ser/Asn
3923929														CAATGA	254		2 Glu/Gly

Фіг. 4

## Мутації в OAS1 приматів

3923986 G/TAA															GTGAAG	274	1+2	Val/Lys
3924003															GAAGAA	276		1 Glu/Lys
3924013 G/T															AGTATT	282		2 Ser/Ile
3924018															AAAGAA	284		1 Lys/Glu
3924032 G/A															AGCAGA	286		3 Ser/Arg
3924055	A/G														AGAAGG	288		3 Arg/Arg
3924042															GAGACG	292	1+2	Glu/Thr
3924043	G/C														AGGACG	292		2 Arg/Thr
3924043 G/C															AGGACG	292	2+3	Ser/Thr
3924052 A/G															GCAGCG	292	3	Ala/Ala
3924057															ATTAGG	314	2+3	Ile/Lys
3924061															TGATGG TGCTGG	314		1 Terp/Tyr Cys/Tyr
3924062															CACCAT	314		3 His/His
3924063															AAAGAA	314		1 Lys/Glu
3924073	A/G														ACTGAT	314		1 Thr/Ile
3924077															AGTACG	314		3 Ser/Ser
3924077	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A		GACIAC	314		1 Asp/Asn
3924077	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G		GAG GAAGCA	314	2+3	Glu/Glu/Ala
3924077															GAGCATGAGGAGCA	314		
3924077															GATGAC	353	2+3	Asp/Asp
3924077															TCCGAC	353		1 Ser/Thr
3924077															TACGAC	353		1 Tyr/Asp
3924077															ATGAGG	361		2 Met/Arg
3924077															CCACAG	363	2+3	Phe/Gln
3924077															CAAGAA	364		3 Glu/Lys
3924077															CAITAT	365		1 His/Tyr
3924077															ATCGAATCAGAT	365		
3924077															ATTGGA	368-369	3+1+2	1 His/1 Asn/1 Arg/1 Gly
3924077															TATCAT	374		1 Tyr/His
3924077															TGCTAC	374		2 Cys/Tyr
3924077															TCTACT	374		1 Ser/Pro
3924077															TATCAT	378		1 Tyr/His
3924077															CAACAT	378		3 Glu/His
3924077															AGCAGA	378		3 Ser/Arg
3924077															CCACAG	378		1 Phe/Thr
3924077															ATNACA	382		2 Ile/Thr
3924077															CCCAAC	386		1 Ala/Thr
3924077															ACTIAC	388		3 Thr/Thr
3924077															CCACGGACCA	399	2+3	Arg/Arg/Pro
3924077															AAAGAG	399		1 Asn/Asp
3924077															CAAGCA	381		2 Glu/Gly
3924077															ACAACCAAG	398		3 Thr/Thr/Thr
3924077															GTGCTG	384		1 Val/Leu
3924077															CCCAAC	372		3 Ala/Ala
3924077															CAGCAG	384		3 His/Gln
3924077															CTTTTC	385		1 Leu/Phe
3924077															AGGAGC	399		3 Arg/Ser

Фіг. 4

Амінокислотні положення належать до всіх ізоформ OAS1 (наприклад, до SEQ ID NO:1-4 і реєстраційним номером в Genebank NP\_002525.1 і NP\_058132.1), виключаючи випадки, коли \* відмічене положення, що належить тільки до форм, гомологічних NP\_002525.1, \* відмічене положення, що належить тільки до форм, гомологічних NP\_058132.1, і \* відмічене положення, що належить тільки до форм, гомологічних NP\_001027581.

## ДОДАТКОВІ ІЗОФОРМИ OAS1 ЗА ВИНАХОДОМ

SEQ ID NO2 (Ізоформа E18/p46 OAS1 людини з 1MT\_009775.15, хромосома 12q24.1, з кінцевими точками нуклеотидів 3914354, 3926867)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHQYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLAESNSADDETDPR
361 RYQKYGYIGTHEYPHFHRPSTLQAASTPQAEEDWTCTIL

```

SEQ ID NO:2 (Ізоформа E16/p40 OAS1 людини з NT\_009775.15, хромосома 12q24.1, з кінцевими точками нуклеотидів 3914354, 3925071)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHQYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP
361 LHEA

```

SEQ ID NO:2 (Ізоформа p48 OAS1 людини з MT\_009775.15, хромосома 12q24.1, з кінцевими точками нуклеотидів 3914354, 3927007)

```

1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHQYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLTQHTPGSIHPTGRR
361 GLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTQVS

```

Fig. 5

SEQ ID NO:5 (Гомолог изоформы E18 білка OAS1, *Gorilla gorilla*)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK  
 61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE  
 121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL  
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW  
 241 EQGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLRQKPRPVILD  
 301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLAESDSGR

SEQ ID NO:6 (Гомолог изоформы E16 білка OAS1, *Gorilla gorilla*)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK  
 61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE  
 121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL  
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW  
 241 EQGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLRQKPRPVILD  
 301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP  
 361 LHKA

SEQ ID NO:7 (Гомолог изоформы p48 білка OAS1, *Gorilla gorilla*)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK  
 61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE  
 121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL  
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYAW  
 241 EQGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLRQKPRPVILD  
 301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLTQHTPGSIHPTGRR  
 361 GLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTQVS

SEQ ID NO:8 (Гомолог изоформы E18 білка OAS1, *Pan paniscus*)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRTQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK  
 61 GGSSGKGKTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKFE  
 121 EVQAPRWONPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLIGGYKPOPIYVKLIEECTY



