



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 123432

(13) C2

(51) МПК

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

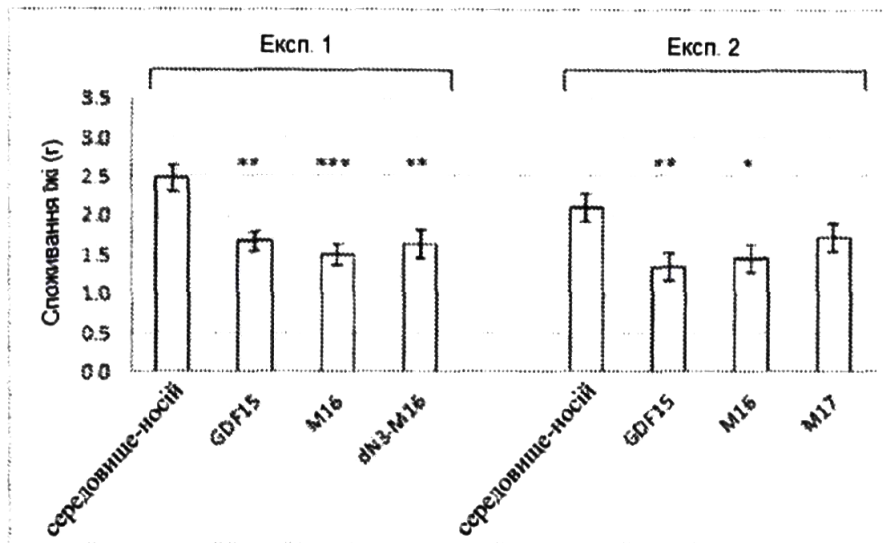
(21) Номер заявки: а 2017 00670	(72) Винахідник(и): Ліндхаут Даррін Ентоні (US), Халданкар Радж (US), Тянь Хой (US), Хсу Джер-Юань (US)
(22) Дата подання заявки: 28.07.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 08.04.2021	
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/031,063, 62/195,908	(73) Володілець (володільці): НДЖМ БІОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК., 333 Oyster Point Boulevard, South San Francisco, CA 94080, United States of America (US)
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.07.2014, 23.07.2015	(74) Представник: Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013113008 A1, 01.08.2013 Enhancing the Secretion of Recombinant Proteins by Engineering N-Glycosylation Sites / Yan Liu, Anton Nguyen, Robert L. Wolfert // Biotechnology progress. - 2009. - Vol. 25, No. 5. - P. 1468-1475 WO 2013148117 A1, 03.10.2013
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.07.2017, Бюл.№ 13	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 07.04.2021, Бюл.№ 14	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2015/042510, 28.07.2015	

(54) ДИМЕР ТА СПОСІБ ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ РОЗЛАДІВ**(57) Реферат:**

Винахід стосується димеру, який містить два поліпептиди, ковалентно приєднані один до одного. Також винахід стосується N-глікозильованого димеру, фармацевтичної композиції, молекули нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-хазіяна, способу одержання димеру, способу лікування ожиріння в суб'єкта-ссавця та способу лікування гіперглікемії у суб'єкта-ссавця, що містить вказаний димер.

UA 123432 C2

Модель DIO мишей



Фіг. 10

Включення списку послідовностей у вигляді текстового файлу за допомогою посилання

У даній заявці представлений список послідовностей у вигляді текстового файлу "NGMB-139WO_SeqList.txt" розміром 133 кб, створений 22 липня 2015 року. Вміст зазначеного текстового файлу повністю включений в даний документ за допомогою посилання.

5 ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА РОДИННІ ЗАЯВКИ

Дана заявка претендує на пріоритет відповідно до попередньої заявки США № 62/031063, що подана 30 липня 2014р., і попередньої заявки США № 62/195908, що подана 23 липня 2015 р., які повністю включені в дану заявку за допомогою посилань.

Область винаходу

10 Даний винахід відноситься, у числі іншого, до поліпептидів та їх композицій, які можна застосовувати для лікування станів, пов'язаних з метаболізмом.

Введення

15 Причиною ожиріння найчастіше є надмірне споживання їжі в сполученні з обмеженою витратою енергії та/або відсутністю фізичних вправ. Ожиріння збільшує ймовірність розвитку різних захворювань, наприклад, цукрового діабету, гіпертензії, атеросклерозу, захворювання коронарних артерій, синдрому апное у сні, подагри, ревматизму й артриту. Крім того, ризик смертності прямо корелює з ожирінням, так що, наприклад, індекс маси тіла більше 40 призводить до середнього зниження очікуваної тривалості життя більше ніж на 10 років.

20 Сучасні способи фармацевтичного лікування включають пригнічувачі апетиту, що чинять адресний вплив на рецептори певних класів (наприклад, CB1, 5-HT_{2C} і NPY); регулятори ланцюгів апетиту в гіпоталамусі та молекулярній дії греліну; та інгібітори поглинання живильних речовин, які чинять адресний вплив на ліпазу. На жаль, жоден із існуючих способів не забезпечує ефективне лікування ожиріння, не викликаючи несприятливих ефектів, деякі з яких можуть бути дуже серйозними.

25 Високий рівень глюкози в крові стимулює секрецію інсуліну бета-клітинами підшлункової залози. Інсулін, у свою чергу, стимулює проникнення глюкози в м'язи та жирові клітини, що призводить до накопичення глікогену і тригліцеридів, і синтезу білків. Активація рецепторів інсуліну на клітинах різних типів знижує рівень глюкози в кровотоці за рахунок збільшення поглинання й утилізації глюкози, а також зниження утворення глюкози у печінці. Роз'єднання в цій регуляторній мережі може призвести до діабету та пов'язаних з ним патологічним синдромам, які спостерігаються в значної та зростаючої частини населення.

30 Пацієнти з розладами метаболізму глюкози можуть страждати від гіперглікемії, гіперінсулінемії та/або непереносимості глюкози. Прикладом розладу, який часто асоціюється з патологічним рівнем глюкози й/або інсуліну є інсулінрезистентність, при якій клітини печінки, жирові та м'язові клітини втрачають здатність реагувати на рівень інсуліну в крові.

35 З урахуванням поширеності та тяжкості ожиріння, діабету та пов'язаних з ними метаболічних і неметаболічних розладів, зберігається інтерес до способів лікування, які модулюють, наприклад, апетит, рівні глюкози й/або інсуліну і підсилюють біологічну реакцію на коливання рівня глюкози у пацієнта.

40 GDF15 дикого типу, також відомий як MIC-1 (інгібіторний цитокін макрофагів-1), пов'язаний з регуляцією маси тіла (Tsai VW, et al., PLoS One 2013; 8 (2): e55174; US8,192,735).

ЗВЕДЕНА ІНФОРМАЦІЯ

45 Запропоновані поліпептиди з безперервною амінокислотною послідовністю, щонайменше на 90 % ідентичною амінокислотній послідовності зрілого GDF15 дикого типу людини (SEQ ID NO: 1). Поліпептиди відповідно до даного винаходу включають мутеїни GDF15, модифікований GDF15 і модифіковані мутеїни GDF15. Крім того, запропоновані композиції цих поліпептидів. У даному винаході передбачене застосування поліпептидів, описаних у даному документі, а також їхніх композицій, для лікування або профілактики розладів, пов'язаних з масою тіла, і/або порушень метаболізму глюкози.

50 Як відзначено вище, запропонований поліпептид, який містить безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 90 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1. Безперервна амінокислотна послідовність містить щонайменше одну з наступних пар замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: i) D5T/S і R21N; ii) R16N і H18T/S; iii) S23N і E25T/S; iv) L24N і D26T/S; v) S50N і F52T/S або F52N і A54T/S; vi) Q51N і R53T/S або R53N і A55T/S; vii) S64N і H66T/S; viii) L65N і R67T/S; ix) S82N і N84T/S; x) K91N і D93T/S або D93N і G95T/S; xi) T94N і V96T/S або V96N і L98T/S; xii) S97N і Q99T/S; i xiii) A106N і D108T/S.

60 Наприклад, безперервна амінокислотна послідовність може містити щонайменше одну з наступних пар замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: i) D5T і R21N або D5S і R21N; ii) R16N і H18T або R16N і H18S; iii) S23N і E25T або S23N і E25S; iv) L24N і D26T або L24N і D26S; v) S50N і F52T; S50N і F52S; F52N і A54T; або F52N і A54S; vi) Q51N і R53T;

Q51N і R53S; R53N і A55T; або R53N і A55S; vi) S64N і H66T або S64N і H66S; vii) L65N і R67T або L65N і R67S; viii) S82N і N84T або S82N і N84S; ix) K91N і D93T; K91N і D93S; D93N і G95T; або D93N і G95S; x) T94N і V96T; T94N і V96S; V96N і L98T; або V96N і L98S; xi) S97N і Q99T або S97N і Q99S; xii) A106N і D108T або A106N і D108S.

5 У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити щонайменше одну з наступних пар замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: D5T і R21N; S23N і E25T/S; R53N і A55T/S; S64N і H66T/S; K91N і D93T/S; D93N і G95T/S; S97N і Q99T/S; і A106N і D108T/S.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити щонайменше одну з наступних пар замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: D5T і R21N; D5S і R21N; S23N і E25T; S23N і E25S; R53N і A55T; R53N і A55S; S64N і H66T; S64N і H66S; K91N і D93T; K91N і D93S; D93N і G95T; D93N і G95S; S97N і Q99T; S97N і Q99S; A106N і D108T; і A106N і D108S.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити щонайменше одну з наступних пар замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: D5T і R21N; S64N і H66T/S; K91N і D93T/S; D93N і G95T/S; і S97N і Q99T/S.

15 В інших варіантах реалізації поліпептид може містити щонайменше одну з наступних пар замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: K91N і D93T або K91N і D93S; і D93N і G95T або D93N і G95S. В інших варіантах реалізації поліпептид може містити наступну пару замінів відповідних амінокислот у послідовності SEQ ID NO: 1: K91N і D93T.

У типових варіантах реалізації безперервна амінокислотна послідовність може бути щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1.

В інших варіантах реалізації довжина безперервної амінокислотної послідовності може становити щонайменше 98 амінокислот, і зазначена послідовність може бути щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому С-кінцева амінокислота поліпептиду відповідає ізолейцину у положенні 112 SEQ ID NO: 1.

25 В інших варіантах реалізації довжина безперервної амінокислотної послідовності може становити щонайменше 98 амінокислот, і зазначена послідовність може бути щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому С-кінцева амінокислота поліпептиду відповідає ізолейцину у положенні 112 SEQ ID NO: 1.

Типові поліпептиди, описані у даному документі, містять безперервну амінокислотну послідовність, довжина якої становить щонайменше 98 амінокислот, і яка щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 і містить делецію амінокислот у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Наприклад, поліпептиди можуть бути вкорочені за N-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Поліпептид може бути вкорочений на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або більше амінокислот у порівнянні з SEQ ID NO: 1, наприклад, на 1-14 амінокислот, на 3-14 амінокислот, на 6-14 амінокислот або на 3-6 амінокислот.

У деяких випадках безперервна амінокислотна послідовність, довжина якої становить щонайменше 98 амінокислот, щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 і не містить перші три амінокислоти, що відповідають першим трьом амінокислотам, які є присутніми на N-кінці SEQ ID NO: 1, причому С-кінцева амінокислота відповідає ізолейцину у положенні 112 SEQ ID NO: 1.

У деяких випадках довжина безперервної амінокислотної послідовності становить щонайменше 98 амінокислот, зазначена послідовність щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 і не містить перші шість амінокислот, що відповідають першим шести амінокислотам, що є присутніми на N-кінці SEQ ID NO: 1, причому С-кінцева амінокислота відповідає ізолейцину у положенні 112 SEQ ID NO: 1.

45 У деяких випадках довжина безперервної амінокислотної послідовності становить щонайменше 98 амінокислот, зазначена послідовність щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 і не містить перші чотирнадцять амінокислот, які відповідають першим чотирнадцять амінокислотам, що є присутніми на N-кінці SEQ ID NO: 1, причому С-кінцева амінокислота відповідає ізолейцину у положенні 112 SEQ ID NO: 1.

У деяких випадках поліпептид може містити сигнальну послідовність на N-кінці, наприклад, сигнальну послідовність IgK. Сигнальну послідовність можна кон'югувати з поліпептидом за допомогою лінкеру, причому зазначений лінкер може бути відщеплювальним лінкером.

Крім того, у даному документі запропонований гібридний білок, який містить від N-кінця до С-кінця: гетерологічний поліпептид [(G₄S)]₅-GDF15; гетерологічний поліпептид [(G₄S)]₅-ΔN3-GDF15; або гетерологічний поліпептид [(G₄S)]₅-ΔN6-GDF15.

У типових варіантах реалізації гетерологічний поліпептид може бути сироватковим альбуміном, білком, що зв'язує мальтозу, або імуноглобуліновим Fc-поліпептидом. Сироватковий альбумін може являти собою сироватковий альбумін людини, сироватковий альбумін яванської макаки або бичачий сироватковий альбумін. Гібридний білок може містити

сигнальну послідовність на N-кінці. Сигнальна послідовність може являти собою сигнальну послідовність IgK.

Крім того, у даному документі запропонована молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує вищеописані поліпептиди або гібридні білки. Молекула нуклеїнової кислоти може бути функціонально зв'язана з елементом, контролюючим експресію, що забезпечує експресію молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує поліпептид або гібридний білок, *in vitro* або *in vivo*. Крім того, розглядається вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти. Вектор може бути вірусним вектором.

Деякі варіанти реалізації включають трансформовані клітини або клітини-хазяїни, експресуючі один або більше з вищезгаданих поліпептидів.

У конкретних варіантах реалізації даного винаходу один або більше з вищезгаданих поліпептидів призначений для одержання фармацевтичної композиції, причому зазначена композиція також містить один або більше з фармацевтично прийнятних розріджувачів, носіїв або допоміжних речовин. У деяких варіантах реалізації фармацевтична композиція також містить щонайменше один додатковий профілактичний або терапевтичний агент.

Подальші варіанти реалізації даного винаходу містять антитіло, що специфічно зв'язується з одним із вищезгаданих мутейнових поліпептидів. У деяких варіантах реалізації антитіло містить варіабельну область легкого ланцюга та варіабельну область важкого ланцюга в складі окремих поліпептидів або одного поліпептиду. Антитіло відповідно до даного винаходу зв'язує поліпептид із спорідненістю від приблизно 10^7 M⁻¹ до приблизно 10^{12} M⁻¹ у деяких варіантах реалізації. В інших варіантах реалізації антитіло містить константну область важкого ланцюга ізотипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. У додаткових варіантах реалізації антитіло мічене виявляємою міткою, причому антитіло являє собою Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ або Fab' в інших варіантах реалізації.

У даному винаході також розглядаються антитіла, що містять ковалентно зв'язаний неполіпептидний полімер (наприклад, полімер полі(етилєнглїколю)). В інших варіантах реалізації антитіло містить ковалентно зв'язану групу, вибрану з ліпідної групи, залишку жирної кислоти, полісахаридної групи та вуглеводної групи.

У деяких варіантах реалізації антитіло являє собою одноланцюгове Fv (scFv) антитіло, а в інших scFv представлене у формі мультимеру.

Антитіла відповідно до даного винаходу можуть являти собою моноклональні антитіла, поліклональні антитіла або гуманізовані антитіла, але не обмежуються ними.

Крім того, у даному винаході розглядаються фармацевтичні композиції, що містять антитіло, описане вище, у складі з щонайменше однією фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною, носієм або розріджувачем. Такі фармацевтичні композиції також можуть містити щонайменше один додатковий профілактичний або терапевтичний агент.

Деякі варіанти реалізації даного винаходу передбачають стерильний контейнер, який містить одну із зазначених вище фармацевтичних композицій та опціонально один або декілька додаткових компонентів. Як необмежувачий приклад, стерильний контейнер може являти собою шприц. У подальших варіантах реалізації стерильний контейнер є одним із компонентів набору; набір також може містити, наприклад, другий стерильний контейнер, який містить щонайменше один профілактичний або терапевтичний агент.

Крім того, у даному документі описаний спосіб виготовлення вищезгаданих поліпептидів або гібридних білків. Зазначений спосіб може включати культивування клітини-хазяїна, експресуючої поліпептид або гібридний білок; і очищення експресованого поліпептиду або гібридного білка.

У даному винаході також розглядається спосіб лікування або профілактики розладу метаболізму глюкози в суб'єкта (наприклад, людини) шляхом введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості вищезгаданого поліпептиду або гібридного білка. У деяких способах лікування або профілактики призводить до зниження рівня глюкози у плазмі суб'єкта, зниження рівня інсуліну в плазмі суб'єкта, зниження маси тіла та/або споживання їжі або підвищення переносимості глюкози в суб'єкта. У конкретних варіантах реалізації зазначений розлад метаболізму являє собою цукровий діабет.

Крім того, описаний спосіб лікування або профілактики розладу маси тіла в суб'єкта. Спосіб може включати введення суб'єкту поліпептиду або гібридного білка відповідно до даного винаходу, причому зазначений поліпептид або гібридний білок вводять у кількості, ефективній для лікування або профілактики розладу маси тіла в суб'єкта. У деяких способах лікування або профілактики призводить до зниження маси тіла та/або споживання їжі в суб'єкта.

У деяких варіантах реалізації суб'єкт страждає ожирінням і/або розладом маси тіла.

Хоча даний винахід не обмежується яким-небудь конкретним шляхом введення або схемою прийому, у деяких варіантах реалізації введення здійснюють шляхом парентеральної (наприклад, підшкірної) ін'єкції.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

5 На фігурі 1 показане вирівнювання амінокислотної послідовності мутеїнів GDF15, описаної у даному документі, з амінокислотою послідовністю зрілого GDF15 дикого типу (дт) людини.

На фігурі 2 показане вирівнювання амінокислотної послідовності мутеїнів Δ N3-GDF15, описаної у даному документі, з амінокислотою послідовністю зрілого GDF15 дт людини. Мутеїни Δ N3-hGDF15 не містять 3 амінокислоти (ARN), присутніх на N-кінці зрілого hGDF15.

10 На фігурі 3 зображені два гібридних білки (конструкти M1 і M2), що містять від N-кінця до C-кінця: сигнальну послідовність IgK (нижній регістр) (IgK) - амінокислотну послідовність (D25-L609) людського сироваткового альбуміну (ЛСА) - невідщеплюваний (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ лінкер [(G₄S)]₃ (підкреслений шрифт) - амінокислотну послідовність зрілого GDF15 людини (hGDF15) (напівжирний шрифт). Конструкт M1 (IgK-ЛСА-[(G₄S)]₃-hGDF15) містить повнорозмірний зрілий hGDF15, у той час як конструкт M2 (IgK-ЛСА-[(G₄S)]₃- Δ N3-hGDF15) містить Δ N3-hGDF15, в якому перші 3 амінокислоти (ARN), що відповідають N-кінцевим амінокислотам зрілого hGDF15, делетовані.

На фігурі 4 зображений невідновлений, пофарбований кумасси ДСН-ПААГ-гель експресії конструктів M1 M2 із середовища стабільної лінії клітин CHOK1SV GSKO. Зірочками (*) позначені вкорочені варіанти, що зустрічаються в M1 при секреції з CHOK1SV. PX/MC-ідентифікація сайтів вкорочування призводить до розробки конструкта з підвищеною стабільністю (M2), вкороченого на 3 амінокислоти (Δ ARN або Δ N□) на N-кінці зрілого hGDF15.

На фігурі 5 зображені дві гібридні молекули з амінокислотою послідовністю людського сироваткового альбуміну (D25-L609) з сигнальною послідовністю IgK (нижній регістр), приєднаною до N-кінця амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт) за допомогою невідщеплюваного [(G₄S)]₅ лінкера (підкреслений шрифт). Конструкт M3 (IgK-ЛСА-[(G₄S)]₅- Δ N3-hGDF15) вкорочений на 3 амінокислоти (Δ ARN) з N-кінця зрілого hGDF15; у той час як конструкт M4 (IgK-ЛСА-[(G₄S)]₅- Δ N6-hGDF15) вкорочений на 6 амінокислот (Δ ARNGDH) у порівнянні з N-кінцем зрілого hGDF15.

30 На фігурі 6 показаний вплив на споживання їжі в мишей з аліментарним ожирінням (DIO) після однократного гострого підшкірного введення середовища-носія, гібридних молекул M1, M3 і M4 (40 нмоль/кг). Як відзначено на фігурі, параметри споживання їжі визначали через 24 години після введення та через 7 днів після введення. У кожній групі мишей (n=8) значення p (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001) визначали за допомогою Т-критерію для незалежних вибірок при порівнянні груп, що одержували різні дози, з контрольною групою, яка одержувала носій, у кожний зазначений момент часу.

На фігурі 7 показаний вплив на масу тіла DIO мишей після однократного гострого підшкірного введення середовища-носія, гібридних молекул M1, M3 і M4 (40 нмоль/кг). Як зазначено на фігурі, параметри маси тіла визначали через 24 години після введення та через 7 днів після введення у порівнянні зі значеннями маси в групі до введення. У кожній групі мишей (n=8) значення p (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001) визначали за допомогою Т-критерію для незалежних вибірок при порівнянні груп, які одержували різні дози, з контрольною групою, яка одержувала носій, у кожний зазначений момент часу.

На фігурі 8А показані амінокислотні послідовності моноглікозильованих і диглікозильованих мутеїнів, отриманих шляхом впровадження консенсусних сайтів N-зв'язаного глікозильовання (M5-M21). Ці послідовності містять сигнальну послідовність IgK (нижній регістр), об'єднану з N-кінцем амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт). На фігурі 8В показані нуклеотидні послідовності, що кодують амінокислотні послідовності, зображені на фігурі 8А. На фігурі 8С показані амінокислотні послідовності Δ N3-M16 і нуклеотидні послідовності, що кодують Δ N3-M16. На фігурі 8D показана амінокислотна послідовність зрілого GDF15 дт людини, яка містить сигнальну послідовність IgK (IgK-дт-GDF15), і нуклеотидна послідовність, що кодує IgK-дт-GDF15.

На фігурі 9 представлена зведена інформація про секрецію й утворення димера поряд із поліпшеннями відносної розчинності для кожного сконструйованого N-глікозильованого мутеїну GDF15 людини, наведеного на фігурі 8А, і для Δ N3-M16.

На фігурі 10 показаний вплив на споживання їжі в мишей з аліментарним ожирінням (DIO) після однократного гострого підшкірного введення середовища-носія (PBS), поліпептидів GDF15, M16, Δ N3-M16 і M17 (1 мг/кг (40 нмоль/кг)).

На фігурі 11 показаний вплив на масу тіла в DIO-мишей після однократного гострого підшкірного введення середовища-носія (PBS), поліпептидів GDF15, M16, Δ N3-M16 і M17

(1 мг/кг (40 нмоль/кг)).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Перед подальшим описом способів і композицій відповідно до даного винаходу варто розуміти, що даний винахід не обмежується конкретними варіантами реалізації, описаними у даному документі, а також варто розуміти, що термінологія, використовувана у даному документі, наведена винятково з метою опису конкретних варіантів реалізації та не призначена для обмеження.

Якщо представлений діапазон величин, варто розуміти, що кожне проміжне значення, до десятої частини одиниці нижньої межі діапазону, якщо з контексту явно не слідує інше, між верхньою та нижньою межею цього інтервалу, і будь-яке інше задане або проміжне значення в цьому заданому інтервалі, перебувають у рамках винаходу. Верхня та нижня межі цих менших інтервалів можуть незалежно бути включені в менші інтервали і також перебувають у рамках винаходу, крім будь-якої спеціально виключеної межі в заданому інтервалі. Якщо заданий інтервал включає один або обидві межі, то інтервали без однієї або обох меж також включені у винахід. Якщо не зазначено інше, всі технічні та наукові терміни, використовувані у даному документі, мають ті самі значення, що зазвичай розуміє фахівець в даній області техніки, до якої відноситься даний винахід.

Слід зазначити, що при використанні у даному документі та прикладеній формулі винаходу форми однини включають посилання на множину, якщо з контексту очевидно не слідує інше. Так, наприклад, згадування "мутантного поліпептиду" включає згадування одного або більше мутантних поліпептидів і так далі. Додатково слід зазначити, що може бути складений план формули винаходу, щоб виключити будь-який необов'язковий елемент. У зв'язку з цим передбачається, що дане твердження служить як попередня основа для таких термінів, що виключають, як "винятково", "тільки" і тому подібних у зв'язку з перерахуванням елементів формули винаходу, або для використання "негативних" обмежень.

Публікації, обговорювані в даній заявці, наведені винятково для їх опису до дати подання даної заявки. Ніяку інформацію в даній заявці не слід тлумачити як визнання того, що даний винахід не має права датувати подібну публікацію більш раннім числом у силу дії попереднього винаходу. Більше того, дані представлених публікацій можуть відрізнятися від фактично опублікованих даних, що може потребувати незалежного підтвердження.

Визначення

Терміни "пацієнт" або "суб'єкт" використовуються взаємозамінно для позначення людини або тварини, що не є людиною (наприклад, ссавця).

Терміни "лікувати", "лікування" і тому подібне відносяться до порядку дій (наприклад, введенню агента, наприклад, поліпептиду або фармацевтичної композиції, що містить поліпептид), які починаються після діагностики, виявлення та тому подібне. Захворювання, розлади або стани, або їхні симптоми з метою усунення, зниження, придушення або полегшення, тимчасового або постійного, щонайменше однієї з основних причин захворювання, розлади або стани, від якого страждає суб'єкт, або щонайменше одного з симптомів асоційованих із захворюванням, розладом або станом, від якого страждає суб'єкт. Таким чином, лікування включає придушення (тобто припинення розвитку або подальшого розвитку захворювання, розладу або стану, або клінічні симптоми, асоційовані з ними) активного захворювання (наприклад, з метою зниження рівня інсуліну та/або глюкози в кровотоці, підвищення переносимості глюкози з метою мінімізації коливань рівня глюкози та/або захисту від захворювань, викликаних роз'єднанням гомеостазу глюкози).

Термін "потребуючий лікування", використовуваний у даному контексті, відноситься до рішення, зробленого лікарем або іншою особою, доглядаючою за пацієнтом, про те, що пацієнт має необхідність у лікуванні або таке лікування піде йому на користь. Це рішення приймається на основі цілого ряду факторів, які перебувають у сфері компетенції лікаря або особи, яка доглядає за пацієнтом.

Терміни "запобігати", "запобігання", "профілактика" і тому подібне відносяться до порядку дій (наприклад, введення агента, наприклад, поліпептиду або фармацевтичної композиції, що містить поліпептид), які починаються в такий спосіб (наприклад, до проявлення захворювання, розладу або стану або їх симптому) з метою запобігання, пригнічення, інгібування або зниження, тимчасового або постійного, ризику розвитку захворювання, розладу або стану і тому подібне (наприклад, на підставі відсутності клінічних симптомів) у суб'єкта або затримки їх прояву, головним чином у суб'єкта, схильного до конкретного захворювання, розладу або стану. У деяких випадках терміни також відносяться до вповільнення прогресування захворювання, розладу або стану, або інгібування його прогресування до шкідливого або іншим способом небажаного стану.

Термін "потребує запобігання", використовуваний у даному контексті, відноситься до рішення, зробленого лікарем або іншою особою, яка доглядає за пацієнтом, про те, що пацієнт має необхідність у профілактичному догляді або такий профілактичний догляд піде йому на користь. Цей висновок роблять на підставі ряду факторів, що входять у компетенцію лікаря або особи, яка здійснює догляд.

Фраза "терапевтично ефективна кількість" відноситься до введення агента суб'єкту окремо або в складі фармацевтичної композиції, однократно або в рамках серії доз, у кількості, здатній вчинити виявлений позитивний вплив на який-небудь симптом, аспект або характеристики захворювання, розлади або стани при введенні пацієнту. Терапевтично ефективну кількість можна встановити шляхом вимірювання відповідних фізіологічних ефектів. Наприклад, у випадку гіперглікемічного стану зниження або зменшення рівня глюкози в крові або поліпшення тесту переносимості глюкози можна використовувати для визначення ефективності лікування гіперглікемічного стану за рахунок зазначеної кількості агента. Наприклад, терапевтично ефективна кількість являє собою кількість, достатню для зниження або зменшення рівня (наприклад, вихідного рівня) глюкози у плазмі натще (FPG), причому, наприклад, зазначеної кількості досить для зниження рівня FPG з більше 200 мг/дл до менше 200 мг/дл, причому зазначеної кількості досить для зниження рівня FPG з 175-200 мг/дл до рівня менше вихідного, причому зазначеної кількості досить для зниження рівня FPG з 150-175 мг/дл до рівня менше вихідного, причому зазначеної кількості досить для зниження рівня FPG з 125-150 мг/дл до рівня менше вихідного і так далі. (наприклад, зниження рівня до менше 125 мг/дл, менше 120 мг/дл, менше 115 мг/дл, менше 110 мг/дл і так далі). У випадку рівня HbA1c ефективна кількість являє собою кількість, достатню для зниження або зменшення рівня більше ніж на приблизно 10-9 %, більше ніж на приблизно 9-8 %, більше ніж на приблизно 8-7 %, більше ніж на приблизно 7-6 %, більше ніж на приблизно 6-5 % і так далі. Зокрема, зниження або зменшення рівня HbA1c на приблизно 0,1 %, 0,25 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 33 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % або більше розглядається у даному винаході. Терапевтично ефективну кількість можна скорегувати залежно від схеми введення, діагностичного аналізу стану суб'єкта і тому подібного.

Фраза "у кількості, достатній, щоб викликати зміну" означає, що існує детектована різниця між рівнем показника, виміряного перед (наприклад, базовий рівень) і після введення певної терапії. Показники включають будь-який об'єктивний (наприклад, рівень глюкози або інсуліну або споживання їжі) або суб'єктивний параметр (наприклад, гарне самопочуття або апетит суб'єкта).

Фраза "переносимість глюкози" у даному документі відноситься до здатності суб'єкта контролювати рівень глюкози у плазмі й/або інсуліну в плазмі при коливаннях споживання глюкози. Наприклад, переносимість глюкози охоплює здатність суб'єкта знижувати рівень глюкози у плазмі до рівня, визначеного до споживання глюкози, протягом приблизно 120 хвилин.

Терміни "діабет" і "діабетичний" відносяться до прогресуючого захворювання, пов'язаного з метаболізмом вуглеводів, яке включає недостатнє продукування або утилізацію інсуліну, що часто характеризується гіперглікемією та глюкозурією. Терміни "предіабет" і "предіабетичний" відносяться до стану, при якому в суб'єкта немає характерних ознак, симптомів і тому подібне, що зазвичай спостерігаються при діабеті, але є характерні ознаки, симптоми і тому подібне, які при відсутності лікування можуть прогресувати до діабету. Наявність цих станів можна визначити за допомогою, наприклад, аналізу глюкози у плазмі натще (FPG) або тесту на пероральну переносимість глюкози (OGTT). Обидва ці аналізи вимагають, щоб суб'єкт не приймав їжу протягом щонайменше 8 годин до початку аналізу. При аналізі FPG рівень глюкози в крові суб'єкта вимірюють після голодування; як правило, суб'єкт не приймає їжу протягом ночі, а глюкозу в крові вимірюють ранком, перше ніж суб'єкт поїсть. У здорового суб'єкта, як правило, концентрація FPG становить від приблизно 90 до приблизно 100 мг/дл, у суб'єкта з "преддіабетом", як правило, концентрація FPG становить від приблизно 100 до приблизно 125 мг/дл, і в суб'єкта з "діабетом", як правило, рівень FPG перевищує приблизно 126 мг/дл. При OGTT глюкозу в крові суб'єкта вимірюють після голодування та повторно через дві години після прийому напою, збагаченого глюкозою. Через дві години після прийому напою, збагаченого глюкозою, концентрація глюкози в крові здорового суб'єкта, як правило, становить менше приблизно 140 мг/дл, концентрація глюкози в крові суб'єкта з преддіабетом, як правило, становить від приблизно 140 до приблизно 199 мг/дл, а концентрація глюкози в крові суб'єкта з діабетом, як правило, становить приблизно 200 мг/дл або більше. У той час як вищезгадані значення глікемії відносяться до суб'єктів-людей, у суб'єктів-мишей нормоглікемію, помірну гіперглікемію та виражену гіперглікемію визначають по-іншому. У здорового суб'єкта-миші після

чотиригодинного голодування, як правило, концентрація FPG становить від приблизно 100 до приблизно 150 мг/дл, у суб'єкта-миші з "преддіабетом", як правило, концентрація FPG становить від приблизно 175 до приблизно 250 мг/дл, і в суб'єкта-миші з "діабетом", як правило, концентрація FPG перевищує приблизно 250 мг/дл.

5 Термін "інсулінрезистентність" у даному документі відноситься до стану, коли нормальна кількість інсуліну не може призвести до нормальної фізіологічної або молекулярної реакції. У деяких випадках гіперфізіологічна кількість інсуліну, продукована ендogenous або введена ззовні, може повністю або частково перебороти інсулінрезистентність та призвести до біологічної реакції.

10 Термін "метаболічний синдром" відноситься до взаємозалежної групи ознак, яка включає гіперінсулінемію, патологічну переносимість глюкози, ожиріння, перерозподіл жиру в черевній порожнині або верхній частині тіла, гіпертензію, дисфібриноліз і дисліпідемію, що характеризується високим рівнем тригліцеридів, низьким рівнем холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) та високим рівнем частинок ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), але не обмежується ними. Суб'єкти з метаболічним синдромом піддаються ризику розвитку діабету 2 типу та/або інших розладів (наприклад, атеросклерозу).

Фраза "розлад метаболізму глюкози" охоплює будь-який розлад, що характеризується клінічним симптомом або комбінацією клінічних симптомів, пов'язаних з підвищеним рівнем глюкози та/або підвищеним рівнем інсуліну в суб'єкта у порівнянні зі здоровим індивідом. Підвищений рівень глюкози й/або інсуліну може проявлятися при наступних захворюваннях, розладах і станах, у числі іншого: гіперглікемії, цукровому діабеті II типу, гестаційному діабеті, цукровому діабеті I типу, інсулінрезистентності, порушенні переносимості глюкози, гіперінсулінемії, порушенні метаболізму глюкози, преддіабеті, інших метаболічних розладах (наприклад, метаболічному синдромі, що також називають синдромом X) й ожирінні. Поліпептиди відповідно до даного винаходу та їх композиції можна застосовувати, наприклад, для досягнення та/або підтримки гомеостазу глюкози, наприклад, для зниження рівня глюкози в кровотоці та/або зниження рівня інсуліну до діапазону, характерного для здорового суб'єкта.

Термін "гіперглікемія" у даному документі відноситься до стану, при якому в плазмі крові суб'єкта циркулює підвищена кількість глюкози у порівнянні із здоровим індивідом. Гіперглікемію можна діагностувати, використовуючи способи, відомі в даній області техніки, включаючи вимірювання рівня глюкози в крові натще, як описано у даному документі.

Термін "гіперінсулінемія" у даному документі відноситься до стану, при якому підвищений рівень циркулюючого інсуліну при супутньому підвищеному або нормальному рівні глюкози в крові. Гіперінсулінемія може бути викликана інсулінрезистентністю, яка асоційована з дисліпідемією, наприклад, високим рівнем тригліцеридів, високим рівнем холестерину, високим рівнем ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) та низьким рівнем ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ); високим рівнем сечової кислоти; синдромом полікістозних яєчників; діабетом II типу й ожирінням. Гіперінсулінемію можна діагностувати як рівень інсуліну в плазмі, що перевищує 2 мкОд/мл.

40 У даному документі фраза "розлад маси тіла" відноситься до станів, асоційованих з надмірною масою тіла та/або підвищеним апетитом. Для визначення наявності в суб'єкта надлишкової маси тіла у порівнянні з еталонним здоровим індивідом використовують різні параметри, у тому числі вік, ріст, стать та стан здоров'я суб'єкта. Наприклад, можна вважати, що в суб'єкта надлишкова вага або ожиріння, за рахунок оцінки індексу маси тіла (ІМТ) суб'єкта, який розраховують шляхом розподілу маси тіла суб'єкта в кілограмах на квадрат росту суб'єкта в метрах. Вважається, що в дорослого суб'єкта з ІМТ у діапазоні від ~18,5 до ~24,9 кг/м² нормальна вага; у дорослого суб'єкта з ІМТ між ~ 25 і ~29,9 кг/м² надлишкова вага (предожиріння); і можна вважати, що дорослий суб'єкт із ІМТ ~ 30 кг/м² або вище страждає ожирінням. Підвищений апетит часто сприяє надлишковій вазі. Існує декілька станів, асоційованих з підвищеним апетитом, у тому числі, наприклад, синдром нічного харчування, який характеризується ранковою анорексією та вечірньою поліфагією, і часто асоціюється з безсонням, але може бути пов'язаний з ушкодженням гіпоталамуса.

Термін "активатори" відноситься до агентів, які, наприклад, стимулюють, підвищують, активують, полегшують, підсилюють активацію, сенсibiliзують або індують функцію або дію одного або більше агентів, наприклад, поліпептидів, що використовують для лікування або профілактики метаболічного розладу. Крім того, активатори включають агенти, які діють за тим самим механізмом, що й поліпептиди відповідно до даного винаходу (тобто агенти, які модулюють той самий сигнальний шлях, що й зазначені поліпептиди, аналогічно зазначеним поліпептидам) і здатні викликати біологічну реакцію, порівняну (або перевищуючу) з реакцією,

викликаною зазначеними поліпептидами. Приклади активаторів включають агоністи, наприклад, низькомолекулярні сполуки.

Термін "модулятори" спільно відноситься до поліпептидів відповідно до даного винаходу й активаторів.

5 Терміни "модулювати", "модуляція" і тому подібне відносяться до здатності агента (наприклад, активатора) прямо або побічно підсилювати функцію або активність одного або більше з поліпептидів (або молекул нуклеїнових кислот, що кодують їх); або здатності агента викликати ефект, порівняний з ефектом одного або більше з поліпептидів.

10 Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок", використовувані у даному документі взаємозамінно, відносяться до полімерної форми амінокислот будь-якої довжини, що може містити в собі генетично кодовані та не генетично кодовані амінокислоти, хімічно або біохімічно модифіковані або похідні амінокислот, і поліпептиди, які мають модифіковану первинну структуру білка. Дані терміни включають гібридні білки, у тому числі гібридні білки з гетерологічною амінокислотною послідовністю, гібридні білки з гетерологічними та гомологічними лідерними послідовностями, з 15 N-кінцевими залишками метіоніну або без них; імунологічно мічені білки; і тому подібне, але не обмежуються ними. У конкретних варіантах реалізації зазначені терміни відносяться до амінокислотної полімерної форми будь-якої довжини, що містить генетично кодовані амінокислоти. У конкретних варіантах реалізації зазначені терміни відносяться до амінокислотної полімерної форми будь-якої довжини, що містить генетично кодовані 20 амінокислоти, об'єднані з гетерологічною амінокислотною послідовністю. У конкретних варіантах реалізації зазначені терміни відносяться до амінокислотної послідовності довжиною 112 амінокислот, необов'язково об'єднаною з гетерологічною послідовністю. У конкретних варіантах реалізації у відповідних випадках при згадуванні білків і молекул, описаних у даному документі, терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" відносяться до поліпептидів, що відповідають 25 визначенню у даному документі.

Варто брати до уваги, що на протязі всього даного винаходу посилання робиться на амінокислоти відповідно до однобуквенного або трибуквенного коду. Для зручності читача, однобуквені та трибуквені коди амінокислот наведені нижче:

G	Glycine	Gly		P	Proline	Pro
A	Alanine	Ala		V	Valine	Val
L	Leucine	Leu		I	Isoleucine	Ile
M	Methionine	Met		C	Cysteine	Cys
F	Phenylalanine	Phe		Y	Tyrosine	Tyr
W	Tryptophan	Trp		H	Histidine	His
K	Lysine	Lys		R	Arginine	Arg
Q	Glutamine	Gln		N	Asparagine	Asn
E	Glutamic Acid	Glu		D	Aspartic Acid	Asp
S	Serine	Ser		T	Threonine	Thr

30 У даному документі термін "варіант" охоплює природні варіанти (наприклад, гомологи й алельні варіанти) і варіанти неприродного походження (наприклад, рекомбінантно модифіковані). Природні варіанти включають гомологи, тобто, нуклеїнові кислоти та поліпептиди, нуклеотидні або амінокислотні послідовності яких, відповідно, розрізняються у 35 різних видів. Природні варіанти включають алельні варіанти, тобто, нуклеїнові кислоти та поліпептиди, нуклеотидні або амінокислотні послідовності яких, відповідно, розрізняються в різних індивідів у межах виду. Варіанти неприродного походження включають нуклеїнові кислоти та поліпептиди, що містять зміни в нуклеотидній або амінокислотній послідовності, відповідно, де зазначена зміна у послідовності внесена штучно, наприклад, отримана в 40 лабораторії або іншій установі за рахунок людського втручання ("людськими руками").

Термін "нативний" або "дикого типу" стосовно GDF15 відноситься до біологічно активного природного GDF15, у тому числі біологічно активного природного варіанта GDF15. Даний термін включає послідовність зрілої GDF15 людини довжиною 112 амінокислот (SEQ ID NO: 1).

Термін "мутеїни" у даному документі в широкому змісті відноситься до рекомбінантних білків, тобто поліпептиду, який містить штучно введену зміну в амінокислотній послідовності, наприклад, зміну в амінокислотній послідовності, отриману в лабораторії або іншій установі за рахунок людського втручання ("людськими руками"). Ці поліпептиди зазвичай містять одиночну або множинні амінокислотні заміни або делеції та часто походять від клонованих генів, що піддалися сайт-специфічному або випадковому мутагенезу, або від повністю синтетичних генів. "Мутеїни GDF15" відповідно до даного винаходу, таким чином, охоплюють, наприклад, амінокислотні заміни й/або амінокислотні делеції (наприклад, укорочування за N-кінцем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 або більше амінокислот) у порівнянні з еталонним поліпептидом, наприклад, у порівнянні зі зрілим GDF15 людини (SEQ ID NO: 1).

У даному документі терміни "модифікований", "модифікація" і так далі щодо нативного GDF15 людини або мутеїну GDF15 відносяться до однієї або більше змін, що міняють властивості GDF15 людини, природного варіанта GDF15 або мутеїну GDF15, причому зазначені зміни не впливають на первинну амінокислотну послідовність GDF15. Така властивість включає, наприклад, розчинність, період напівжиття в кровотоці, стабільність, кліренс, імуногенність або алергенність та технологічність (наприклад, вартість й ефективність). "Модифікація" включає ковалентну хімічну модифікацію, яка не впливає на саму первинну амінокислотну послідовність поліпептиду GDF15 (нативного або мутеїну). Можливі зміни GDF15 людини, природного варіанта GDF15 або мутеїну GDF15 включають ПЕГілювання (ковалентне приєднання однієї або більше молекул поліетиленгліколю (ПЕГ) або їх похідних); глікозилювання (наприклад, N-глікозилювання), полісіалування та приєднання ГЕК; об'єднання з мальтоз-сполучним білком; об'єднання з альбуміном (наприклад, з ЛСА); зв'язування з альбуміном через, наприклад, кон'югований ланцюг жирної кислоти (ацилювання); об'єднання з Fc; і об'єднання з імітатором ПЕГ, але не обмежуються ними. Деякі конкретні варіанти реалізації призводять до модифікацій, пов'язаних з поліетиленгліколем, інші конкретні варіанти реалізації призводять до модифікацій, пов'язаних з альбуміном, а інші конкретні варіанти реалізації призводять до модифікацій, пов'язаних із глікозилюванням, або комбінаціям вищевказаного.

Терміни "ДНК", "нуклеїнова кислота", "молекула нуклеїнової кислоти", "полінуклеотид" і тому подібні використовуються в даному описі взаємозамінно для позначення полімерної форми нуклеотидів будь-якої довжини, дезоксирибонуклеотидів або рибонуклеотидів, або їх аналогів. Приклади, що не мають обмежувального характеру, включають лінійні та циклічні нуклеїнові кислоти, матричну РНК (мРНК), комплементарну ДНК (кДНК), рекомбінантні полінуклеотиди, вектори, зонди, праймери та тому подібні.

Термін "зонд" відноситься до фрагмента ДНК або РНК, що відповідає досліджуваному гену або послідовності, причому зазначений фрагмент мічений радіоактивною (наприклад, шляхом включення ³²P або ³⁵S) або деякими іншими виявляємими молекулами, наприклад, біотином, дигоксигеніном або флуоресцеїном. Оскільки ланцюги ДНК або РНК з комплементарними послідовностями повинні гібридизуватися, зонд можна застосовувати, наприклад, для мічення вірусних бляшок, бактеріальних колоній або смуг в гелі, що містять досліджуваний ген. Зонд може являти собою клоновану ДНК або синтетичний ланцюг ДНК; останній варіант можна використовувати для одержання кДНК або геномного клону з виділеного білка, наприклад, виконавши мікросеквенування частини білка, одержавши нуклеотидну послідовність, що кодує білок, синтезувавши олігонуклеотид, що несе цю послідовність, позначивши послідовність радіоактивною міткою та використовуючи її як зонд для скринінгу бібліотеки кДНК або геномної бібліотеки.