181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA  
 241 WERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL  
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKNXDGSPVSSWILLAESDSADDETDDEP  
 361 RRYQKYGYIGTHEYPHFSHRPSTLQAASAPQAEEDWTCTIL

**SEQ ID NO:9 (Гомолог изоформы E16 білка OAS1, *Pan paniscus*)**

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRTQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK  
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF  
 121 EVQAPRWDNPRALSFLVSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKDPQIYVKLIEECTY  
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA  
 241 WERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL  
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKNXDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPA  
 361 PLHEA

**SEQ ID NO:10 (Гомолог изоформы p48 білка OAS1, *Pan paniscus*)**

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRKQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK  
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF  
 121 EVQAPRWDNPRALSFLVSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKDPQIYVKLIEECTY  
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA  
 241 WERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL  
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKNXDGSPVSSWILLTQHTPGSIRPTGR  
 361 RGLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTOVS

**SEQ ID NO:11 (Гомолог OAS1, *Pan troglodytes verus*)**

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCFQGSSYPVHVSKVVK  
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQREERAFSVKF  
 121 EVQAPRWDNPRALSFLVSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTDGYKDPQIYVKLIEECTY  
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLQRPPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA  
 241 WEQGSMTDFNTAQEFRTVLELVINYQQLCIYWTYYDFENPIIEKYLRRLTKPRPVIL  
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKN

## SEQ ID NO:12 (Гомолог OAS1, Pan troglodytes)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCFQGSSYPVHVSKVVK  
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREERAFVVKF  
 121 EVQAPRWDPNPRALSFLVSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTDGYKPDQIYVKLIEECTY  
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYA  
 241 WEQGSMTDFNTAQEFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIEKYLRRLTKPRPVIL  
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKFN

## SEQ ID NO:13 (Коротка ізоформа OAS1, Pongo pygmaeus abelii)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPARVSKVVK  
 61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQRESIFREV

## SEQ ID NO:14 (Гомолог ізоформи E18 білка OAS1, Pongo pygmaeus abelii)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK  
 61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE  
 121 VQAPRWDPNPRALSFLVSSFLXEGVEFDVLPAPDALGQLTGGYKPDQIYVKLIEECTDL  
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW  
 241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIKYLSRQLRKPRPVILD  
 301 PADPTGNLGGGDPGWRQLAQEAELNYPCKFNWDGSPVSSWILLAESDSEDDDETYPDR  
 361 MYXKYGYIRTHEYSHFSHPSTLQAASTPQAEENWTCTIL

## SEQ ID NO:15 (Гомолог ізоформи E16 білка OAS1, Pongo pygmaeus abelii)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK  
 61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE  
 121 VQAPRWDPNPRALSFLVSSFLXEGVEFDVLPAPDALGQLTGGYKPDQIYVKLIEECTDL  
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW  
 241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIKYLSRQLRKPRPVILD  
 301 PADPTGNLGGGDPGWRQLAQEAELNYPCKFNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP  
 361 LHEA

## SEQ ID NO:16 (Гомолог ізоформи p48 білка OAS1, Pongo pygmaeus abelii)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK

61 GGSSGKG TALGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEI R K Q L E A C Q R E X X F X X X X E  
 121 VQAPRWDNPRALS FVLSS FQLXEGVEFDVLPAPDALGQLTGGYKPD PQIYV K L I E E C T D L  
 181 QKEGEFSTCFTELQ R D F L K Q R P T K L K S L I R L V K H W Y Q N C K K L G K L P P Q Y A L E L L T V Y A W  
 241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPI I K K Y L S R Q L K K P R P V I L D  
 301 PADPTGNLGGGDP I G W R Q L A Q E A E A W L N Y P C F K N W D G S P V S S W I L L P Q H T P G S I H P T G R R  
 361 ELDVHNHPLNASASWGKGLQCYLDHLLHFQVGLLIQ R G Q R S S V S W C I I Q D R T Q V S

У приведених вище послідовностях X вказує на модифіковану амінокислоту, що відображено в нижченаведеній таблиці.

Послідовність	Положення амінокислоти	Змінені амінокислоти
SEQ ID NO:8	336	Wабо C
SEQ ID NO:9	336	Wабо C
SEQ ID NO:10	336	Wабо C
SEQ ID NO:12	117	Sабо A
SEQ ID NO:14	113	Sабо R
SEQ ID NO:15	113	Sабо R
SEQ ID NO:16	113	Sабо R
SEQ ID NO:14	114	Iабо A
SEQ ID NO:15	114	Iабо A
SEQ ID NO:16	114	Iабо A
SEQ ID NO:14	116	Rабо S
SEQ ID NO:15	116	Rабо S
SEQ ID NO:16	116	Rабо S
SEQ ID NO:14	117	Eабо V
SEQ ID NO:15	117	Eабо V
SEQ ID NO:16	117	Eабо V
SEQ ID NO:14	118	Vабо K
SEQ ID NO:15	118	Vабо K
SEQ ID NO:16	118	Vабо K
SEQ ID NO:14	119	Термінатор або F
SEQ ID NO:15	119	Термінатор або F
SEQ ID NO:16	119	Термінатор або F
SEQ ID NO:14	142	Rабо G
SEQ ID NO:15	142	Rабо G
SEQ ID NO:16	142	Rабо G
SEQ ID NO:14	363	Rабо Q