Термін "гетерологічний" відноситься до двох компонентів, заданих структурами, що походять з різних джерел. Наприклад, у контексті поліпептиду, "гетерологічний" поліпептид може містити функціонально зв'язані амінокислотні послідовності, що походять від різних поліпептидів (наприклад, перший компонент, що містить рекомбінантний поліпептид, і другий компонент, що походить від нативного поліпептиду GDF15). Аналогічним чином, у контексті полінуклеотиду, що кодує химерний поліпептид, "гетерологічний" полінуклеотид може містити функціонально зв'язані нуклеотидні послідовності, що походять від різних генів (наприклад, перший компонент із нуклеїнової кислоти, що кодує рекомбінантний поліпептид відповідно до варіанта реалізації, описаного у даному документі, і другий компонент із нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид-носіє). Інші типові "гетерологічні" нуклеїнові кислоти включають експресуючі конструкти, в яких нуклеїнова кислота, що містить кодуючу послідовність, функціонально пов'язана з регуляторним елементом (наприклад, промотором), генетичне походження якого відрізняється від походження кодуючої послідовності (наприклад, з метою забезпечити експресію в досліджуваній клітині-хазяїні, генетичне походження якої може відрізнятися від походження кодуючого промотору послідовності або як промотору, так і

кодуючої послідовності). Наприклад, промотор T7, функціонально пов'язаний з полінуклеотидом, що кодує поліпептид GDF15 або його домен, називають гетерологічною нуклеїновою кислотою. У контексті рекомбінантних клітин термін "гетерологічний" може відноситись до наявності нуклеїнової кислоти (або продукту гена, наприклад, поліпептиду),

5 генетичне походження якої відрізняється від клітини-хазяїна, в якій вона присутня.

Термін "функціонально зв'язаний" відноситься до зв'язку між молекулами, що забезпечує бажану функцію. Наприклад, "функціонально зв'язані" у контексті нуклеїнових кислот відноситься до функціонального зв'язку між нуклеотидними послідовностями. Наприклад, послідовність, що контролює експресію нуклеїнової кислоти (наприклад, промотор, сигнальна

10 послідовність або масив сайтів зв'язування факторів транскрипції) може бути функціонально зв'язана з другим полінуклеотидом, причому зазначена послідовність, що контролює експресію, впливає на транскрипцію та/або трансляцію другого полінуклеотиду. У контексті поліпептиду термін "функціонально зв'язані" відноситься до функціонального зв'язку між амінокислотними послідовностями (наприклад, різними доменами), що забезпечує описану активність

15 поліпептиду.

Використовуваний в даному описі у контексті структури поліпептиду, "N-кінець" (або "аміно-кінець") і C-кінець (або "карбоксильний кінець") відносяться до крайніх аміно- і карбоксильних кінців поліпептиду, відповідно, у той час як терміни "N-кінцевий" та "C-кінцевий" відносяться до відносних положень в амінокислотній послідовності поліпептиду в напрямку до N- і C-кінця, відповідно, і можуть включати залишки на N- і C-кінці, відповідно. "Безпосередньо N-кінцевий" або "безпосередньо C-кінцевий" відноситься до положення першого амінокислотного залишку щодо другого амінокислотного залишку, де перший та другий амінокислотні залишки ковалентно зв'язані для забезпечення безперервної амінокислотної послідовності.

20 Термін "що походить від" у контексті амінокислотної послідовності або полінуклеотидної послідовності (наприклад, амінокислотна послідовність, "яка походить від" поліпептиду GDF15), призначений для позначення, що поліпептид або нуклеїнова кислота містять послідовність, засновану на послідовності еталонного поліпептиду або нуклеїнової кислоти (наприклад, природного поліпептиду GDF15 або нуклеїнової кислоти, що кодує GDF15), і не призначений для обмеження джерела або способу, за допомогою якого отриманий білок або нуклеїнова

30 кислота. Наприклад, термін "відбувається від" включає гомологи або варіанти еталонних амінокислотних послідовностей або послідовностей ДНК.

У контексті поліпептиду термін "виділений" відноситься до досліджуваного поліпептиду, що (якщо він є природним поліпептидом) перебуває в середовищі, яке відрізняється від середовища, в якому він може зустрічатися у природних умовах. Під терміном "виділений" мають на увазі поліпептиди, які перебувають у зразках, ґрунтовно збагачених на представляючий інтерес поліпептид і/або в яких такий поліпептид є частково або значно очищеним. Якщо поліпептид не зустрічається у природних умовах, термін "виділений" означає, що поліпептид відділений від середовища, в якому він був отриманий з використанням

35 синтетичних або рекомбінантних засобів.

40 "Збагачений" означає, що зразок піддавали штучним маніпуляціям (наприклад, у лабораторії, наприклад, вчений або клініцист), так що досліджуваний поліпептид присутній у а) підвищеній концентрації (наприклад, щонайменше в 3 рази перевищуючої, щонайменше в 4 рази перевищуючої, щонайменше в 8 разів перевищуючої, щонайменше в 64 рази перевищуючої або більше) у порівнянні з концентрацією поліпептиду у вихідному зразку, наприклад, біологічному зразку (наприклад, зразку, в якому поліпептид зустрічається у природних умовах або в якому він присутній після введення), або б) концентрації, що перевищує концентрацію в середовищі, в якому зазначений поліпептид був отриманий (наприклад, у бактеріальній клітині).

45

Термін "в основному чистий" означає, що компонент (наприклад, поліпептид) становить більше ніж близько 50 % від загального вмісту композиції, і, як правило, більше, ніж близько 60 % від загального вмісту поліпептиду. Більш типово, "в основному чистий" відноситься до композицій, в яких щонайменше 75 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 % або більша кількість від загальної композиції становить компонент інтересу. У деяких випадках поліпептид буде становити більше ніж близько 90 %, або більше ніж близько 95 % від загального вмісту композиції.

55

Терміни "антитіла" (Ат) та "імуноглобуліни" (Іг) відносяться до глікопротеїнів, що мають однакові структурні характеристики. У той час як антитіла демонструють специфічність зв'язування з конкретними антигенами, імуноглобуліни включають як антитіла, так й інші антитілоподібні молекули, які не мають специфічності до антигена. Антитіла докладно описані далі у даному документі.

60

Термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції практично однорідних антитіл, тобто, окремі антитіла, що становлять популяцію, є ідентичними, за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними та спрямовані проти єдиного антигенного сайту.

На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які можуть містити різні антитіла проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло спрямоване проти єдиної детермінанти антигена.

У контексті антитіла термін "виділене" відноситься до антитіла, відділеного й/або очищеного від забруднюючих компонентів природного середовища; такі забруднюючі компоненти включають матеріали, які можуть заважати діагностичному або терапевтичному застосуванню антитіла, і можуть включати ферменти, гормони та інші білкові або небілкові розчинені речовини.

Фраза "консервативна амінокислотна заміна" відноситься до заміни амінокислотних залишків у наступних групах: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; і 6) D, E. Консервативні амінокислотні заміни можуть зберігати активність білка при заміні амінокислот(и) у складі білка амінокислотою, що містить бічний ланцюг з аналогічними кислотними, лужними властивостями, зарядом, полярністю або розміром. Посібник із заміни, інсерції або делеції може бути заснований на вирівнюванні амінокислотних послідовностей різних варіантів білків або білків із різних видів.

Фактор диференціювання росту 15 (GDF15)

GDF15, також відомий як MIC-1 (інгібіторний цитокін макрофагів-1), PDF (фактор диференціювання передміхурової залози), PLAB (плацентарний кістковий морфогенетичний білок), NAG-1 (ген, який активується нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП)), ТФР-PL і PTGFB, є членом над сімейства трансформуючого фактора росту β (ТФР- β). GDF15, що синтезується у вигляді 62-кДа внутрішньоклітинного білка-попередника, згодом розщеплюваного фурином-подібною протеазою, секретується у вигляді 25-кДа білка, зв'язаного дисульфідними зв'язками. [Див., наприклад, Fairlie et al., J. Leukoc. Biol 65:2-5 (1999)]. мРНК GDF15 зустрічається в декількох тканинах, у тому числі у печінці, нирках, підшлунковій залозі, товстій кишці та плаценті, і експресію GDF15 у печінці може в значній мірі підсилюватися при ушкодженні таких органів, як печінка, нирки, серце та легені.

Попередник GDF15 являє собою 308-амінокислотний поліпептид (№ послідовності в NCBI NP_004855.2), що містить 29-амінокислотний сигнальний пептид, 167-амінокислотний продом і зрілий домен довжиною 112 амінокислот, що вирізається з продомена фурином-подібними протеазами. 308-амінокислотний поліпептид GDF15 називають "повнорозмірним" поліпептидом GDF15; 112-амінокислотний поліпептид GDF15 (амінокислоти 197-308 "повнорозмірного" GDF15) являє собою "зрілий" поліпептид GDF15 (SEQ ID NO: 1). Якщо не зазначено інше, термін "GDF15" відноситься до зрілої послідовності людини довжиною 112 амінокислот. Крім того, чисельні згадування конкретних залишків GDF15 відносяться до зрілої послідовності довжиною 112 амінокислот (тобто залишок 1 являє собою Ala (A), а залишок 112 являє собою Ile (I); див. SEQ ID NO: 1). Слід зазначити, що хоча амінокислотна послідовність попередника GDF15 дозволяє передбачити три сайти вирізання, що призводить до трьох гіпотетичних форм "зрілого" GDF15 людини (тобто довжиною 110, 112 і 115 амінокислот), 112-амінокислотна зріла послідовність прийнята за правильний варіант.

Рамки даного винаходу включають ортологи GDF15 та їхні модифіковані форми, отримані з інших видів ссавців, у тому числі миші (NP_035949), шимпанзе (XP_524157), орангутанга (XP_002828972), резусу (EHH29815), гігантської панди (XP_002912774), гібону (XP_003275874), морської свинки (XP_003465238), тхора (AER98997), корови (NP_001193227), свині (NP_001167527), собаки (XP_541938) і качкодзьоба (*Ornithorhynchus anatinus*; AFV61279), а також їхнє застосування. Зріла форма GDF15 людини має приблизно 67 % ідентичність амінокислотної послідовності у порівнянні з ортологом миші.

Для зручності, модифіковані молекули GDF15 людини, варіанти GDF15 (наприклад, мутеїни) та модифіковані мутеїни GDF15, описані далі, спільно називаються далі у даному документі "поліпептидом(ами)". Слід зазначити, що будь-яке згадування "людини" у зв'язку з поліпептидами та молекулами нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу не означає обмеження відносно способу або джерела одержання зазначеного поліпептиду або нуклеїнової кислоти, а лише відноситься до послідовності, оскільки вона може відповідати послідовності природного поліпептиду або молекули нуклеїнової кислоти людини. У конкретних варіантах реалізації молекули модифікованого GDF15 людини являють собою N-глікозилізовані димери. У певних варіантах реалізації молекули модифікованого GDF15 людини являють собою N-глікозилізовані гомодимери. Крім поліпептидів людини та молекул нуклеїнових кислот, що

кодують їх, у даному винаході розглядаються поліпептиди, родинні GDF15, і відповідні молекули нуклеїнових кислот із інших видів.

А. Поліпептиди з бажаними фізичними властивостями

У даному винаході, зокрема, розглядаються поліпептиди, що містять безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (зрілому GDF15 людини довжиною 112-амінокислот). Поліпептиди можуть містити одну або більше амінокислотних заміни і/або делецій у порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1. У певних варіантах реалізації, крім амінокислотних заміни, поліпептиди відповідно до даного винаходу можуть також містити делеції амінокислот у порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1. У деяких варіантах реалізації поліпептиди відповідно до даного винаходу можуть містити делеції амінокислот у порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1.

Для зручності й ясності, амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 використовують як еталонну послідовність для поліпептидів, представлених у даному документі. Отже, положення амінокислот у даному документі пронумеровані стосовно SEQ ID NO: 1. Послідовність SEQ ID NO: 1 представлена нижче:

ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKT
SLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLQKTDGTGVSQTYDDLLAKDCHCI

У деяких варіантах реалізації поліпептиди відповідно до даного винаходу можуть включати одну, дві, три або більше амінокислотні заміни, додавання або делеції, що впроваджують один або більше консенсусний(х) сайт(ів) N-зв'язаного глікозилювання в області, де такий сайт відсутній в SEQ ID NO: 1. Консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилювання містить послідовність NXS/T, де N являє собою Asn; X - будь-яка амінокислота, крім проліну, після якої перебуває Ser (S) або Thr (T).

Приклади поліпептидів відповідно до даного винаходу включають поліпептиди, що містять один, два, три, чотири або більше консенсусних сайти глікозилювання (наприклад, консенсусних сайтів N-зв'язаного глікозилювання) в амінокислотному положенні, де такий сайт відсутній в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити амінокислотну заміну в порівнянні з SEQ ID NO: 1, що забезпечує утворення одного консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання у положенні заміщення (наприклад, послідовність NGD в SEQ ID NO: 1 можна замінити на NGT/S шляхом однієї заміни; положення заміщення підкреслене). В інших випадках поліпептид може містити дві амінокислотні заміни у порівнянні з SEQ ID NO: 1, що забезпечують утворення одного консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання у положеннях заміщення (наприклад, послідовність KTD в SEQ ID NO: 1 можна замінити на NTT/S шляхом двох заміни; положення заміщення підкреслені). У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити три амінокислотні заміни у порівнянні з SEQ ID NO: 1, що забезпечують утворення одного консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання у положеннях заміщення (наприклад, послідовність GPG в SEQ ID NO: 1 можна замінити на NTT/S шляхом трьох заміни; положення заміщення підкреслене).

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити одну або більше амінокислотну делецію у порівнянні з SEQ ID NO: 1, що забезпечують утворення одного консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання у положенні делеції. Наприклад, послідовність NGDHCPLGPGRCRLHT в SEQ ID NO: 1 можна змінити шляхом делеції амінокислот D-H (підкреслені)), тим самим забезпечуючи утворення консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання: NGT.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити додавання однієї або більше амінокислоти у порівнянні з SEQ ID NO: 1, що забезпечує утворення одного консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання у положенні(ях) додавання. Приклад впровадження консенсусного сайту N-зв'язаного глікозилювання шляхом додавання однієї амінокислоти включає додавання N до послідовності LHT в SEQ ID NO: 1, що дозволяє одержати послідовність LNHT, де NHT – консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилювання.

Як відзначено вище, поліпептид може містити одну або більше амінокислотну заміну в порівнянні з SEQ ID NO: 1, і заміни можна нумерувати, як положення відповідної амінокислоти у послідовності SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому зазначена безперервна амінокислотна послідовність містить щонайменше одну з наступних пар заміни у порівнянні з відповідними амінокислотами у послідовності SEQ ID NO: 1:

- i) D5T і R21N або D5S і R21N;
- ii) R16N і H18T або R16N і H18S;
- iii) S23N і E25T або S23N і E25S;
- iv) L24N і D26T або L24N і D26S;
- v) S50N і F52T; S50N і F52S; F52N і A54T; або F52N і A54S;
- vi) Q51N і R53T; Q51N і R53S; R53N і A55T; або R53N і A55S;
- vii) S64N і H66T або S64N і H66S;
- viii) L65N і R67T або L65N і R67S;
- ix) S82N і N84T або S82N і N84S;
- x) K91N і D93T; K91N і D93S; D93N і G95T; або D93N і G95S;
- xi) T94N і V96T; T94N і V96S; V96N і L98T; або V96N і L98S;
- xii) S97N і Q99T або S97N і Q99S; і
- xii) A106N і D108T або A106N і D108S.

Наприклад, заміни, представлені вище у пункті i), означають, що поліпептид містить треонін (T) або серин (S) в амінокислотному положенні, що відповідає амінокислотному положенню 5 в SEQ ID NO: 1, причому в SEQ ID NO: 1 в амінокислотному положенні 5 присутній аспартат (D). Заміну D у положенні 5 на T або S можна позначити як D5T/S. Положення відповідної амінокислоти у поліпептиді у порівнянні з SEQ ID NO: 1 можна визначити шляхом вирівнювання амінокислотних послідовностей.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити дві амінокислотні заміни (пари замін), що забезпечують утворення однієї консенсусної послідовності N-глікозилювання у положенні, де консенсусна послідовність N-глікозилювання відсутня в SEQ ID NO: 1. Приклади таких замін включають R16N і H18T/S; K91N і D93T/S; T94N і V96T/S; та інші заміни, перераховані вище. R16N і H18T/S означають, що поліпептид містить N у положенні, що відповідає положенню 16 SEQ ID NO: 1, причому в SEQ ID NO: 1 там є присутній R, і поліпептид містить T або S у положенні, що відповідає положенню 18 в SEQ ID NO: 1, де є присутнім H. Оскільки послідовність RXH (у положеннях 16-18) в SEQ ID NO: 1 не містить залишків консенсусної послідовності N-зв'язаного глікозилювання, зазначена пара замін призводить до впровадження консенсусної послідовності N-зв'язаного глікозилювання.

В альтернативних варіантах реалізації одиночної амінокислотної заміни може бути досить для появи консенсусної послідовності N-зв'язаного глікозилювання, наприклад, оскільки послідовність NGD (у положенні 3-5) є присутньою в SEQ ID NO: 1, єдина заміна D на T або S призводить до утворення послідовності NGT або NGS, відповідно, які являють собою консенсусні послідовності N-глікозилювання.

У деяких випадках в GDF15 дикого типу можна впровадити більше однієї консенсусної послідовності N-глікозилювання. Наприклад, амінокислотну послідовність GDF15 дикого типу можна модифікувати шляхом заміни та/або делеції, одержуючи одну, дві, три, чотири або більше консенсусні послідовності N-глікозилювання. У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити 112-амінокислотну безперервну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичність амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, де 112 суміжних амінокислот містять одну, дві, три, чотири або більше консенсусних послідовностей N-глікозилювання, наприклад, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, 1-3 або 1-2 консенсусні послідовності N-глікозилювання.

Приклад поліпептиду з двома консенсусними послідовностями N-глікозилювання включає мутеїн GDF15, що містить T/C у положенні 5 (у порівнянні з SEQ ID NO: 1 і N у положенні 21 (у порівнянні з SEQ ID NO: 1)).

Типові поліпептиди відповідно до даного винаходу включають поліпептиди, що містять дві або більше консенсусні послідовності N-зв'язаного глікозилювання. Наприклад, поліпептид може містити комбінацію двох або більше з наступних пар заміни:

- i) D5T і R21N або D5S і R21N;
- ii) R16N і H18T або R16N і H18S;
- iii) S23N і E25T або S23N і E25S;
- iv) L24N і D26T або L24N і D26S;
- v) S50N і F52T; S50N і F52S; F52N і A54T; або F52N і A54S;
- vi) Q51N і R53T; Q51N і R53S; R53N і A55T; або R53N і A55S;
- vii) S64N і H66T; або S64N і H66S;
- viii) L65N і R67T; або L65N і R67S;
- ix) S82N і N84T або S82N і N84S;
- x) K91N і D93T; K91N і D93S; D93N і G95T; або D93N і G95S;
- xi) T94N і V96T; T94N і V96S; V96N і L98T; або V96N і L98S;
- xii) S97N і Q99T; або S97N і Q99S; і

xii) A106N i D108T або A106N i D108S.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому зазначена безперервна амінокислотна послідовність містить щонайменше одну з наступних пар замінів у порівнянні з відповідними амінокислотами у послідовності SEQ ID NO: 1:

- i) D5T i R21N або D5S i R21N;
- ii) R16N i H18T або R16N i H18S;
- iii) S23N i E25T або S23N i E25S;
- iv) S50N i F52T; S50N i F52S; F52N i A54T; або F52N i A54S;
- vi) Q51N i R53T; Q51N i R53S; R53N i A55T; або R53N i A55S;
- vi) S64N i H66T; або S64N i H66S;
- vii) K91N i D93T; K91N i D93S; D93N i G95T; або D93N i G95S;
- viii) T94N i V96T; T94N i V96S; V96N i L98T; або V96N i L98S;
- ix) S97N i Q99T; або S97N i Q99S; i
- x) A106N i D108T або A106N i D108S;

де заміна створює один або більше консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилування, що містить послідовність NXS/T, де N являє собою Asn; X - будь-яка амінокислота, крім проліну, після якої перебуває Ser (S) або Thr (T), і, крім того, один або більше з консенсусних сайтів N-зв'язаного глікозилування пов'язані з N-гліканом. У додатковому варіанті реалізації поліпептид утворить димер. У додатковому варіанті реалізації поліпептид укорочений за N-кінцем і/або C-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Поліпептид може бути вкорочений на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або більше амінокислот у порівнянні з еталонним поліпептидом, наприклад, SEQ ID NO: 1. У конкретному варіанті реалізації поліпептид укорочений на перші три N-кінцевих залишки GDF15 (Δ ARN або Δ N3). У додатковому варіанті реалізації поліпептид має розчинність щонайменше 0,5 мг/мл, наприклад, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 20 мг/мл або щонайменше 25 мг/мл, наприклад, розчинністю в діапазоні від 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, від 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, від 1 мг/мл до 25 мг/мл, від 1 мг/мл до 20 мг/мл, від 3 мг/мл до 25 мг/мл, від 3 мг/мл до 20 мг/мл, від 5 мг/мл до 25 мг/мл, від 5 мг/мл до 20 мг/мл або від 5 мг/мл до 18 мг/мл у буферному розчині. У деяких випадках поліпептид має розчинність щонайменше 0,5 мг/мл, наприклад, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 20 мг/мл або щонайменше 25 мг/мл, наприклад, розчинністю в діапазоні від 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, від 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, від 1 мг/мл до 25 мг/мл, від 1 мг/мл до 20 мг/мл, від 3 мг/мл до 25 мг/мл, від 3 мг/мл до 20 мг/мл, від 5 мг/мл до 20 мг/мл або від 5 мг/мл до 18 мг/мл у буферному розчині. Буфер може являти собою фосфатний буфер, трис-буфер, HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер і тому подібне або їх комбінацію. У деяких випадках буфер може містити фізіологічний розчин з фосфатним буфером. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію та хлорид натрію. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію, хлорид натрію та мурашину кислоту. Наприклад, буфер може містити 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ фосфату калію, 100-200 мМ хлориду натрію та 10-30 мСм/см мурашиної кислоти. У додаткових варіантах реалізації поліпептид знижує рівень глюкози в крові, масу тіла та/або споживання їжі щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % у порівнянні зі станом до введення поліпептиду.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому зазначена безперервна амінокислотна послідовність містить щонайменше одну з наступних пар замінів у порівнянні з відповідними амінокислотами у послідовності SEQ ID NO: 1:

- i) D5T i R21N;
- ii) S23N i E25T;
- iii) F52N i A54T;
- iv) R53N i A55T;
- v) S64N i H66T;
- vi) K91N i D93T;
- vii) D93N i G95T;
- viii) S97N i Q99T; i
- ix) A106N i D108T;

де заміна створює один або більше консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилування, що містить послідовність NXS/T, де N являє собою Asn; X - будь-яка амінокислота, крім проліну, після якої перебуває Ser (S) або Thr (T), і, крім того, один або більше з консенсусних сайтів N-зв'язаного глікозилування пов'язані з N-гліканом. У додатковому варіанті реалізації поліпептид утворює димер. У додатковому варіанті реалізації поліпептид укорочений за N-кінцем і/або C-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Поліпептид може бути вкорочений на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або більше амінокислот у порівнянні з еталонним поліпептидом, наприклад, SEQ ID NO: 1. У конкретному варіанті реалізації поліпептид укорочений на перші три N-кінцевих залишки GDF15 (Δ ARN або Δ N3). У додатковому варіанті реалізації поліпептид має розчинність щонайменше 0,5 мг/мл, наприклад, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 20 мг/мл або щонайменше 25 мг/мл, наприклад, розчинністю в діапазоні від 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, від 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, від 1 мг/мл до 25 мг/мл, від 1 мг/мл до 20 мг/мл, від 3 мг/мл до 25 мг/мл, від 3 мг/мл до 20 мг/мл, від 5 мг/мл до 25 мг/мл, від 5 мг/мл до 20 мг/мл або від 5 мг/мл до 18 мг/мл у буферному розчині. У деяких випадках поліпептид має розчинність щонайменше 0,5 мг/мл, наприклад, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 20 мг/мл або щонайменше 25 мг/мл, наприклад, розчинністю в діапазоні від 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, від 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, від 1 мг/мл до 25 мг/мл, від 1 мг/мл до 20 мг/мл, від 3 мг/мл до 25 мг/мл, від 3 мг/мл до 20 мг/мл, від 5 мг/мл до 25 мг/мл, від 5 мг/мл до 20 мг/мл або від 5 мг/мл до 18 мг/мл у буферному розчині. Буфер може являти собою фосфатний буфер, трис-буфер, HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер і тому подібне або їх комбінацію. У деяких випадках буфер може містити фізіологічний розчин з фосфатним буфером. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію та хлорид натрію. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію, хлорид натрію та мурашину кислоту. Наприклад, буфер може містити 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ фосфату калію, 100-200 мМ хлориду натрію та 10-30 мСм/см мурашиної кислоти. У додаткових варіантах реалізації поліпептид знижує рівень глюкози в крові, масу тіла та/або споживання їжі щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % у порівнянні зі станом до введення поліпептиду. У конкретних варіантах реалізації поліпептид містить або складається в основному з: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 30. У конкретних варіантах реалізації поліпептид містить або складається в основному з: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 або SEQ ID NO: 100. У певних варіантах реалізації поліпептид може містити безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 95 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому зазначена безперервна амінокислотна послідовність містить щонайменше одну з наступних пар замінів у порівнянні з відповідними амінокислотами у послідовності SEQ ID NO: 1:

- i) D5T і R21N;
- ii) S64N і H66T;
- iii) K91N і D93T;
- iv) D93N і G95T; і

v) S97N і Q99T; де заміна створює один або більше консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилування, що містить послідовність NXS/T, де N являє собою Asn; X - будь-яка амінокислота, крім проліну, після якої перебуває Ser (S) або Thr (T), і, крім того, один або більше з консенсусних сайтів N-зв'язаного глікозилування зв'язані з N-гліканом; крім того, поліпептид утворює димер; і, крім того, поліпептид має розчинність щонайменше 1 мг/мл у буферному розчині.

У додаткових варіантах реалізації поліпептид має розчинність щонайменше 5 мг/мл у буферному розчині. Буфер може являти собою фосфатний буфер, трис-буфер, HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер і тому подібне або їх комбінацію. У деяких випадках буфер може містити фізіологічний розчин з фосфатним буфером. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію та хлорид натрію. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію, хлорид натрію та мурашину кислоту. Наприклад, буфер може містити 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ фосфату калію, 100-200 мМ хлориду натрію та 10-30 мСм/см мурашиної кислоти. У додаткових варіантах реалізації поліпептид знижує рівень глюкози в крові, масу тіла та/або споживання їжі щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % у порівнянні зі станом до введення поліпептиду. У додатковому варіанті реалізації поліпептид укорочений за N-кінцем і/або C-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Поліпептид може бути вкорочений на 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або більше амінокислот у порівнянні з еталонним поліпептидом, наприклад, SEQ ID NO: 1. У конкретному варіанті реалізації поліпептид укорочений на перші три N-кінцевих залишки GDF15 (Δ ARN або Δ N3). У конкретних варіантах реалізації поліпептид містить або складається в основному з: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 або SEQ ID NO: 30. У конкретних варіантах реалізації поліпептид містить або складається в основному з: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96 або SEQ ID NO: 100.

У деяких варіантах реалізації поліпептид може містити 112-амінокислотну безперервну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичність амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1, де 112 суміжних амінокислот містять одну, дві, три, чотири або більше з пар замінів, представлених вище.

На фігурі 1 зображені амінокислотні послідовності типових поліпептидів (з номерами від 1 до 17), розглянуті у даному винаході, вирівняні з амінокислотною послідовністю зрілого GDF15 дикого типу людини (дт hGDF15; SEQ ID NO: 1). На фігурі 1 зображені поліпептиди, що містять два консенсусних сайти N-зв'язаного глікозилювання (мутант номер 1; SEQ ID NO: 2), а також поліпептиди, що містять один консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилювання (мутанти номер 2-17; SEQ ID NO: 3-18, відповідно).

У деяких варіантах реалізації даного винаходу розглядається модифікований N-глікозилюваний димер GDF15, причому зазначений димер містить два поліпептиди, описаних у даному документі, ковалентно приєднані один до одного. У конкретних варіантах реалізації зазначені два поліпептиди містять амінокислотну послідовність, вибрану з: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 30 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 5 амінокислот; причому зазначені поліпептиди містять щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозилюваним. У конкретних варіантах реалізації зазначені два поліпептиди містять амінокислотну послідовність, вибрану з: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 30 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 2 амінокислот; причому зазначені поліпептиди містять щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозилюваним. У конкретних варіантах реалізації кожний із зазначених двох поліпептидів складається з амінокислотної послідовності, вибраної з: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 або SEQ ID NO: 100 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 5 амінокислот; причому зазначені поліпептиди містять щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозилюваним. У конкретних варіантах реалізації кожний із зазначених двох поліпептидів складається з амінокислотної послідовності, вибраної з: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 або SEQ ID NO: 100 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 2 амінокислот; причому зазначені поліпептиди містять щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозилюваним. У додаткових варіантах реалізації модифікований N-глікозилюваний димер GDF15 є гомодимером, з'єднаним міжланцюговим дисульфідним зв'язком. У додаткових варіантах реалізації модифікований N-глікозилюваний димер GDF15 є гомодимером, що містить два поліпептиди, описані у даному документі, кожний з яких містить однакову амінокислотну послідовність, причому зазначені поліпептиди містять щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозилюваним.

У даному винаході також розглядаються поліпептиди, що являють собою активні фрагменти (наприклад, підпослідовності) поліпептидів, описаних вище. Довжина активних фрагментів або підпослідовностей може становити від 40 до 111 амінокислот, наприклад, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 106, 109 або до 111 амінокислот.

Поліпептиди мають задану ідентичність послідовності у порівнянні з еталонною послідовністю протягом безперервної послідовності амінокислот заданої довжини (наприклад, "вікна порівняння"). Способи вирівнювання послідовностей для порівняння добре відомі в даній області техніки. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути проведено, наприклад, за допомогою алгоритму локальної гомології Сміта-Ватермана (Smith & Waterman), Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), за допомогою алгоритму вирівнювання гомології Нідлмана-Вунша (Needleman & Wunsch), J. Mol. Biol. 48:443 (1970), за допомогою методу пошуку подібності Пірсона-Ліпмана (Pearson & Lipman), Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), шляхом комп'ютеризованої реалізації цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA у Wisconsin Genetics Software Package, Медісон, штат Вісконсин, США), або ручного

вирівнювання та візуального огляду (див., наприклад, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 додаток)).

Наприклад, підходящий поліпептид може містити амінокислотну послідовність, щонайменше на приблизно 75 %, щонайменше на приблизно 80 %, щонайменше на приблизно 85 %, щонайменше на приблизно 90 %, щонайменше на приблизно 95 %, щонайменше на приблизно 98 %, або щонайменше на приблизно 99 % ідентичну безперервному ланцюгу з 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 або до 112 амінокислот з SEQ ID NO: 1.

Типові фрагменти поліпептидів, описаних у даному документі, включають поліпептиди, що містять амінокислотні делеції у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Наприклад, поліпептиди можуть бути вкорочені за N-кінцем і/або за C-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Поліпептид може бути вкорочений на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або більше амінокислот у порівнянні з еталонним поліпептидом, наприклад, SEQ ID NO: 1. У деяких варіантах реалізації досліджуваній поліпептид може містити одну або більше заміни, що дозволяють впровадити консенсусну послідовність N-зв'язаного глікозилування, наприклад, описану в даному документі, і вкорочений за N-кінцем і/або C-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах реалізації довжина поліпептиду може становити щонайменше 98 амінокислот, а його амінокислотна послідовність може бути щонайменше на 90 % ідентична відповідного 98-амінокислотного ланцюга SEQ ID NO: 1. Поліпептид може не містити перших трьох-чотирнадцяти амінокислот (наприклад, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 амінокислот), присутніх на N-кінці SEQ ID NO: 1, але зберігати амінокислоти, що є присутніми на C-кінці SEQ ID NO: 1. Інакше кажучи, вилучена(и) амінокислота(и) відповідають N-кінцевим амінокислотам SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах реалізації довжина мутеїну GDF15 може становити щонайменше 106 амінокислот, а його амінокислотна послідовність може бути щонайменше на 90 % ідентична відповідного 106-амінокислотного ланцюга SEQ ID NO: 1. Мутеїн GDF15 може не містити перші шість амінокислот, що є присутніми на N-кінці SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах реалізації довжина поліпептиду може становити щонайменше 109 амінокислот, а його амінокислотна послідовність може бути щонайменше на 90 % ідентична відповідного 109-амінокислотного ланцюга SEQ ID NO: 1. Мутеїн GDF15 може не містити перші три амінокислоти, що є присутніми на N-кінці SEQ ID NO: 1.

Типові поліпептиди відповідно до даного винаходу зображені на фігурі 2. Типові поліпептиди (номери 1-17), показані на малюнку 1, мають таку саму довжину, як і дт hGDF15. Довжина типових поліпептидів (номера 18-34; SEQ ID NO: 19-35), зображених на фігурі 2, становить 109 амінокислот, і вони містять делецію трьох N-кінцевих амінокислот ($\Delta N3$) у порівнянні з дт hGDF15. Однак при згадуванні положення амінокислотних заміни зазначений номер залишку являє собою залишок, що відповідає положенню в зрілому hGDF15 дт (дт; SEQ ID NO: 1). Таким чином, амінокислота G на N-кінці поліпептидів відноситься до залишку 4, хоча вона являє собою першу амінокислоту в амінокислотній послідовності поліпептиду.

Як відзначалося вище, фрагменти поліпептидів можуть містити одну або більше з амінокислотних заміни, що впроваджують консенсусну послідовність N-глікозилування у порівнянні з послідовністю SEQ ID NO: 1, наприклад, одну, дві або більше амінокислотні заміни, описаних у даному документі.

Як зазначено вище та докладно описано нижче, поліпептиди відповідно до даного винаходу можна модифікувати шляхом, наприклад, ПЕГілювання (ковалентного приєднання однієї або більше молекул поліетиленгліколю (ПЕГ) або їх похідних); глікозилування (наприклад, N-глікозилування), полісіалування; утворення гібридних молекул з альбуміном, що містять сироватковий альбумін (наприклад, людський сироватковий альбумін (ЛСА), сироватковий альбумін яванської макаки або бичачий сироватковий альбумін (БСА)); зв'язування з альбуміном через, наприклад, кон'югований ланцюг жирної кислоти (ацилування); об'єднання з Fc; і об'єднання з імітатором ПЕГ. У деяких варіантах реалізації модифікації вводять сайт-специфічним чином. В інших варіантах реалізації модифікація включає лінкер. Лінкер може кон'югувати модифікуючу групу з поліпептидом.

У конкретних варіантах реалізації даного винаходу розглядається модифікація зрілого GDF15 людини і мутеїнів GDF15 (наприклад, поліпептидів, описаних вище) шляхом кон'югації з альбуміном. В інших варіантах реалізації даного винаходу розглядається модифікація поліпептидів за допомогою N-глікозилування або O-глікозилування. Характеристики кон'югатів альбумінів і поліпептиду (наприклад, гібридних білків) і глікозилуваних поліпептидів описані далі.

Конкретні модифікації з метою зміни й/або імітації функції GDF15

Поліпептид може включати одну або більше з модифікацій, що поліпшують бажані властивості білка в складі для терапії (наприклад, період напівжиття в сироватці), що дозволяють викликати утворення антитіл для використання в аналізах, які виявляють (наприклад, маркери епітопів), що забезпечують простоту очищення білка і так далі. Такі модифікації включають ПЕГілювання (ковалентне приєднання однієї або більше молекул поліетиленгліколю (ПЕГ) або їх похідних); глікозилування (N - і O-зв'язане); полісіалування; об'єднання з альбуміном; зв'язування з альбуміном через кон'югований ланцюг жирної кислоти (ацилювання); Fc-гібридні білки; і об'єднання з імітатором ПЕГ, але не обмежуються ними.

Як викладено у даному документі, у даному винаході розглядаються гібридні молекули, що містять зрілий поліпептид GDF15 (наприклад, зрілий GDF15 людини) або мутеїновий поліпептид GDF15 (наприклад, мутеїн зрілого GDF15 людини), де зрілий поліпептид GDF15 або мутеїновий поліпептид GDF15 містить щонайменше одну модифікацію, що не впливає на його амінокислотну послідовність, яка модифікація поліпшує хоча б одну фізичну властивість поліпептиду або мутеїнового поліпептиду. В одному варіанті реалізації модифікація поліпептиду GDF15 або мутеїнового поліпептиду GDF15 включає кон'югування з сироватковим альбуміном (наприклад, людським сироватковим альбуміном (ЛСА), сироватковим альбуміном яванської макаки або бичачий сироватковий альбумін (БСА)). У деяких варіантах реалізації фізична властивість являє собою розчинність.

У варіантах реалізації, де гібридна молекула містить модифікований поліпептид GDF15 або мутеїн GDF15 (наприклад, поліпептиди, описані вище), кожний з яких кон'югований з альбуміном, загальна розчинність гібридної молекули поліпшується у порівнянні з некон'югованим рекомбінантним GDF15 людини. У деяких варіантах реалізації гібридна молекула має розчинність, що становить щонайменше 1 мг/мл у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (PBS) при pH 7,0. В інших варіантах реалізації гібридна молекула має розчинність, що становить щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл або щонайменше 5 мг/мл. В інших варіантах реалізації гібридна молекула має розчинність, що становить щонайменше 6 мг/мл у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (PBS) при pH 7,0, щонайменше 7 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 9 мг/мл або щонайменше 10 мг/мл. У конкретних варіантах реалізації гібридна молекула має розчинність більше 10 мг/мл.

ПЕГілювання: Клінічна ефективність білкових терапевтичних засобів часто обмежена коротким часом напівжиття у плазмі та схильністю до розкладання за рахунок протеаз. Дослідження різних терапевтичних білків (наприклад, філграстиму) показали, що такі складності можна перебороти за рахунок різних модифікацій, включаючи кон'югування або зв'язування послідовності поліпептиду з кожним із різних небілкових полімерів, наприклад, поліетиленгліколем (ПЕГ), поліпропіленгліколем або поліоксіалкіленами (див., наприклад, зазвичай за рахунок сполучної групи, ковалентно зв'язаної з білком і небілковим полімером, наприклад, ПЕГ). Показано, що такі ПЕГ-кон'юговані біомолекули мають клінічно корисні властивості, включаючи поліпшену фізичну та термічну стабільність, захист від ферментативного розкладання, підвищену розчинність, більш тривалий час напівжиття в кровотоці *in vivo* та знижений кліренс, знижену імуногенність й антигенність, і знижену токсичність.

Молекули ПЕГ, що підходять для кон'югування з послідовністю поліпептиду, зазвичай розчинні у воді при кімнатній температурі та мають загальну формулу $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, де R - атом водню або захисна група, наприклад, алкільна або алканольна група, і де n — ціле число від 1 до 1000. Якщо R являє собою захисну групу, вона зазвичай містить від 1 до 8 атомів вуглецю. ПЕГ, кон'югований з послідовністю поліпептиду, може бути лінійним або розгалуженим. Розгалужені похідні ПЕГ, "зірчасті ПЕГ" і багатопроточні ПЕГ розглядаються у даному винаході. Молекулярна маса ПЕГ, використовуваного у даному винаході, не обмежується яким-небудь певним діапазоном, однак у деяких варіантах реалізації молекулярна маса становить від 500 до 20000, а в інших варіантах реалізації — від 4000 до 10000.

У даному винаході також розглядаються композиції кон'югатів, де ПЕГ характеризується різними значеннями n і, таким чином, присутні різні ПЕГ у певних співвідношеннях. Наприклад, деякі композиції містять суміш кон'югатів, де $n=1, 2, 3$ і 4 . У деяких композиціях частка кон'югатів, де $n=1$, становить 18-25 %, частка кон'югатів, де $n=2$, становить 50-66 %, частка кон'югатів, де $n=3$, становить 12-16 % і частка кон'югатів, де $n=4$, становить до 5 %. Такі композиції можна одержати з використанням умов реакції та способів очищення, відомих в даній області техніки. Наприклад, катіонообмінну хроматографію можна використовувати для поділу кон'югатів, а потім визначити фракцію, що містить кон'югат з, наприклад, бажаною кількістю приєднаних молекул ПЕГ, очистити від немодифікованих білкових послідовностей і від кон'югатів з іншою кількістю приєднаних молекул ПЕГ.

ПЕГ можна приєднати до поліпептиду відповідно до даного винаходу за рахунок кінцевої реакційноздатної групи. Кінцева реакційноздатна група може опосередковувати зв'язок між вільною аміно- або карбоксильною групою однієї або більше з поліпептидних послідовностей і поліетиленгліколем. Кінцеву реакційноздатну групу можна приєднати до поліетиленгліколевого спейсеру дискретної довжини. Ці ПЕГ-спейсери збільшують розчинність реагенту і кон'югату, мінімізують токсичні й імунологічні ефекти у порівнянні зі спейсерами, що не містять ПЕГ, і дозволяють одержати декілька варіантів конкретних дистанцій перехресного зв'язування між ПЕГ і поліпептидом. Типові ПЕГ-спейсери з реакційноздатними групами містять реакційноздатні стосовно аміногруп пегільовані перехресні лінкери (наприклад, біс(сукцинімід)пента(етиленгліколь) (BS(ПЕГ)₅)); реакційноздатні стосовно сульфгідрильних груп пегільовані перехресні лінкери (1,11-біс-малеїмідтриетиленгліколь (BM(ПЕГ)₃)); біфункціональні пегільовані перехресні лінкери (складний ефір NHS-ПЕГn-малеїмідсукцинімідил-([N-малеїмідпропіонамід]-етиленгліколь) (SM(ПЕГ)n); n=2-24). ПЕГ-спейсер можна зв'язати з вільною аміногрупою. ПЕГ-спейсери включають N-гідроксисукцинілімідполіетиленгліколь, які можна одержати шляхом активації складного ефіру бурштинової кислоти та поліетиленгліколю N-гідроксисукцинілімідом. Ще один активований поліетиленгліколь, який можна зв'язати з вільною аміногрупою, являє собою 2,4-біс-(О-метоксиполіетиленгліколь)-6-хлор-s-триазин, який можна одержати шляхом взаємодії монометилового ефіру поліетиленгліколю з ціанурхлоридом. Активований поліетиленгліколь, зв'язаний з вільною карбоксильною групою, включає поліоксіетилендіамін.

Кон'югування однієї або більше з поліпептидних послідовностей відповідно до даного винаходу з ПЕГ, що містить спейсер, можна здійснити різними відомими способами. Наприклад, реакцію кон'югування можна здійснити в розчині при pH від 5 до 10, при температурі від 4 °C до кімнатної температури, протягом часу від 30 хвилин до 20 годин, використовуючи молярне відношення реагенту до білка від 4:1 до 30:1. Можна вибрати умови реакції, що направляють реакцію в бік переважного одержання бажаного ступеня заміщення. У цілому, низька температура, низький pH (наприклад, pH = 5) і короткий час реакції, як правило, знижують кількість приєднаних молекул ПЕГ, у той час як висока температура, нейтральний або високий pH (наприклад, pH ≥ 7), а також більш тривалий час реакції, як правило, збільшують кількість приєднаних молекул ПЕГ. Для зупинки реакції можна використовувати різні засоби, відомі в даній області техніки. У деяких варіантах реалізації реакцію зупиняють шляхом підкислення реакційної суміші та заморожування, наприклад, при -20 °C.

У даному винаході також розглядається застосування імітаторів ПЕГ. Розроблені рекомбінантні імітатори ПЕГ, що зберігають властивості ПЕГ (наприклад, підвищений час напівжиття в сироватці) і при цьому надають кон'югату деякі додаткові вигідні властивості. Наприклад, прості поліпептидні ланцюги (які містять, наприклад, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser і Thr), здатні утворювати розгорнуту конформацію, аналогічну ПЕГ, можна одержати рекомбінантними способами у вже об'єднаному вигляді з досліджуваним пептидним або білковим лікарським засобом (наприклад, за допомогою технології Amunix' XTEN, Маунтін-Вью, штат Каліфорнія, США). Це усуває необхідність у додатковому етапі кон'югування у процесі виробництва. Крім того, встановлені молекулярно-біологічні методики дозволяють контролювати склад бічного ланцюга поліпептидних ланцюгів, що дозволяє оптимізувати імуногенність та виробничі властивості.

Глікозилювання: Для цілей даного винаходу мається на увазі, що "глікозилювання" у широкому змісті відноситься до ферментативного процесу приєднання гліканів з білками, ліпідами або іншими органічними молекулами. Використання терміна "глікозилювання" у сполученні з даним винаходом, як правило, означає додавання або видалення однієї або більше з вуглеводних груп (шляхом видалення основного сайту глікозилювання або шляхом усунення глікозилювання хімічними та/або ферментативними засобами), і/або додавання одного або більше сайтів глікозилювання, які можуть або не можуть бути присутніми у нативній послідовності. Крім того, ця фраза включає якісні зміни глікозилювання нативних білків, пов'язані зі зміною природи та пропорції різних присутніх вуглеводних залишків.

Глікозилювання може істотно впливати на фізичні властивості білків і може мати важливе значення для стабільності, секреції та субклітинної локалізації білка. Фактично, глікозилювання мутеїнових поліпептидів GDF15, описаних у даному документі, вигідно поліпшує їхні фізичні властивості. Як необмежуючий приклад, розчинність мутеїнів GDF15 можна поліпшити шляхом глікозилювання, і таке поліпшення може бути значним (див. розділ "Приклади"). Глікозилювані мутеїнові поліпептиди GDF15, описані у даному документі, мають більш високу розчинність у порівнянні з неглікозилюваним GDF15 дикого типу. У деяких варіантах реалізації глікозилювані мутеїни GDF15, описані у даному документі, мають розчинність щонайменше 0,5 мг/мл,

наприклад, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 20 мг/мл або щонайменше 25 мг/мл, наприклад, розчинністю в діапазоні від 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, від 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, від 1 мг/мл до 25 мг/мл, від 1 мг/мл до 20 мг/мл, від 3 мг/мл до 25 мг/мл, від 3 мг/мл до 20 мг/мл, від 5 мг/мл до 25 мг/мл, від 5 мг/мл до 20 мг/мл або від 5 мг/мл до 18 мг/мл у буферному розчині. У деяких випадках глікозильовані мутеїни GDF15, описані у даному документі, можуть мати розчинність щонайменше 0,5 мг/мл, наприклад, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2 мг/мл, щонайменше 3 мг/мл, щонайменше 4 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 20 мг/мл або щонайменше 25 мг/мл, наприклад, розчинністю в діапазоні від 0,5 мг/мл до 25 мг/мл, від 0,5 мг/мл до 20 мг/мл, від 1 мг/мл до 25 мг/мл, від 1 мг/мл до 20 мг/мл, від 3 мг/мл до 25 мг/мл, від 3 мг/мл до 20 мг/мл, від 5 мг/мл до 25 мг/мл, від 5 мг/мл до 20 мг/мл або від 5 мг/мл до 18 мг/мл у буферному розчині. Буфер може являти собою фосфатний буфер, трис-буфер, HEPES-буфер, MOPS-буфер, PIPES-буфер і тому подібне або їх комбінацію. У деяких випадках буфер може містити фізіологічний розчин з фосфатним буфером. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію та хлорид натрію. У деяких випадках буфер може містити трис, фосфат калію, хлорид натрію та мурашину кислоту. Наприклад, буфер може містити 10-100 мМ трис (pH 7), 1-50 мМ фосфату калію, 100-200 мМ хлориду натрію та 10-30 мСм/см мурашиної кислоти.

Глікозильовані мутеїнові поліпептиди GDF15, описані у даному документі, перевершують зрілий поліпептид GDF15 дикого типу. Ці глікозильовані мутеїнові поліпептиди GDF15 мають поліпшені характеристики у порівнянні зі зрілим поліпептидом GDF15 дикого типу, включаючи одне або більше з: підвищений вихід у культурі клітин, поліпшене утворення димерів, підвищену розчинність, а також знижену імуногенність, але не обмежуючись ними. Поліпшення розчинності, демонстровані такими модифікованими мутеїнами GDF15, може, наприклад, включати одержання складів, які більше підходять для фармацевтичного введення, ніж неглікозильований GDF15/мутеїни GDF15. Глікозильований GDF15/мутеїнові поліпептиди GDF15 також можуть демонструвати підвищену стабільність. Крім того, можна поліпшити одну або декілька з фармакокінетичних властивостей поліпептидів, наприклад, період напівжиття.

Додавання сайтів глікозилювання можна здійснити шляхом зміни амінокислотної послідовності, як описано вище. Зміну поліпептиду можна здійснити, наприклад, шляхом додавання або заміни одного або більше із залишків серину або треоніну (для сайтів О-зв'язаного глікозилювання) або аспарагіну (для сайтів N-зв'язаного глікозилювання). Структури N-зв'язаних і О-зв'язаних олігосахаридів і залишків вуглеводів, що знаходять при кожному типі, можуть розрізнятися. Один із вуглеводів, зазвичай присутній при обох варіантах, являє собою N-ацетилнейрамінову кислоту (далі називається сіаловою кислотою). Сіалова кислота зазвичай є кінцевим залишком як N-зв'язаних, так і О-зв'язаних олігосахаридів і, за рахунок свого негативного заряду, може надавати глікопротеїну кислотні властивості. Конкретний варіант реалізації даного винаходу включає одержання та застосування варіантів N-глікозилювання, описаних вище.

Ще одним способом збільшення кількості вуглеводних залишків у складі поліпептиду є хімічне або ферментативне приєднання глікозидів до поліпептиду.

Клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), дефіцитні за дигідрофолатредуктазою (DHFR), являють собою клітини-хазяїни, які зазвичай використовують для одержання рекомбінантних глікопротеїнів. Ці клітини не експресують фермент бета-галактозид-альфа-2,6-сіалілтрансферазу і тому не приєднують сіалову кислоту за допомогою альфа-2,6 зв'язку до N-зв'язаних олігосахаридів глікопротеїнів, продукованих у цих клітинах.

Полісіалування: У даному винаході також розглядається застосування полісіалування, кон'югування пептидів і білків із природною біорозкладаною альфа-(2→8) –зв'язаною полісіаловою кислотою ("PSA") з метою поліпшення їх стабільності та фармакокінетики *in vivo*. PSA є біорозкладаним, нетоксичним природним полімером, що має високу гідрофільність, яка надає йому значну гадану молекулярну масу в крові та підвищує його період напівжиття в сироватці. Крім того, полісіалування ряду пептидних і білкових терапевтичних засобів призвело до помітно зниженого протеолізу, збереження активності *in vivo* та зниження імуногенності й антигенних властивостей (див., наприклад, G. Gregoriadis et al., *Int. J. Pharmaceutics* 300(1-2):125-30). Як й у випадку з модифікаціями за рахунок інших кон'югатів (наприклад, ПЕГ), доступні різні методики сайт-специфічного полісіалування (див., наприклад, T. Lindhout et al., *PNAS* 108(18):7397-7402 (2011)).

Гібридні білки. У даному винаході розглядаються гібридні білки на основі зрілого GDF15 дикого типу (наприклад, GDF15 людини), а також гібридні білки на основі поліпептидів

відповідно до даного винаходу (наприклад, модифіковані молекули GDF15 людини, мутеїни GDF15 людини, модифіковані мутеїни GDF15 і тому подібне). Такі гібридні білки, як правило, містять поліпептид, що не є GDF15 (наприклад, альбумін (наприклад, ЛСА) або його фрагмент: альбумін-сполучний домен (ABD); Fc-поліпептид; мальтоз-сполучний домен (MBD), які можуть називатися у даному документі "партнером за об'єднанням", кон'юговані з поліпептидом GDF15 дикого типу або поліпептидом відповідно до даного винаходу за його N-кінцем або C-кінцем. Партнер за об'єднанням необов'язково можна кон'югувати з GDF15 дикого типу або поліпептидом за допомогою поліпептидного лінкера. Лінкерний поліпептид необов'язково може являти собою розщеплюваний лінкер, наприклад, ферментативно розщеплюваний лінкер. Приклади партнерів за об'єднанням описані нижче.

Гібриди з альбуміном: Підходящі для кон'югування партнери за об'єднанням включають альбуміни, наприклад, людський сироватковий альбумін (ЛСА), сироватковий альбумін яванської макаки та бичачий сироватковий альбумін (БСА).

Зрілий ЛСА, поліпептид довжиною 585 амінокислот (~ 67 кДа), що має період півжиття в сироватці ~ 20 днів, у першу чергу відповідає за підтримку колоїдного осмотичного тиску крові, рН крові, а також транспортування та розподіл численних ендogenous й екзогенних лігандів. Білок містить три структурно гомологічних домени (домени I, II і III), що майже повністю перебувають в альфа-спіральній конформації та жорстко стабілізовані 17 дисульфідними містками. Три основні області в складі альбуміну, що зв'язують лікарські речовини, перебувають у кожному з трьох доменів у межах піддоменів IB, IIA і IIIA.

Синтез альбуміну відбувається у печінці, що продукує короткоживучий первинний продукт препоальбумін. Таким чином, повнорозмірний ЛСА містить сигнальний пептид довжиною 18 амінокислот з наступним продомом довжиною 6 амінокислот; цей пептид довжиною 24 амінокислотних залишки можна називати препродомом. ЛСА можна експресувати та секретувати, використовуючи його ендogenousний сигнальний пептид в якості препродомена. Як альтернатива, ЛСА можна експресувати та секретувати, використовуючи сигнальний пептид IgK, об'єднаний зі зрілим ЛСА. Препоальбумін швидко розщеплюється одночасно з трансляцією у просвіті ендоплазматичного ретикулу за N-кінцем з утворенням стабільного поліпептиду-попередника довжиною 609 амінокислот, проальбуміну. Потім проальбумін транспортується в апарат Гольджі, де він перетворюється в зрілий альбумін довжиною 585 амінокислот шляхом фуринозалежного N-кінцевого розщеплення. Якщо не зазначено інше, "альбумін" або "зрілий альбумін" відноситься до ЛСА.

Первинна амінокислотна послідовність, структура та функції альбумінів є висококонсервативними серед різних видів, як і процеси синтезу та секреції альбуміну. Сироваткові альбумінові білки, порівнянні з ЛСА, виявлені, наприклад, в яванських макаків, корів, собак, кроликів і пацюків. Серед видів тварин, що не є людиною, бичачий сироватковий альбумін (БСА) найбільше структурно подібний з ЛСА. [Див., наприклад, Kosa et al., J Pharm Sci. 96(11):3117-24 (Nov 2007)]. У даному винаході розглядається застосування альбуміну видів тварин, що не є людиною, включаючи альбумін вищевикладених тварин, наприклад, у гібридах з поліпептидом GDF15, але не обмежуючись ними. У деяких варіантах реалізації вид тварини, що не є людиною, є коровою. У деяких варіантах реалізації вид тварини, що не є людиною, є яванським макаком.

Відповідно до даного винаходу, альбумін можна кон'югувати з молекулою лікарської речовини (наприклад, поліпептидом, описаним у даному документі) за C-кінцем, N-кінцем, як C-, так і N-кінцем, або внутрішньої частини (див., наприклад, USP 5876969 і USP 7056701). Крім того, у даному винаході розглядаються гібридні білки на основі альбуміну, що містять більше однієї гомологічної (наприклад, декілька молекул мутеїну GDF15) або гетерологічної (наприклад, молекулу мутеїну GDF15 й окремий антидіабетичний агент) молекули лікарської речовини.

У кон'югатах ЛСА-поліпептид, розглянутих у даному винаході, можна застосовувати різні форми альбуміну, наприклад, варіанти, наприклад, фрагменти ЛСА. Такі форми, як правило, мають одну або більше з бажаних активностей альбуміну. У додаткових варіантах реалізації даний винахід включає гібридні білки, що містять молекулу поліпептидного лікарського засобу, прямо або побічно об'єднану з альбуміном, фрагмент альбуміну та варіант альбуміну і так далі, причому гібридний білок має більш високу стабільність у плазмі, ніж негібридна молекула лікарської речовини, і/або гібридний білок зберігає терапевтичну активність негібридної молекули лікарської речовини. У деяких варіантах реалізації непряме об'єднання здійснюють за допомогою лінкера, наприклад, пептидного лінкера або його модифікованого варіанта.

ЛСА можна кон'югувати за допомогою лінкера з поліпептидом, описаним у даному документі, з утворенням гібридного білка. Приклади підходящих лінкерів описані нижче. У

деяких варіантах реалізації розглядається пептидний лінкер, наприклад, довжиною від чотирьох до тридцяти амінокислот.

У варіантах реалізації, де гібридний білок містить лінкер, зазначений лінкер може бути нерозщеплюваним лінкером. Наприклад, в одному варіанті реалізації даного винаходу описана гібридна молекула, в якій амінокислотну послідовність попередника ЛСА або зрілого ЛСА поєднують з N-кінцем амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини або мутеїну GDF15 за допомогою нерозщеплюваного (G₄S)₃ лінкера.

В інших варіантах реалізації, де гібридний білок містить лінкер, зазначений лінкер може бути розщеплюваним лінкером. Наприклад, у даному винаході розглядається гібридна молекула, в якій амінокислотну послідовність попередника ЛСА або амінокислотну послідовність зрілого ЛСА поєднують з N-кінцем амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини або мутеїну GDF15, представлені у даному документі, за допомогою протеаза-чутливого (G₄S)₂ лінкера, розщеплюваного фактором Ха.

Молекули конструктів ЛСА-розщеплюваний лінкер-зрілий рекомбінантний GDF15/мутеїн GDF15, а також гібридні молекули конструктів зрілий рекомбінантний GDF15/мутеїн GDF15-розщеплюваний лінкер-ЛСА можна використовувати для полегшення оцінки, наприклад, розчинності та визначення ефективності GDF15/мутеїну GDF15 *in vivo*. У таких варіантах реалізації GDF15/мутеїн GDF15 можна вирізати з шаперону ЛСА за допомогою внутрішньоклітинного розщеплення або за допомогою ферментативного розщеплення *in vitro*. У деяких варіантах реалізації вирізання здійснюють шляхом протеолітичного гідролізу розщеплюваного лінкера з використанням будь-якої життєздатної протеази. В інших варіантах реалізації мутеїни GDF15 також можна одержати у вигляді гібридів, що не містять ЛСА, за допомогою конструкта на основі сигнального пептиду, об'єднаного з поліпептидами, які представлені у даному документі.

Внутрішньоклітинне розщеплення можна здійснювати ферментативним шляхом, наприклад, з використанням фурину або каспази. Клітина-хазяїн, експресуюча гібридний білок, може на низькому рівні експресувати ці ендогенні ферменти, здатні розщеплювати фрагмент гібридних молекул всередині клітини; так, деякі з цих поліпептидів секретуються клітиною в некон'югованому з ЛСА вигляді, у той час як деякі з поліпептидів секретуються у вигляді гібридних молекул, що містять ЛСА. У варіантах реалізації даного винаходу розглядається застосування різних гібридних конструктів фурину. Наприклад, можна розробити конструкти, що містять послідовність RGRR (SEQ ID NO: 36), RKRRKR (SEQ ID NO: 37), RKKR (SEQ ID NO: 38) або RRRKKR (SEQ ID NO: 39). Такі конструкти можуть містити наступну загальну структуру: Igk-ЛСА-(G₄S)₂-послідовність фурину-hGDF15.

У даному винаході також розглядається позаклітинне розщеплення (наприклад, розщеплення *ex vivo*), при якому гібридні молекули виділяють з клітини, піддають очищенню, потім розщеплюють (наприклад, використовуючи, наприклад, лінкер, чутливий до протеази фактора Ха або ентерокинази). Варто розуміти, що зазначене вирізання може призвести до відщеплення від поліпептиду (наприклад, зрілого GDF15 або мутеїну GDF15) всього комплексу ЛСА-лінкер, або фрагмента меншого розміру, ніж весь комплекс ЛСА-лінкер.

Як описано вище, об'єднання альбуміну з одним або більше поліпептидами відповідно до даного винаходу можна, наприклад, здійснити за рахунок генетичної маніпуляції, так, що ДНК, яка кодує ЛСА або його фрагмент, приєднують до ДНК, яка кодує одну або більше з поліпептидних послідовностей. Після цього можна трансформувати або трансфікувати підходящого хазяїна гібридними нуклеотидними послідовностями у вигляді, наприклад, підходящіх плазмід, з метою експресії гібридного поліпептиду. Експресію можна здійснювати *in vitro*, наприклад, у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах, або *in vivo*, наприклад, в трансгенному організмі. У деяких варіантах реалізації даного винаходу експресію гібридних білків здійснюють у лініях клітин ссавців, наприклад, лініях клітин CHO. Термін "трансформація" широко використовують у даному документі для позначення генетичної модифікації клітини, виникаючої внаслідок безпосереднього поглинання, включення й експресії екзогенного генетичного матеріалу (екзогенної ДНК) з оточення клітини та через клітинну мембрану(и). Трансформація відбувається у природних умовах у деяких видів бактерій, однак її також можна здійснити штучним шляхом в інших клітинах.

Крім того, сам альбумін можна модифікувати для збільшення періоду його напівжиття в кровотоці. Об'єднання модифікованого альбуміну з одним або більше поліпептидами відповідно до даного винаходу можна здійснити шляхом генетичної маніпуляції/рекомбінантних методик, описаних вище, або хімічного кон'югування; отримана гібридна молекула має період напівжиття, що перевищує період напівжиття гібридів із немодифікованим альбуміном. (див., наприклад, WO2011/051489).

Існують налагоджені технологічні платформи для генетичного синтезу та хімічного кон'югування поліпептидів (наприклад, поліпептидів, описаних у даному документі) і рекомбінантного альбуміну. Наприклад, гнучку платформу ALBUFUSE® (Novozymes Biopharma A/S; Данія) можна застосовувати для генетичного об'єднання однієї або більше з

5 рекомбінантних молекул альбуміну з одним або більше з поліпептидів, що призводить до одержання безперервної кДНК, яка кодує поліпептид(и) й альбумін(и), для одержання єдиного гомогенного білка. Цю платформу можна використовувати, наприклад, з системами експресії на основі хазяїнів-дріжджів і ссавців. Як додатковий приклад, гнучку платформу RECOMBUMIN® (Novozymes Biopharma A/S; Данія) можна застосовувати для хімічного кон'югування

10 поліпептидів відповідно до даного винаходу з рекомбінантним альбуміном без подальшої модифікації альбуміну. Хоча кон'югування можна виконувати за декількома амінокислотними залишками (наприклад, лізину і тирозину), вільна тіолова група при Cys34 являє собою розповсюджену стратегію через сайт-специфічність, що дозволяє одержати більш однорідний кінцевий продукт.

15 Альтернативні стратегії зв'язування альбуміну: Як альтернатива прямому об'єднанню розроблено декілька стратегій зв'язування альбуміну, у тому числі зв'язування альбуміну за допомогою кон'югованого ланцюга жирної кислоти (ацилювання). Оскільки сироватковий альбумін є транспортним білком для жирних кислот, ці природні ліганди з альбумін-сполучною активністю застосовують для збільшення періоду напівжиття невеликих терапевтичних білків.

20 Наприклад, інсулін детермір (LEVEMIR), схвалений продукт для лікування діабету, містить ланцюг міристилової кислоти, кон'юговану з генетично модифікованим інсуліном, що призводить до одержання аналога інсуліну тривалої дії.

У даному винаході також розглядаються гібридні білки, що містять поліпептидну послідовність альбумін-сполучного домена (ABD) та послідовність одного або більше з

25 поліпептидів, описаних у даному документі. Будь-яка послідовність ABD-поліпептиду, описана у даному документі або в літературі, може бути одним із компонентів гібридних білків. Компоненти гібридних білків можна при необхідності ковалентно зв'язати за допомогою лінкера, наприклад, лінкерів, описаних у даному документі. У деяких варіантах реалізації даного винаходу гібридні білки містять послідовність ABD-поліпептиду у вигляді N-кінцевої групи та

30 поліпептиди, описані у даному документі, у вигляді C-кінцевої групи.

У даному винаході також розглядаються гібридні білки, що містять фрагмент альбумін-сполучного поліпептиду, причому зазначений фрагмент у значній мірі зберігає здатність до зв'язування альбуміну; або мультимер альбумін-сполучних поліпептидів або їх фрагментів, що містить щонайменше два альбумін-сполучні поліпептиди або їх фрагмент в якості мономерних

35 одиниць.

Безвідносно до якої-небудь конкретної теорії, вважається, що поліпептиди, описані у даному документі, зв'язуються з послідовністю ABD-поліпептиду, тим самим секвеструючи поліпептиди в організмі суб'єкта, що призводить до збільшення тривалості дії в організмі суб'єкта.

Загальне обговорення ABD і пов'язаних з ними технологій див. у WO 2012/050923, WO 2012/050930, WO 2012/004384 і WO 2009/016043.

40

Гібридні білки, що містять мальтоза-сполучні білки або їх фрагменти: У даному винаході також розглядаються гібридні білки, що містять мальтоза-сполучний білок (MBP) або його фрагмент й амінокислотну послідовність одного або більше з поліпептидів, описаних у даному документі. У деяких варіантах реалізації фрагмент MBP містить мальтоза-сполучний домен (MBD).

45 Будь-яка послідовність MBP або його фрагмента або MBD-поліпептиду, описана у даному документі або в літературі, може бути одним із компонентів гібридних білків відповідно до даного винаходу. Компоненти гібридних білків можна при необхідності ковалентно зв'язати за допомогою лінкера, наприклад, лінкерів, описаних у даному документі. У деяких варіантах реалізації даного винаходу гібридні білки містять послідовність MBP або його фрагмент або

50 послідовність MBD-поліпептиду у вигляді N-кінцевої групи та поліпептиди, описані у даному документі, у вигляді C-кінцевої групи.

У даному винаході також розглядаються гібридні білки, що містять фрагмент MBP або MBD-поліпептиду, причому зазначений фрагмент у значній мірі зберігає мальтоза-сполучну активність; або мультимер мальтоза-сполучних поліпептидів або їх фрагментів (наприклад, мультимер MBD), що містить щонайменше два мальтоза-сполучні поліпептиди або їх фрагмент в якості мономерних одиниць (наприклад, два або більше MBD-поліпептиди).

55

Загальне обговорення MBP і MBD, і пов'язаних з ними технологій див., наприклад, у роботі Kapust et al. (1999) Protein Sci 8(8):1668-74.

Fc-гібридні білки. У даному винаході також розглядаються гібридні білки, що містять Fc-поліпептид або його фрагмент й амінокислотну послідовність одного або більше з поліпептидів,

60

описаних у даному документі (наприклад, молекули GDF15 людини, модифіковані молекули GDF15 людини, мутеїни GDF15 і модифіковані мутеїни GDF15). Будь-яка послідовність Fc-поліпептиду, описана у даному документі або в літературі, може бути одним із компонентів гібридних білків відповідно до даного винаходу. Компоненти гібридних білків можна при
 5 необхідності ковалентно зв'язати за допомогою лінкера, наприклад, лінкерів, описаних у даному документі. У деяких варіантах реалізації даного винаходу гібридні білки містять послідовність Fc-поліпептиду у вигляді N-кінцевої групи та поліпептиди, описані у даному документі, у вигляді C-кінцевої групи.

У даному винаході також розглядаються партнери з об'єднання Fc-поліпептиду та гібридні
 10 білки, що містять такі молекули, де партнер з об'єднання Fc-поліпептиду модифікований і є одним із партнерів зарядженої пари Fc. "Партнер зарядженої пари Fc" відноситься до (i) "негативно зарядженої" Fc-послідовності (з необов'язково відсутньою шарнірною областю), що містить мутацію зарядової пари або (ii) "позитивно зарядженої" Fc-послідовності (з необов'язково відсутньою шарнірною областю), що містить мутацію зарядової пари. Терміни
 15 "позитивно заряджений" і "негативно заряджений" використовуються у даному документі для зручності опису природи мутації зарядової пари у послідовностях Fc, а не для вказівки, що послідовність або конструкт у цілому обов'язково має позитивний або негативний заряд. Амінокислотні послідовності зарядженого Fc, придатні для використання в конструктах поліпептиду (наприклад, мутеїну GDF15, модифікованих мутеїнів GDF15) відповідно до даного
 20 винаходу описані у, наприклад, WO 2013/113008.

Приклади позитивно зарядженого Fc ("Fc(+)") включають Fc, що містить мутацію заміни аспарагінової кислоти на лізин (E356K) і мутацію заміни глутамінової кислоти на лізин (D399K) Fc-послідовності з відсутньою шарнірною областю. Приклади негативно зарядженого Fc ("Fc(-)")
 25 включають Fc, що містить дві мутації заміни лізину на аспартат (K392D, K409D) у Fc-послідовності з відсутньою шарнірною областю. C-кінцевий лізин (K477) також можна необов'язково видалити. При спільному інкубуванні гібридного білка на основі Fc(+)-поліпептиду (наприклад, гібридного білка Fc(+)-мутеїн GDF15) і гібридного білка на основі Fc(-)-поліпептиду (наприклад, гібридного білка Fc(-)-мутеїн GDF15) залишки аспартату асоціюють із залишками лізину за допомогою електростатичних сил, що полегшує утворення Fc-гетеродимерів між Fc(+)
 30 і Fc(-)-послідовностями гібридних білків на основі поліпептиду GDF15.

У даному винаході також розглядаються конструкти, які називаються конструктами "гемі" або "гемі-Fc", що містять дві Fc-послідовності, з'єднані тандемом за допомогою лінкера, що з'єднує N-кінець першої Fc-послідовності з C-кінцем другої Fc-послідовності. У деяких варіантах
 35 реалізації мономер містить послідовність поліпептиду (наприклад, зрілого модифікованого GDF15 або мутеїну GDF15), пов'язану з першою послідовністю Fc за допомогою першого лінкера, що з'єднує N-кінець послідовності GDF15 з C-кінцем першої Fc-послідовності, причому перша Fc-послідовність з'єднана з другою послідовністю Fc за допомогою другого лінкера, що з'єднує N-кінець першої Fc-послідовності з C-кінцем другої Fc-послідовності. Перша та друга Fc-послідовності також зв'язані за допомогою шарнірних областей Fc. Два таких мономер
 40 асоціюють, утворюючи димер, у якому мономер зв'язані за допомогою міжланцюгового дисульфідного зв'язку між двома послідовностями поліпептиду. Приклади гемі-Fc-поліпептидів, придатні для використання з мутеїнами GDF15 відповідно до даного винаходу, див. у WO 2013/113008.

У даному винаході також розглядаються гібридні білки, що містять мультимер Fc-поліпептидів або їх фрагментів, включаючи партнер зарядженої пари Fc (наприклад, мультимер Fc).

Кон'югування з іншими молекулами: Додаткові підходящі для кон'югації компоненти та молекули включають, наприклад, тиреоглобулін; анатоксин правця; дифтерійний анатоксин; поліамінокислоти, такі як полі (D-лізин: D-глутамінова кислота); поліпептиди VP6 ротавірусів;
 50 гемаглютинін вірусу грипу, нуклеопротеїд вірусу грипу; Гемоціанін Лімфи Равлика (ГЛР); і білок ядра вірусу гепатиту В і поверхневий антиген; або будь-яку комбінацію перераховану вище.

Таким чином, у даному винаході розглядається кон'югування одного або більше з додаткових компонентів або молекул за N- і/або C-кінцем поліпептидної послідовності, наприклад, ще одного білка (наприклад, білка, що містить амінокислотну послідовність,
 55 гетерологічну стосовно білка суб'єкта) або молекули-носія. Таким чином, зразкова поліпептидна послідовність може бути представлена у вигляді кон'югату з іншим компонентом або молекулою.

Кон'югатна модифікація може призвести до одержання поліпептидної послідовності, що зберігає активність додаткової або комплементарної функції або активності другої молекули.
 60 Наприклад, поліпептидну послідовність можна кон'югувати з молекулою, наприклад, для

полегшення розчинності, зберігання, періоду напівжиття або стабільності *in vivo* або при зберіганні, зниженні імуногенності, уповільненого або контрольованого вивільнення *in vivo* і так далі. Інші функції або активності включають кон'югат із зниженою токсичністю у порівнянні з некон'югованою поліпептидною послідовністю, кон'югат, який адресно впливає на клітини певного типу або орган, з більшою ефективністю, ніж некон'югована поліпептидна послідовність, або лікарська речовина для наступної протидії причинам або ефектам, асоційованим з розладом або захворюванням, викладеними у даному документі (наприклад, діабетом).

Поліпептид можна також кон'югувати з великими, повільно метаболізованими макромолекулами, наприклад, білками; полісахаридами, наприклад, сефарозою, агарозою, целюлозою, гранулами целюлози; полімерними амінокислотами, наприклад, поліглутаміновою кислотою, полілізином; співполімерами амінокислот; інактивованими вірусними частинками; інактивованими бактеріальними токсинами, наприклад, анатоксинами дифтерії, правця, холери, молекулами лейкотоксинів; інактивованими бактеріями; і дендритними клітинами. Такі кон'юговані форми при бажанні можна використовувати для одержання антитіл проти поліпептиду відповідно до даного винаходу.

Додаткові кандидати-компоненти та молекули для кон'югування включають молекули, які підходять для виділення або очищення. Конкретні необмежуючі приклади включають сполучні молекули, наприклад, біотин (специфічна сполучна пара біотин-авідин), антитіло, рецептор, ліганд, лектин або молекули, що містять твердий носій, у тому числі, наприклад, пластикові або полістиролові гранули, планшети або гранули, магнітні гранули, тест-смужки та мембрани.

Для поділу кон'югатів за різницею заряду можна використовувати такі способи очищення, як катіонообмінну хроматографію, що ефективно розділяє кон'югати різної молекулярної маси. Наприклад, можна завантажити катіонообмінну колонку, промити її ~ 20 mM ацетатом натрію, pH ~ 4, а потім елювати лінійним (0-0,5 M) градієнтом NaCl, забуференого при pH від 3 до 5,5, наприклад, при pH ~ 4,5. Вміст фракцій, отриманих при катіонообмінній хроматографії, можна ідентифікувати за молекулярною масою з використанням звичайних способів, наприклад, мас-спектроскопії, електрофорезу в ДСН-ПААГ або інших відомих способів поділу молекулярних структур за молекулярною масою.

Інші Модифікації: У даному винаході розглядається застосування інших модифікацій поліпептидів, відомих у цей час або розроблювальних у майбутньому, з метою поліпшення однієї або більше властивостей. Одним із таких способів збільшення періоду напівжиття в кровотоці, підвищення стабільності, зниження кліренсу або зміни імуногенності або алергенності поліпептиду відповідно до даного винаходу включає модифікацію поліпептидних послідовностей за допомогою ГЕК, при якій використовують похідні гідроксietилкрохмалю, пов'язані з іншими молекулами, для зміни характеристик молекули. Різні аспекти модифікації за допомогою ГЕК описані, наприклад, у патентних заявках США № 2007/0134197 і 2006/0258607.

У даному винаході також розглядаються гібридні молекули, що містять SUMO як маркер об'єднання (LifeSensors, Inc.; Малверн, штат Пенсильванія, США). Об'єднання поліпептиду, описаного у даному документі, з SUMO може додати поліпептиду ряд вигідних властивостей, включаючи посилення експресії, поліпшення розчинності та/або сприяння при розробці способів очищення. SUMO-протеази розпізнають третинну структуру SUMO та розщеплюють гібридний білок за С-кінцем SUMO, тим самим вивільняючи поліпептид, описаний у даному документі, що містить бажану N-кінцеву амінокислоту.

Лінкери: Будь-який з вищевказаних компонентів і молекул, які використовують для зміни поліпептидних послідовностей відповідно до даного винаходу, при необхідності можна кон'югувати за допомогою лінкера. Підходящі лінкери включають "гнучкі лінкери", які, як правило, мають достатню довжину, що забезпечує деякий рух модифікованих поліпептидних послідовностей і зв'язаних компонентів і молекул. Довжина лінкерних молекул може становити приблизно 6-50 атомів. Лінкерні молекули можуть також являти собою, наприклад, арилацетилен, олігомери етиленгліколю, що містять 2-10 мономерних одиниць, діаміни, диікислоти, амінокислоти або їх комбінації. Підходящі лінкери легко вибрати; вони можуть мати будь-яку підходящу довжину, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 амінокислот.

Типові гнучкі лінкери включають полімери гліцину ($(G)_n$), полімери гліцину-аланіну, полімери аланіну-серину, полімери гліцину-серину (наприклад, $(G_mS_o)_n$, $(GSGGS)_n$, $(G_mS_oG_m)_n$, $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$, $(GSGGS_m)_n$, $(GSGS_m)_n$ і $(GGGS_m)_n$, та їх комбінації, де кожний з коефіцієнтів m , n і o незалежно вибрані з цілих чисел від 1 до 20, наприклад, 1-18, 2-16, 3-14, 4-12, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10) та інші гнучкі лінкери. Полімери гліцину та гліцин-серину є відносно неструктурованими, і, отже, можуть служити як нейтральний трос між компонентами. Типові

гнучкі лінкери включають GGSG, GGSGG, GSGSG, GSGGG, GGGSG і GSSSG, але не обмежуються ними.

Додаткові гнучкі лінкери включають полімери гліцину (G)_n або полімери гліцину-серину (наприклад, (GS)_n, (GSGG)_n, (GGGS)_n і (GGGG)_n, де n = від 1 до 50, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50). Типові гнучкі лінкери включають GGSG (SEQ ID NO: 40), GGGG (SEQ ID NO: 41), GGSG (SEQ ID NO: 42), GGSGG (SEQ ID NO: 43), GSGSG (SEQ ID NO: 44), GSGGG (SEQ ID NO: 45), GGGSG (SEQ ID NO: 46) і GSSSG (SEQ ID NO: 47). Мультимер (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 або 30-50) зазначених лінкерних послідовностей можна зв'язати один з одним, одержуючи гнучкі лінкери, які можна застосовувати для кон'югування гетерологічної амінокислотної послідовності з поліпептидами, описаними у даному документі. Як описано у даному документі, гетерологічна амінокислотна послідовність може являти собою сигнальну послідовність та/або партнер за об'єднанням, наприклад, альбумін, Fc-послідовність і тому подібне.

Приклади лінкерів включають, наприклад, (GGGG)_n, де n — ціле число від 1 до 10 (наприклад, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10); GGGSGGGSIEGR (SEQ ID NO: 48); GGGGG (SEQ ID NO: 49); EGGGS (SEQ ID NO: 50).

У деяких випадках лінкер може являти собою розщеплюваний лінкер, наприклад, ферментативно розщеплюваний лінкер. В інших випадках лінкер може являти собою не розщеплюваний лінкер, наприклад, лінкер, що не піддається ферментативному розщепленню при нормальних фізіологічних умовах *in vivo*.

Наприклад, протеолітично розщеплюваний лінкер може включати сайт розщеплення металопротеїнази матриксу (MMP), наприклад, сайт розщеплення MMP, вибраної з колагенази-1, -2 і -3 (MMP-1, -8 і -13), желатинази А і В (MMP-2 і 9), стромелізину 1, 2 і 3 (MMP-3, -10 і -11), матрилізину (MMP-7) і мембранних металопротеїназ (MT1-MMP і MT2-MMP). Послідовність розщеплення MMP-9 являє собою Pro-X-X-Hy (де X являє собою довільний залишок; Hy - гідрофобний залишок) (SEQ ID NO: 51), наприклад, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (SEQ ID NO: 52), наприклад, Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 53) або Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 54). Ще один приклад сайту розщеплення протеази являє собою сайт розщеплення активатора плазміногену, наприклад, активатора плазміногену урокіназного типу (uPA) або сайт розщеплення тканинного активатора плазміногену (tPA). Конкретні приклади послідовностей розщеплення uPA і tPA включають послідовності, що містять Val-Gly-Arg. Ще одним прикладом є сайт розщеплення тромбіну, наприклад, CGLVPAGSGP (SEQ ID NO: 55). Додаткові підходящі лінкери, що містять сайти розщеплення протеаз, включають лінкери, що містять одну або більше з наступних амінокислотних послідовностей: 1) SLLKSRMVPNFN (SEQ ID NO: 56) або SLLIARRMPNFN (SEQ ID NO: 57), розщеплювані катепсином В; SKLVQASASGVN (SEQ ID NO: 58) або SSYLKASDAPDN (SEQ ID NO: 59), розщеплювані протеазою вірусу Епштейна-Барр; RPKPQQFFGLMN (SEQ ID NO: 60), розщеплювані MMP-3 (стромелізином); SLRPLALWRSFN (SEQ ID NO: 61), розщеплювані MMP-7 (матрилізином); SPQGIAGQRNFN (SEQ ID NO: 62), розщеплювані MMP-9; DVDERDVRGFASFL (SEQ ID NO: 63), розщеплювані термолізин-подібною MMP; SLPLGLWAPNFN (SEQ ID NO: 64), розщеплювані металопротеїназою матриксу 2 (MMP-2); SLLIFRSWANFN (SEQ ID NO: 65), розщеплювані катепсином L; SGVVIATVIVIT (SEQ ID NO: 66), розщеплювані катепсином D; SLGPQGIWGQFN (SEQ ID NO: 67), розщеплювані металопротеїназою матриксу 1 (MMP-1); KKSPGRVVGGSV (SEQ ID NO: 68), розщеплювані активатором плазміногену урокіназного типу; PQGLLGAPGILG (SEQ ID NO: 69), розщеплювані металопротеїназою матриксу 1 мембранного типу (MT-MMP); HGPEGLRVGFYESDVMGRGHARLVHVEEPHT (SEQ ID NO: 70), розщеплювані стромелізином 3 (або MMP-11), термолізином, колагеназою фібробластів і стромелізином-1; GPQGLAGQRGIV (SEQ ID NO: 71), розщеплювані металопротеїназою матриксу 13 (колагеназою-3); GGGSGRGRKALE (SEQ ID NO: 72), розщеплювані активатором плазміногену тканинного типу (tPA); SLSALLSSDIFN (SEQ ID NO: 73), розщеплювані простатоспецифічним антигеном людини; SLPRFKIIGGFN (SEQ ID NO: 74), розщеплювані калікреїном (hK3); SLLGIAVPGNFN (SEQ ID NO: 75), розщеплювані еластазою нейтрофілів; і FFKNIVTPRTPP (SEQ ID NO: 76), розщеплювані калпаїном (кальцій-активованою нейтральною протеазою).

На фігурі 3 зображена амінокислотна послідовність двох гібридних білків M1 (SEQ ID NO: 77) і M2 (SEQ ID NO: 78), розглянутих у даному документі. Гібридний білок M1 містить від N-кінця до C-кінця: сигнальну послідовність IgK (нижній регістр), об'єднану з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднану з лінкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (підкреслений шрифт) на N-кінці зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт). Гібридний білок M2 містить від N-кінця до C-кінця: сигнальну послідовність IgK (нижній регістр), об'єднану з амінокислотною послідовністю ЛСА,

об'єднану з лінкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (підкреслений шрифт) на N-кінці зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт), що містить делецію 3 амінокислот (ΔARN).

На фігурі 5 зображена амінокислотна послідовність двох гібридних білків M3 (SEQ ID NO: 79) і M4 (SEQ ID NO: 80), розглянутих у даному документі. Гібридний білок M3 містить від N-кінця до C-кінця: сигнальну послідовність IgK (нижній регістр), об'єднану з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднану з лінкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (підкреслений шрифт) на N-кінці амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт), що містить делецію 3 амінокислот (позначені як Δ ARN або Δ N3). Гібридний білок M4 містить від N-кінця до C-кінця: сигнальну послідовність IgK (нижній регістр), об'єднану з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднану з лінкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅ (підкреслений шрифт) на N-кінці амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт), вкорочену на 6 амінокислот (ΔARNGDH) у порівнянні з N-кінцем зрілого hGDF15.

У даному винаході також розглядаються рекомбінантні нуклеотидні послідовності, кодуєчі послідовності, поліпептиди та димери, описані у даному документі. У деяких варіантах реалізації рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що містить безперервну амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичну амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, причому зазначена безперервна амінокислотна послідовність містить щонайменше одну з наступних пар заміни у порівнянні з відповідними амінокислотами у послідовності SEQ ID NO: 1:

- i) D5T і R21N або D5S і R21N;
- ii) R16N і H18T або R16N і H18S;
- iii) S23N і E25T або S23N і E25S;
- iv) S50N і F52T; S50N і F52S; F52N і A54T; або F52N і A54S;
- vi) Q51N і R53T; Q51N і R53S; R53N і A55T; або R53N і A55S;
- vi) S64N і H66T; або S64N і H66S;
- vii) K91N і D93T; K91N і D93S; D93N і G95T; або D93N і G95S;
- viii) T94N і V96T; T94N і V96S; V96N і L98T; або V96N і L98S;
- ix) S97N і Q99T; або S97N і Q99S; і
- x) A106N і D108T або A106N і D108S;

де заміна створює один або більше консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилювання, що містить послідовність NXS/T, де N являє собою Asn; X - будь-яка амінокислота, крім проліну, після якої перебуває Ser (S) або Thr (T), і, крім того, один або більше з консенсусних сайтів N-зв'язаного глікозилювання при експресії зв'язані з N-гліканом. У додатковому варіанті реалізації рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що при експресії утворює димер. У додатковому варіанті реалізації рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид, вкорочений за N-кінцем і/або C-кінцем у порівнянні з SEQ ID NO: 1. Поліпептид може бути вкорочений на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або більше амінокислот у порівнянні з еталонним поліпептидом, наприклад, SEQ ID NO: 1. У конкретному варіанті реалізації рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид, вкорочений на перші три N-кінцевих залишки GDF15 (ΔARN або ΔN3). У конкретних варіантах реалізації даного винаходу розглядаються рекомбінантні молекули нуклеїнових кислот, які кодують поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 30 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 5 амінокислот; причому зазначений поліпептид при експресії містить щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозильованим. У конкретних варіантах реалізації даного винаходу розглядаються рекомбінантні молекули нуклеїнових кислот, які кодують поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 або SEQ ID NO: 30 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 5 амінокислот; причому зазначений поліпептид при експресії містить щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозильованим. У конкретних варіантах реалізації рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 або SEQ ID NO: 100 або амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 5 амінокислот; причому зазначений поліпептид при експресії містить щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозильованим. У конкретних варіантах реалізації рекомбінантна нуклеїнова кислота кодує поліпептид, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 або SEQ ID NO: 100 або

амінокислотної послідовності, яка відрізняється від них не більше ніж на 5 амінокислот; причому зазначений поліпептид при експресії містить щонайменше один сайт N-глікозилювання, що є N-глікозильованим. У даному винаході також розглядається спосіб одержання модифікованого N-глікозильованого гомодимера GDF15, що включає етап експресії вищеописаної рекомбінантної нуклеїнової кислоти в клітині ссавця, наприклад, клітині CHO. Даний винахід також включає модифікований N-глікозильований гомодимер GDF15, отриманий вищеописаним способом.

На доповнення до специфічних амінокислотних і нуклеотидних послідовностей, запропонованих у даному документі, у винаході також розглядаються поліпептиди та нуклеїнові кислоти, що містять послідовності, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичні зазначеним амінокислотним і нуклеотидним послідовностям. Терміни "ідентичний" або відсоток "ідентичності" у контексті двох або більше поліпептидних послідовностей або двох або більше амінокислотних послідовностей відносяться до двох або більше послідовностей або підпослідовностей, які є однаковими або містять певний відсоток амінокислотних залишків або нуклеотидів, що є однаковими (наприклад, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 % або щонайменше на 95 % ідентичні в межах заданої області) при порівнянні та вирівнюванні з урахуванням максимальної відповідності в заданій області. У даному винаході особливо розглядаються поліпептиди, що містять амінокислотні послідовності, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 96 %, щонайменше на 97 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентичні амінокислотній послідовності SEQ ID NO. 2-35 або 77-97.

Способи одержання поліпептидів

Поліпептид відповідно до даного винаходу можна одержати будь-яким підходящим способом, у тому числі з використанням рекомбінантних і нереконбінантних способів (наприклад, хімічного синтезу).

A. Хімічний синтез

Якщо поліпептид є хімічно синтезованим, синтез може йти в рідкій або твердій фазі. Твердофазний синтез пептидів (SPPS) дозволяє включати неприродні амінокислоти та/або модифікації каркаса пептиду/білка. Для синтезу поліпептидів відповідно до даного винаходу доступні різні форми SPPS, наприклад, Fmoc і Boc. Докладна інформація про хімічний синтез відома в даній області техніки (наприклад, Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10; i Camarero J.A. et al., 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8).

Твердофазний синтез пептидів можна виконати, як описано нижче. Альфа-функціональні групи ($N\alpha$), а також реакційноздатні бічні ланцюги захищають кислотно-лабільними або основно-лабільними групами. Захисні групи стабільні в умовах для зв'язування амідних зв'язків, але можуть легко розщеплюватися, не впливаючи на утворений пептидний ланцюг. Підходящі захисні групи для α -аміногруп включають: трет-бутилоксикарбоніл (Boc), бензилоксикарбоніл (Z), o-хлорбензилоксикарбоніл, біфенілізопропілоксикарбоніл, трет-амілоксикарбоніл (AMOC), α, α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбоніл, o-нітросульфеніл, 2-ціан-трет-бутоксикарбоніл, 9-флуоренілметоксикарбоніл (Fmoc), 1-(4,4-диметил-2,6-діоксоциклогекс-1-иліден)етил (Dde) і тому подібне, але не обмежуються ними.

Підходящі захисні групи для бічних ланцюгів включають: ацетил, аліл (All), алілоксикарбоніл (Alloc), бензил (Bzl), бензилоксикарбоніл (Z), трет-бутилоксикарбоніл (Boc), бензилоксиметил (Bom), o-бромбензилоксикарбоніл, трет-бутил (tBu), трет-бутилдиметилсиліл, 2-хлорбензил, 2-хлорбензилоксикарбоніл (2-ClZ), 2,6-дихлорбензил, циклогексил, циклопентил, 1-(4,4-диметил-2,6-діоксоциклогекс-1-иліден)етил (Dde), ізопропіл, 4-метокси-2,3,6-триметилбензилсульфоніл (Mtr), 2,3,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфоніл (Pmc), піваліл, тетрагідропіран-2 -іл, тозил (Tos), 2,4,6-триметоксибензил, триметилсиліл і тритил (Trt), але не обмежуються ними.

При твердофазному синтезі C-кінцева амінокислота приєднана до підходящого матеріалу носія. Підходящими матеріалами носія є матеріали, інертні стосовно реагентів й умов реакцій ступеневої конденсації та розщеплення у процесі синтезу, і нерозчинні у використовуваному реакційному середовищі. Приклади доступних для придбання матеріалів носія включають співполімери стирол/дивінілбензолу, модифіковані реакційноздатними групами та/або поліетиленгліколем; хлорметиловані співполімери стиролу/дивінілбензолу; гідроксиметиловані або амінометиловані співполімери стиролу/дивінілбензолу і т.п. Можна використовувати полістирол (1 %)-дивінілбензол або TentaGel®, модифіковані 4-бензилоксибензиловим спиртом (смола Ванга) або 2-хлортритилхлоридом, якщо необхідно одержати пептидну кислоту. У випадку пептидного амідного зв'язку можна використовувати полістирол (1 %)-дивінілбензол або TentaGel®, модифіковані 5-(4'-амінометил)-3',5'-диметоксифеноксид валеріановою кислотою (смола PAL) або p-(2,4-диметоксифеніламінометил)-феноксигрупою (амідна смола Рінка).

Зв'язок з полімерним носієм можна одержати за допомогою реакції С-кінцевої Fmoc-захищеної амінокислоти з матеріалом носія з додаванням активуючого реагенту в етанолі, ацетонітрилі, N, N-диметилформаміді (ДМФ), дихлорметані, тетрагідрофурані, N-метилпіролідоні або аналогічних розчинниках при кімнатній температурі або підвищених температурах (наприклад, між 40 і 60 °C) і при часі реакції, наприклад, від 2 до 72 годин.

Приєднання Nα-захищеної амінокислоти (наприклад, Fmoc-амінокислоти) до смоли PAL, Ванка або Рінка можна, наприклад, здійснити з використанням приєднуючих реагентів, наприклад, N, N'-дициклогексилкарбодііміду (DCC), N, N'-діізопропілкарбодііміду (DIC), або інших карбодіімідів, тетрафторборату 2-(1H-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію (TBTU) або інших солей уронію, о-ацилсечовини, гексафторфосфату бензотриазол-1-іл-триспіролідинфосфонію (PyBOP) або інших солей фосфонію, N-гідроксисукцинімідів, інших N-гідроксіімідів або оксимів у присутності або за відсутності 1-гідроксибензотриазолу або 1-гідроксі-7-азабензотриазолу, наприклад, з використанням TBTU з додаванням гідроксибензотриазолу (HOBt), з додаванням або без додавання основи, наприклад, діізопропілетиламіну (DIEA), триетиламіну або N-метилморфоліну, наприклад, діізопропілетиламіну, з часом реакції від 2 до 72 годин (наприклад, 3 години при 1,5-3-кратному надлишку амінокислоти та приєднуючих реагентів, наприклад, при 2-кратному надлишку та при температурі між приблизно 10 і 50 °C, наприклад, 25 °C у розчиннику, наприклад, диметилформаміді, N-метилпіролідоні або дихлорметані, наприклад, диметилформаміді).

Замість приєднуючих реагентів також можна використовувати активні складні ефіри (наприклад, пентафторфеніловий, п-нітрофеніловий і тому подібні), симетричний ангідрид Nα-Fmoc-амінокислоти, його кислий хлорид або кислий фторид при умовах, описаних вище.

Nα-захищені амінокислоти (наприклад, Fmoc-амінокислоти) можна приєднати до 2-хлортритильної смоли в дихлорметані з додаванням DIEA при часі реакції від 10 до 120 хв, наприклад, 20 хвилин, але не обмежуючись використанням цього розчинника та цієї основи.

Послідовне зв'язування захищених амінокислот може бути здійснене відповідно до стандартних методів синтезу пептидів, як правило, в автоматичному синтезаторі пептидів. Після відщеплення Nα-Fmoc-захисної групи приєднаної амінокислоти на твердій фазі шляхом обробки, наприклад, піперидином (10-50 %) у диметилформаміді протягом від 5 до 20 хвилин, наприклад, 2 × 2 хвилин з використанням 50 % піперидину в ДМФ і 1 × 15 хв з використанням 20 % піперидину в ДМФ, наступну захищену амінокислоту при 3-10-кратному надлишку, наприклад, при 10-кратному надлишку, приєднують до попередньої амінокислоти в інертному неводному полярному розчиннику, наприклад, дихлорметані, ДМФ або їх суміші та при температурі між приблизно 10 і 50 °C, наприклад, при 25 °C. Раніше згадані реагенти для приєднання першої Nα-Fmoc амінокислоти до смоли PAL, Ванга або Рінка, підходять для використання в якості приєднуючих реагентів. Крім того, як альтернативу можна використовувати активні складні ефіри або хлориди, або фториди, або симетричні ангідриди захищеної амінокислоти.

В кінці твердофазного синтезу пептид відщеплюють від матеріалу носія, одночасно відщеплюючи захисні групи бічних ланцюгів. Відщеплення можна здійснювати з використанням трифтороцтової кислоти або іншого сильно кислого середовища з додаванням 5-20 об. % акцепторів, наприклад, диметилсульфіду, етилметилсульфіду, тіоанізолу, тіокрезолу, м-крезолу, анізолу, етандитіолу, фенолу або води, наприклад, 15 об. % диметилсульфіду/ етандитіолу/м-крезолу (1:1:1), протягом від 0,5 до 3 годин, наприклад, 2 годин. Пептиди з повністю захищеними бічними ланцюгами одержують відщепленням 2-хлортритильної смоли крижаною оцтовою кислотою/ трифторетанолом/ дихлорметаном (2:2:6). Захищений пептид можна очистити хроматографією на силікагелі. Якщо пептид зв'язаний з твердою фазою за допомогою смоли Ванга й якщо потрібно одержати пептид із С-кінцевим алкіламідуванням, відщеплення можна здійснити шляхом амінолізу алкіламіном або фторалкіламіном. Аміноліз виконують при температурі від приблизно -10 °C до 50 °C (наприклад, приблизно 25 °C), і при часі реакції між приблизно 12 і 24 годинами (наприклад, приблизно 18 годин). Крім того, пептид можна відщепити від носія шляхом переетерифікації, наприклад, з метанолом.

Одержуваний кислий розчин можна змішати з 3-20-кратною кількістю холодного ефіру або н-гексану, наприклад, 10-кратним надлишком діетилового ефіру для осадження пептиду і, отже, відділення акцепторів і відщеплених захисних груп, що залишалися в ефірі. Подальше очищення можна здійснити шляхом багаторазового повторного осадження пептиду з крижаної оцтової кислоти. Отриманий осад можна ресуспендувати у воді або трет-бутанолі або суміші цих двох розчинників, наприклад, 1:1 суміші трет-бутанол/вода, і піддавати сублімаційному сушінню.

Отриманий пептид можна очистити за допомогою різних хроматографічних методик, у тому числі іонообмінної хроматографії зі слабоосновною смолою у формі ацетату; гідрофобної адсорбційної хроматографії на немодифікованих співполімерах полістиролу/дивінілбензолу (наприклад, Amberlite® XAD); адсорбційної хроматографії на силікагелі; іонообмінної хроматографії, наприклад, на карбоксиметилцелюлозі; розподільної хроматографії, наприклад, на Sephadex® G-25; протиточної розподільної хроматографії; або рідинної хроматографії високого тиску (PXBT), наприклад, зворотньо-фазної ВЕРХ на октиловій або октадецилсилікремнеземній (ODS) фазах.

В. Рекombінантна продукція

При одержанні поліпептиду з використанням рекombінантних методик поліпептид можна одержати у вигляді внутрішньоклітинного білка або секретованого білка з використанням будь-якого підходящого конструкта та будь-якої підходящої клітини-хазяїна, що може бути прокаріотичною або еукаріотичною клітиною, наприклад, бактеріальною (наприклад, E.coli) або дріжджовою клітиною-хазяїном, відповідно. Інші приклади еукаріотичних клітин, які можна використовувати як клітини-хазяїни, включають клітини комах, клітини ссавців і/або клітини рослин. При використанні клітин-хазяїнів ссавців вони можуть включати клітини людини (наприклад, клітини HeLa, 293, H9 і Jurkat); клітини миші (наприклад, NIH3T3, L-клітини і клітини C127); клітини приматів (наприклад, Cos 1, Cos 7 і CV1) і клітини хом'яка (наприклад, клітини яєчника китайського хом'яка (CHO)). У конкретних варіантах реалізації поліпептид продукують у клітинах CHO. В інших варіантах реалізації поліпептид продукують у клітинах дріжджів, і у конкретних варіантах реалізації за допомогою генної інженерії можна одержати клітини дріжджів, які продукують глікопротеїни з N-гліканами, аналогічними N-гліканам ссавців.

Різні системи хазяїн-вектор, придатні для експресії поліпептиду, можна використовувати згідно зі стандартними процедурами, відомими в даній області техніки. Див., наприклад, Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; і Ausubel et al. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons. Способи введення генетичного матеріалу в клітини-хазяїни містять в собі, наприклад, трансформацію, електропорацію, кон'югацію, методи з використанням фосфату кальцію та інші. Можна вибрати спосіб переносу, який забезпечує стабільну експресію введеної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид. Нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид, можна представити у вигляді наслідуваного епісомального елемента (наприклад, плазміди), або можна інтегрувати в геном. Доступні для придбання різні вектори, що підходять для використання при продукції досліджуваного поліпептиду.

Вектори можуть забезпечити екстрахромосомну підтримку в клітині-хазяїні або інтеграцію в геном клітини-хазяїна. Експресуючий вектор містить регуляторні послідовності транскрипції та трансляції, і може забезпечити індукцибельну або конститутивну експресію, причому кодуюча область функціонально зв'язана з ними та перебуває під транскрипційним контролем області ініціації транскрипції, а також області термінації транскрипції та трансляції. У цілому, регуляторні послідовності транскрипції та трансляції можуть включати послідовності промоторів, сайти зв'язування рибосом, послідовності ініціації та припинення транскрипції, послідовності ініціації та припинення трансляції, і послідовності енхансерів або активаторів. Промотори можуть бути конститутивними або індукцибельними, і можуть являти собою сильний конститутивний промотор (наприклад, T7).

Експресуючі конструкти зазвичай містять зручні сайти рестрикції, розташовані поблизу послідовності промотору з метою забезпечити інсерцію нуклеотидних послідовностей, що кодують досліджувані білки. Селективний маркер, який працює в експресуючій клітині-хазяїні, може бути присутнім з метою полегшення селекції клітин, що містять вектор. Крім того, експресуючий конструкт може містити додаткові елементи. Наприклад, експресуючий вектор може містити одну або дві системи реплікації, що дозволяє йому підтримуватися в організмах, наприклад, у клітинах ссавців або комах для експресії й у прокаріотичній клітині-хазяїні для клонування й ампліфікації. Крім того, експресуючий конструкт може містити селективний маркерний ген, що забезпечує селекцію трансформованих клітин-хазяїнів. Селективні гени добре відомі в даній області техніки та залежать від використовуваних клітин-хазяїнів.

Виділення й очищення білка можна виконати згідно зі способами, відомими в даній області техніки. Наприклад, білок можна виділити з лізату генетично модифікованих клітин, що здійснюють експресію білка конститутивно та/або при індукції, або із синтетичної реакційної суміші шляхом імуноафінного очищення, що зазвичай включає контакт зразка з антитілом проти білка, промивання для видалення неспецифічно зв'язаного матеріалу, і елюювання специфічно зв'язаного білка. Виділений білок можна додатково очистити за допомогою діалізу та інших способів, які зазвичай використовують при способах очищення білка. В одному варіанті

реалізації білок можна виділити з використанням способів металохелатної хроматографії. Білки можуть містити модифікації, що полегшують виділення.

Поліпептиди можна одержати практично у чистому вигляді або у виділеній формі (наприклад, що не містять інших поліпептидів). Поліпептиди можуть бути присутніми у композиції, збагаченій зазначеним поліпептидом стосовно інших компонентів, які можуть бути присутніми в ній (наприклад, іншим поліпептидам або іншим компонентам клітини-хазяїна). Наприклад, очищений поліпептид можна одержати таким чином, що поліпептид присутній у композиції, що практично не містить інших експресованих білків, наприклад, менше 90 %, менше 60 %, менше 50 %, менше 40 %, менше 30 %, менше 20 %, менше 10 %, менше 5 % або менше 1 % композиції складається з інших експресованих білків.

Антитіла

У даному винаході запропоновані антитіла, у тому числі виділені антитіла, які специфічно зв'язуються з поліпептидом або гібридним білком відповідно до даного винаходу. Термін "антитіло" включає інтактні моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), утворені щонайменше з двох інтактних антитіл, і сполучні фрагменти антитіл, включаючи Fab і F(ab)'₂, за умови, що вони специфічно зв'язуються з поліпептидом або гібридним білком відповідно до даного винаходу. Найпростіша структурна одиниця цілого антитіла містить тетрамер, і кожний тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара містить один "легкий" (приблизно 25 кДа) й один "важкий" ланцюг (приблизно 50-70 кДа). N-кінцева область кожного ланцюга містить варіабельну область від близько 100 до 110 або більше амінокислот, головним чином відповідальну за розпізнавання антигена. Навпроти, C-кінцевий фрагмент кожного ланцюга визначає константну область, головним чином відповідальну за ефекторну функцію. Легкі ланцюги людини підрозділяються на каппа- і лямбда-, у той час як важкі ланцюги людини підрозділяються на гамма-, мію-, альфа-, дельта- або епсилон-, і визначають ізотип антитіла - IgM, IgD, IgG, IgA й IgE, відповідно. Сполучні фрагменти одержують за допомогою методик рекомбінантних ДНК, або шляхом ферментативного або хімічного розщеплення інтактних антитіл. Сполучні фрагменти включають Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-фрагменти й одноланцюгові антитіла.

На одному кінці кожного важкого ланцюга перебуває варіабельний домен (VH), а потім – ряд константних доменів. На одному кінці кожного легкого ланцюга перебуває варіабельний домен (VL), а на іншому кінці – константний домен; константний домен легкого ланцюга вирівняний з першим константним доменом важкого ланцюга, а варіабельний домен легкого ланцюга вирівняний з варіабельним доменом важкого ланцюга. У межах легкого та важкого ланцюга варіабельні та константні області з'єднуються "J"-областю з приблизно 12 або більше амінокислот, причому важкий ланцюг також містить "D"-область з приблизно 10 або більше амінокислот. Всі ланцюги антитіла мають аналогічну загальну структуру порівняно консервативних каркасних областей (FR), з'єднаних трьома гіперваріабельними областями, також названими областями, що визначають комплексарність, або CDR. CDR з двох ланцюгів кожної пари вирівнюються за каркасними областями, забезпечуючи зв'язування із специфічним епітопом. Від N-кінця до C-кінця як важкі, так і легкі ланцюги містять домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4.

Інтактне антитіло містить два сайти зв'язування та, за винятком біфункціональних або біспецифічних антитіл, зазначені два сайти зв'язування є ідентичними. Біспецифічне або біфункціональне антитіло є штучним гібридним антитілом, що містить дві пари різних важких/легких ланцюгів і два різних сайти зв'язування. Біспецифічні антитіла можна одержати за допомогою різних способів, включаючи злиття гібридом або зв'язування Fab'-фрагментів.

Як зазначено вище, зв'язуючі фрагменти можна одержати шляхом ферментативного або хімічного розщеплення інтактних антитіл. Гідроліз антитіл ферментом папаїном призводить до одержання двох ідентичних антигенсполучних фрагментів, також відомих як "Fab"-фрагменти, і "Fc"-фрагменти, що не мають антигенсполучну активність. Гідроліз антитіл ферментом пепсином призводить до одержання F(ab')₂-фрагмента, в якому обидва плеча молекули антитіла залишаються зв'язаними та містять два антигенсполучних сайти. F(ab')₂-фрагмент має здатність перехресно зв'язувати антиген.

У даному документі термін "Fab" відноситься до фрагмента антитіла, що містить VH- і VL-області, а також константний домен легкого ланцюга та CH1-домен важкого ланцюга.

У даному документі термін "Fv" відноситься до мінімального фрагмента антитіла, що зберігає як антигенрозпізнавальний, так й антигенсполучний сайти. У дволанцюгових різновидах Fv ця область містить димер одного варіабельного домена важкого ланцюга й одного варіабельного домена легкого ланцюга, з'єднаних нековалентним зв'язком. В

одноланцюгових різновидах Fv один варіабельний домен важкого ланцюга й один варіабельний домен легкого ланцюга можуть бути ковалентно зв'язані гнучким пептидним лінкером таким чином, що легкий і важкий ланцюги можуть утворювати "димерну" структуру, аналогічну структурі дволанцюгових різновидів Fv. Саме в цій конфігурації три CDR кожного варіабельного домена взаємодіють з утворенням антигенсполучного домена на поверхні димера VH-VL. Хоча шість CDR спільно надають антитілу антигенсполучну специфічність, навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три CDR, специфічних стосовно антигена) має здатність розпізнавати та зв'язувати антиген.

У даному документі термін "гіперваріабельні області" або "CDR" відноситься до фрагмента імунологічних рецепторів, що контактує із специфічним лігандом і визначає його специфічність.

Термін "гіперваріабельна" область відноситься до амінокислотних залишків антитіла, відповідальних за зв'язування антигена. Гіперваріабельна область зазвичай містить амінокислотні залишки з CDR і/або залишки з "гіперваріабельної петлі".

У даному документі термін "епітоп" відноситься до антитіл-сполучних сайтів білкових антигенів. Епітопні детермінанти зазвичай містять хімічно активні поверхневі групи молекул, наприклад, амінокислоти або вуглеводні бічні ланцюги, а також мають специфічні тривимірні структурні та зарядові характеристики. Говорять, що антитіло зв'язується з антигеном, якщо константа дисоціації становить ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ або ≤ 10 нМ. Збільшена константа рівноваги ("K_D") означає меншу спорідненість між епітопом й антитілом, у той час як зменшена константа рівноваги означає більшу спорідненість між епітопом й антитілом. Антитіло з K_D "не більше" певного значення означає, що антитіло повинне зв'язуватись з епітопом із заданою K_D або більш сильне зв'язування. У той час як K_D описує характеристики зв'язування епітопа й антитіла, "специфічна активність" характеризує ефективність самого антитіла стосовно функції антитіла. Кореляція між константою рівноваги та специфічною активністю не є обов'язковою; так, наприклад, відносно низька K_D не обов'язково має на увазі високу специфічну активність.

Термін "селективно зв'язується" стосовно антитіла означає не те, що антитіло зв'язується тільки з однією речовиною, а те, що K_D антитіла стосовно першої речовини менше, ніж K_D антитіла стосовно другої речовини. Антитіло, що виїнятковно зв'язується з епітопом, зв'язується тільки із зазначеним єдиним епітопом.

При введенні в організм людини антитіла, які містять варіабельні та/або константні області, характерні для гризунів (тобто миші або пацюки), іноді асоціюються з, наприклад, швидким виведенням з організму або формуванням імунної відповіді організму проти антитіла. Щоб уникнути використання антитіл, що походять від гризунів, можна одержати повністю людські антитіла шляхом введення функції людського антитіла в організм гризуна таким чином, щоб гризун продукував повністю людські антитіла. Якщо це спеціально не зазначено у даному документі, терміни антитіла "людини" та "повністю людські" антитіла можна використовувати як взаємозамінні. Термін "повністю людське" можна використовувати при розрізненні антитіл, що є лише частково людськими, від повністю людських антитіл. Досвідченому фахівцю відомо про різні способи одержання повністю людських антитіл.

Щоб не допустити можливої гуморальної відповіді організму людини на антитіла миші, можна використовувати химерні або іншим способом гуманізовані антитіла. Химерні антитіла містять константну область, характерну для людини, і варіабельну область, характерну для миші, і тому в деяких пацієнтів може спостерігатися гуморальна відповідь на химерні антитіла. Таким чином, бажано одержати повністю людські антитіла проти мультимерних ферментів, щоб уникнути можливої гуморальної відповіді організму людини на антитіла миші або химерні антитіла.

Повністю людські моноклональні антитіла можна одержати, наприклад, шляхом утворення ліній гібридомних клітин за допомогою способів, відомих фахівцю в даній області техніки. Інші способи одержання включають використання послідовностей, які кодують специфічні антитіла для трансформації підходящої клітини-хазяїна ссавця, наприклад, клітини CHO. Трансформацію можна здійснити будь-яким відомих способом введення полінуклеотидів у клітину-хазяїна, у тому числі, наприклад, шляхом упакування полінуклеотиду у вірус (або у вірусний вектор) і трансдукції клітини-хазяїна вірусом (або вектором), або за допомогою процедур трансфекції, відомих в даній області техніки. Способи введення гетерологічних полінуклеотидів у клітини ссавців добре відомі в даній області техніки та включають декстран-опосередковану трансфекцію, преципітацію з фосфатом кальцію, полібрен-опосередковану трансфекцію, злиття протопластів, електропорацію, інкапсуляцію полінуклеотиду(ів) в ліпосоми та пряму мікроін'єкцію ДНК в ядра. Лінії клітин ссавців, доступні як хазяїни для експресії, добре відомі в даній області техніки та включають клітини CHO, клітини HeLa та клітини гепатоцелюлярної карциноми людини, але не обмежуються ними.

Антитіла можна використовувати для виявлення поліпептиду відповідно до даного винаходу. Наприклад, антитіла можна використовувати як діагностичний засіб за допомогою виявлення рівня одного або більше з поліпептидів відповідно до даного винаходу в організмі суб'єкта, і порівняння виявленого рівня із стандартним контрольним рівнем або з вихідним рівнем в організмі суб'єкта, визначеним раніше (наприклад, до захворювання).

Ще один варіант реалізації даного винаходу припускає використання одного або більше доменних антитіл людини (дАт). дАт являють собою найменші функціональні сполучні одиниці людських антитіл (IgG) і мають вигідні характеристики стабільності та розчинності. Ця технологія має на увазі використання дАт, кон'югованих із ЛСА (з утворенням "AlbudAb"; див, наприклад, EP1517921B, WO2005/118642 і WO2006/051288) та досліджуваною молекулою (наприклад, поліпептидною послідовністю відповідно до даного винаходу). AlbudAb часто характеризуються меншим розміром і простіше продукуються в мікробних експресуючих системах, наприклад, бактеріях або дріжджах, ніж сучасні технології, використовувані для продовження часу напівжиття поліпептидів у сироватці. Оскільки період напівжиття ЛСА становить приблизно три тижні, отримані кон'юговані молекули збільшують період напівжиття досліджуваної молекули. Використання технології дАт також може підвищити ефективність досліджуваної молекули.

Терапевтичне та профілактичне застосування

У даному винаході запропоновані способи лікування або профілактики метаболічних й асоційованих з метаболізмом захворювань, наприклад, ожиріння та інших розладів, пов'язаних з масою тіла, гіперглікемії, гіперінсулінемії, порушення переносимості глюкози, а також розладів метаболізму глюкози, шляхом введення поліпептидів або їх композицій, описаних у даному документі. Такі способи також можуть впливати на один або більше симптомів, асоційованих із захворюванням, розладом або станом, наприклад, знижуючи вагу або частоту симптому. У конкретних варіантах реалізації даного винаходу запропоновані способи лікування розладу метаболізму глюкози або маси тіла шляхом введення поліпептидів, їх N-глікозильованих димерів або композицій. У конкретних варіантах реалізації даного винаходу запропоновані способи зниження споживання їжі або зменшення маси тіла шляхом введення поліпептидів, їх N-глікозильованих димерів або композицій. У даному винаході також запропоноване застосування вищевказаних послідовностей, поліпептидів, їх N-глікозильованих димерів або композицій при виробництві лікарського засобу для лікування стану, вибраного з метаболічних й асоційованих з метаболізмом захворювань, наприклад, ожиріння та інших розладів маси тіла, гіперглікемії, гіперінсулінемії, порушення переносимості глюкози, а також розладів метаболізму глюкози. У даному винаході також запропоноване застосування вищевказаних послідовностей, поліпептидів, їх N-глікозильованих димерів або композицій при виробництві лікарського засобу для лікування розладу метаболізму глюкози або маси тіла. У даному винаході також запропоноване застосування вищевказаних послідовностей, поліпептидів, їх N-глікозильованих димерів або композицій при виробництві лікарського засобу для зниження споживання їжі або маси тіла.

Щоб визначити, чи може суб'єкт бути кандидатом для лікування або профілактики розладу маси тіла (наприклад, ожиріння) за допомогою способів, представлених у даному документі, варто виконати оцінку таких параметрів, як етіологія та ступінь стану суб'єкта (наприклад, наскільки надлишкова маса тіла суб'єкта у порівнянні із здоровим індивідом), але не обмежуючись ними. Наприклад, можна вважати, що дорослий суб'єкт із ІМТ між ~ 25 і $\sim 29,9$ кг/м² страждає надлишковою вагою (предожирінням), у той час як дорослий суб'єкт із ІМТ ~ 30 кг/м² або вище страждає ожирінням. Як обговорювалося у даному документі, поліпептиди відповідно до даного винаходу можуть пригнічувати апетит, наприклад, знижувати апетит, призводячи до зниження маси тіла.

Щоб визначити, чи може суб'єкт бути кандидатом для лікування або профілактики гіперглікемії, гіперінсулінемії, порушення переносимості глюкози та/або розладів метаболізму глюкози за допомогою запропонованих у даному документі способів, можна використовувати різні діагностичні способи, відомі в даній області техніки. Такі способи включають способи, описані в інших розділах даного документа (наприклад, оцінку рівня глюкози у плазмі натще (FPG) та пероральний тест переносимості глюкози (oGTT)).

Поліпептиди та гібридні білки, запропоновані у даному документі, при введенні суб'єкту для лікування або профілактики метаболічних й асоційованих з метаболізмом захворювань, наприклад, ожиріння та інших розладів, пов'язаних з масою тіла, гіперглікемії, гіперінсулінемії, порушення переносимості глюкози, розладів метаболізму глюкози можуть призвести до зниження рівня глюкози в крові, зниження маси тіла та/або зниження споживання їжі.

У деяких варіантах реалізації поліпептиди та гібридні білки, розглянуті у даному документі, можуть знижувати рівень глюкози в крові, масу тіла та/або споживання їжі щонайменше на 5 % у порівнянні із зазначеними показниками під час відсутності введення поліпептидів або гібридних білків. Наприклад, поліпептиди та гібридні білки, розглянуті у даному документі, можуть

5 знижувати рівень глюкози в крові, масу тіла та/або споживання їжі щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % у порівнянні зі станом до початку лікування або профілактики.

Фармацевтичні композиції

Поліпептиди відповідно до даного винаходу можуть перебувати у вигляді композиції, придатної для введення суб'єкту. В цілому, такі композиції являють собою "фармацевтичні композиції", що містять один або більше з поліпептидів й один або більше з фармацевтично прийнятних або фізіологічно прийнятних розріджувачів, носіїв або допоміжних речовин. У деяких варіантах реалізації поліпептиди присутні в терапевтично ефективній кількості. Фармацевтичні композиції можна використовувати в способах відповідно до даного винаходу;

15 так, наприклад, фармацевтичні композиції можна вводити ex vivo або in vivo в організм суб'єкта з метою здійснення терапевтичних і профілактичних способів і варіантів застосування, описаних у даному документі.

Можна скласти фармацевтичні композиції відповідно до даного винаходу, сумісні з передбачуваним способом або шляхом введення; типові шляхи введення викладені у даному документі. Крім того, фармацевтичні композиції можна використовувати в комбінації з іншими терапевтично активними агентами або сполуками (наприклад, агентами, що знижують рівень глюкози), описаними у даному документі, з метою лікування або профілактики захворювань, розладів і станів, розглянутих у даному винаході.

20

Фармацевтичні композиції зазвичай містять терапевтично ефективну кількість щонайменше одного з поліпептидів, розглянутих у даному винаході, й один або більше з фармацевтично та фізіологічно прийнятних агентів для одержання складу. Підходящі фармацевтично прийнятні або фізіологічно прийнятні розріджувачі, носії або допоміжні речовини включають антиоксиданти (наприклад, аскорбінову кислоту та бісульфат натрію), консерванти (наприклад, бензиловий спирт, метил-, етил- або н-пропілпарабени, р-гідроксibenзоат), емульгатори, суспензуючі агенти, диспергуючі агенти, розчинники, наповнювачі, об'ємоутворюючі агенти, детергенти, буфери, середовища-носії, розріджувачі й/або ад'юванти, але не обмежуються ними. Наприклад, підходяще середовище-носій може являти собою фізіологічний розчин або фізіологічний розчин із цитратним буфером, можливо, з додаванням інших матеріалів, що часто зустрічаються у фармацевтичних композиціях для парентерального введення. Нейтральний забуферений фізіологічний розчин або фізіологічний розчин, змішаний з сироватковим альбуміном, являють собою додаткові типові середовища-носії. Фахівці в даній області техніки можуть легко назвати різні буфери, які можна використовувати у фармацевтичних композиціях і лікарських формах. Типові буфери включають фармацевтично прийнятні слабкі кислоти, слабкі основи або їх суміші, але не обмежуються ними. Наприклад, компоненти буфера можуть являти собою водорозчинні матеріали, наприклад, фосфорну кислоту, винну кислоту, молочну кислоту, бурштинову кислоту, лимонну кислоту, оцтову кислоту, аскорбінову кислоту, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту та їх солі. Прийнятні буферні агенти включають, наприклад, трис-буфер, N-(2-гідроксietил)піперазин-N'-(2-етансульфонову кислоту) (HEPES), 2-(N-морфолін)етансульфонову кислоту (MES), натрієву сіль 2-(N-морфолін)етансульфонові кислоти (MES), 3-(N-морфолін)пропансульфонову кислоту (MOPS) і N-трис[гідроксиметил]метил-3-амінопропансульфонову кислоту (TAPS).

30

35

40

45

Після складання фармацевтичної композиції її можна зберігати в стерильних флаконах у вигляді розчину, суспензії, гелю, емульсії, твердого тіла або зневодненого або ліофілізованого порошку. Такі склади можна зберігати у вигляді готової до використання форми, ліофілізованої форми, що потребує відновлення перед використанням, рідкої форми, що потребує розведення перед використанням, або іншої прийнятної форми. У деяких варіантах реалізації запропонована фармацевтична композиція в одноразовому контейнері (наприклад, одноразовому флаконі, ампулі, шприці або автоматичному інжекторі (наприклад, EpiPen®)), у той час як в інших варіантах реалізації запропонований багаторазовий контейнер (наприклад, багаторазовий флакон). Для доставки поліпептидів можна використовувати будь-який апарат для доставки ліків, у тому числі імплантати (наприклад, імплантовані насоси) та катетерні системи, які добре відомі фахівцям. Ін'єкції речовин уповільненого всмоктування, які зазвичай вводять підшкірно або внутрішньом'язово, можна також використовувати для вивільнення поліпептидів, описаних у даному документі, протягом певного часу. Ін'єкції речовин уповільненого всмоктування, як правило, складені на твердій або масляній основі й у

50

55

60

загальному випадку містять щонайменше один із компонентів складу, викладених у даному документі. Фахівець в даній області техніки повинен бути знайомий з можливими складами та варіантами застосування ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування.

Фармацевтичні композиції можуть перебувати у формі стерильної водної або масляної суспензії для ін'єкції. Цю суспензію можна скласти згідно зі способами, відомими в даній області техніки, використовуючи підходящі диспергуючі агенти або зволожувачі та суспендуючі агенти, згадані у даному документі. Стерильний препарат для ін'єкції також може являти собою стерильний розчин або суспензію для ін'єкції в нетоксичному прийнятному для парентерального застосування розріджувачі або розчиннику, наприклад, розчин в 1,3-бутандіолі. Прийнятні розріджувачі, розчинники та диспергуючі середовища, які можна використовувати, включають воду, розчин Рінгера, ізотонічний розчин хлориду натрію, Cremophor EL™ (BASF, Парсипанні, штат Нью-Джерсі, США) або фізіологічний розчин з фосфатним буфером (PBS), етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь та рідкий поліетиленгліколь) та їх підходящі суміші. Крім того, стерильні нелетучі масла традиційно застосовують як розчинник або середовища для суспендування. З цією метою можна використовувати будь-яке м'яке нелетуче масло, у тому числі синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, при одержанні розчинів для ін'єкції знаходять застосування жирні кислоти, наприклад, олеїнова кислота. Пролонговане всмоктування конкретних ін'єкційних композицій можна забезпечити шляхом включення агента, що сповільнює всмоктування (наприклад, моностеарату алюмінію або желатину).

Фармацевтичні композиції, які містять активний інгредієнт (наприклад, поліпептиди відповідно до даного винаходу), можуть перебувати у формі, придатній для перорального застосування, наприклад, таблеток, капсул, пастилок, льодяників, водних або масляних суспензій, диспергованих порошків або гранул, емульсій, твердих або м'яких капсул або сиропів, розчинів, мікрогранул або еліксирів. Фармацевтичні композиції для перорального застосування одержують відповідно до будь-якого способу, відомого в даній області техніки для одержання фармацевтичних композицій, і такі композиції можуть містити один або більше з таких агентів, як підсолоджувачі, ароматизатори, барвники та консерванти, з метою одержання фармацевтично вишуканих і приємних на смак препаратів. Таблетки, капсули і тому подібне містять активний інгредієнт у суміші з нетоксичними фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, що підходять для виготовлення таблеток. Такі допоміжні речовини можуть являти собою, наприклад, розріджувачі, наприклад, карбонат кальцію, карбонат натрію, лактозу, фосфат кальцію або фосфат натрію; гранулюючі агенти, і розпушувачі, наприклад, кукурудзяний крохмаль або альгінову кислоту; сполучні агенти, наприклад, крохмаль, желатин або гуміарабік; і ковзні агенти, наприклад стеарат магнію, стеаринову кислоту або тальк.

Таблетки, капсули і тому подібне, придатні для перорального введення, можуть не містити покриття або бути покриті відомими способами для вповільнення розпаду та всмоктування у шлунково-кишковому тракті, тим самим забезпечуючи пролонговану дію. Наприклад, можна застосовувати матеріал з відстроченим вивільненням, наприклад, гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат. На них також можна нанести покриття відповідно до методик, відомих в даній області техніки, з метою формування осмотичних терапевтичних таблеток з контрольованим вивільненням. Додаткові агенти включають біорозкладані або біосумісні частинки, або полімерні речовини, наприклад, поліефіри, поліамінокислоти, гідрогель, полівінілпіролідон, поліангідриди, полігліколеву кислоту, етиленвінілацетат, метилцелюлозу, карбоксиметилцелюлозу, сульфат протаміну або лактид/гліколідні співполімери, полілактид/гліколідні співполімери або співполімери етиленвінілацетату, для контролю доставки введеної композиції. Наприклад, агент для перорального застосування можна включити в мікрокапсули, отримані за допомогою методик коацервації або міжфазної полімеризації, з використанням гідроксиметилцелюлозних або желатинових мікрокапсул або мікрокапсул полі(метилметакрилату), відповідно, або в колоїдну систему доставки лікарських засобів. Колоїдні дисперсійні системи включають макромолекулярні комплекси, нанокapsули, мікросфери, мікрогранули та системи на основі ліпідів, у тому числі емульсії типу "масло у воді", міцели, змішані міцели та ліпосоми. Способи одержання ліпосом описані, наприклад, у патентах США № 4235871, 4501728 і 4837028. Способи одержання вищезгаданих складів очевидні для фахівців у даній області техніки.

Склади для перорального застосування можуть бути представлені у вигляді твердих желатинових капсул, де активний інгредієнт змішаний з інертним твердим розріджувачем, наприклад, карбонатом кальцію, фосфатом кальцію або каоліном або мікрокристалічною целюлозою, або у вигляді м'яких желатинових капсул, де активний інгредієнт змішаний з водним або масляним середовищем, наприклад, арахісовим маслом, рідким парафіном або маслиновим маслом.

Водні суспензії містять активні матеріали в суміші з допоміжними речовинами, придатними для їх виробництва. Такі допоміжні речовини можуть являти собою суспендуючі агенти, наприклад, карбоксиметилцелюлозу натрію, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, альгінат натрію, полівінілпіролідон, трагакантову камідь та гуміарабік; диспергуючі агенти або зволожувачі, наприклад, природні фосфатиди (наприклад, лецитин), або продукти конденсації алкіленоксиду з жирними кислотами (наприклад, поліоксіетиленстеарат), або продукти конденсації етиленоксиду з довголанцюговими аліфатичними спиртами (наприклад, гептадекаетиленоксидетанол), або продукти конденсації етиленоксиду з неповними ефірами – похідними жирних кислот і гекситу (наприклад, поліоксіетиленсорбітмоноолеат) або продукти конденсації етиленоксиду з неповними ефірами – похідними жирних кислот й ангідридів гекситу (наприклад, поліетиленсорбітунмоноолеат). Водні суспензії можуть також містити один або більше з консервантів.

Масляні суспензії можна скласти шляхом суспендування активного інгредієнта в рослинному маслі, наприклад, арахісовому маслі, маслиновому маслі, кунжутному маслі або кокосовому маслі, або в мінеральному маслі, наприклад, рідкому парафіні. Масляні суспензії можуть містити загущувач, наприклад, бджолинний віск, твердий парафін або цетиловий спирт. Підсолоджувачі, наприклад, представлені вище, і ароматизатори можна додавати для одержання приємного на смак препарату для перорального застосування.

Дисперговані порошки та гранули для одержання водної суспензії шляхом додавання води містять активний інгредієнт у суміші з диспергуючим агентом або зволожувачем, суспендуючим агентом й одним або більше з консервантів. Підходящі диспергуючі агенти або зволожувачі та суспендуючі агенти наведені у даному документі.

Фармацевтичні композиції відповідно до даного винаходу можуть також перебувати у вигляді емульсій "масло-у-воді". Масляна фаза може являти собою рослинне масло, наприклад, маслинове масло або арахісове масло, або мінеральне масло, наприклад, рідкий парафін, або їх суміші. Підходящі емульгатори можуть являти собою природні камеді, наприклад, гуміарабік або трагакантову камідь; природні фосфатиди, наприклад, фосфатиди сої, лецитин й ефіри або неповні ефіри – похідні жирних кислот; ангідриди гекситу, наприклад, сорбітанмоноолеат; і продукти конденсації неповних ефірів із етиленоксидом, наприклад, поліоксіетиленсорбітанмоноолеат.

Склади також можуть містити носії для захисту композиції від швидкого розкладання або виведення з організму, наприклад,клади з контрольованим вивільненням, у тому числі імпланти, ліпосоми, гідрогелі, проліки або мікрокапсульовані системи доставки. Наприклад, можна застосовувати матеріал з відстроченим вивільненням, наприклад, гліцерилмоностеарат або гліцерилстеарат окремо або в комбінації з воском.

У даному винаході розглядається введення поліпептидів у вигляді супозиторіїв для ректального введення лікарської речовини. Супозиторії можна одержати шляхом змішування лікарської речовини з підходящою неподразнюючою допоміжною речовиною, твердою при звичайних температурах, але рідкою при ректальній температурі, що, таким чином, буде плавитися у прямій кишці, вивільняючи лікарську речовину. Такі матеріали включають масло какао та поліетиленгліколі, але не обмежуються ними.

Поліпептиди, розглянуті у даному винаході, можуть перебувати у формі будь-якої іншої підходящої фармацевтичної композиції (наприклад, спреїв для назального або інгаляційного застосування), відомої в цей час або розробленої в майбутньому.

Концентрація поліпептиду або його фрагмента в складі може варіюватися в широких межах (наприклад, від менше ніж приблизно 0,1 мас. %, як правило, 2 мас. % або щонайменше приблизно 20 мас. % до 50 мас. % або більше); її вибирають, як правило, головним чином з урахуванням об'єму рідини, в'язкості та факторів, що залежать від суб'єкта, відповідно до, наприклад, конкретного вибраного способу введення.

У даному документі розглядається застосування технології доставки речовин з уповільненим всмоктуванням компанії Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Емервілл, штат Каліфорнія, США). Ця технологія використовує мембрани на основі нанотрубок із діоксиду титану, що забезпечують швидкості вивільнення нульового порядку для макромолекул, наприклад, білкових і пептидних терапевтичних засобів. Біосумісну мембрану розташовують у невеликому підшкірному імплантаті, що забезпечує довгострокову (наприклад, до одного року) доставку терапевтичних макромолекул з постійною швидкістю. У цей час проходить оцінку технологія доставки агоністів GLP-1 для лікування діабету II типу. У деяких варіантах реалізації поліпептид(и), описаний(и) у даному документі, може (можуть) являти собою склад з мембраною. Наприклад, можна просочити мембрану поліпептидом або оточити поліпептид

мембраною. Мембрана може мати форму диска, трубки або кулі. У деяких варіантах реалізації трубка може являти собою нанотрубку, або куля може являти собою наносферу.

У деяких варіантах реалізації поліпептиди, описані у даному документі, можна вводити суб'єкту за допомогою носимої системи доставки, яку можна закріпити на тілі пацієнта й яка може доставляти заздалегідь задану дозу поліпептиду пацієнту. Типові носимі системи доставки включають пластирі або насоси. У деяких випадках носимі системи доставки, наприклад носимі інжектори, використовувані для доставки Neulasta®, можна застосовувати для введення поліпептидів, описаних у даному документі. В інших варіантах реалізації для доставки поліпептиду, описаного у даному документі, в організм пацієнта можна використовувати осмотичні насоси, наприклад, імплантовані осмотичні насоси (наприклад, насос DUROS® або осмотичний насос ALZET®).

Шляхи введення

У даному винаході розглядається введення описаних поліпептидів та їх композицій будь-яким підходящим способом. Підходящі шляхи введення включають парентеральний (наприклад, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, підшкірний (наприклад, впорскування або використання імплантата), внутрішньочеревинний, інтрацистернальний, внутрішньосуглобний, внутрішньочеревинний, внутрішньочеребральний (інтрапаренхіматозний) та інтрацеребровентрикулярний), оральний, назальний, вагінальний, сублінгвальний, внутрішньоочний, ректальний, місцевий (наприклад, трансдермальний), сублінгвальний та інгаляційний.

Ін'єкції речовин вповільненого всмоктування, які зазвичай вводять підшкірно або внутрішньом'язово, можна також використовувати для вивільнення поліпептидів, описаних у даному документі, протягом певного часу. Ін'єкції речовин уповільненого всмоктування, як правило, складені на твердій або масляній основі й у загальному випадку містять щонайменше один із компонентів складу, викладених у даному документі. Фахівець в даній області техніки повинен бути знайомий з можливими складами та варіантами застосування ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування.

Що стосується антитіл, у типовому варіанті реалізації антитіло або фрагмент антитіла відповідно до даного винаходу зберігали при концентрації 10 мг/мл в стерильному ізотонічному водному розчині хлориду натрію для ін'єкцій при 4 °C і розбавляли 100 мл або 200 мл 0,9 % хлориду натрію для ін'єкцій до введення пацієнту. Антитіло вводили шляхом внутрішньовенного вливання протягом 1 години в дозі від 0,2 до 10 мг/кг. В інших варіантах реалізації антитіло вводять шляхом внутрішньовенного вливання протягом від 15 хвилин до 2 годин. В інших варіантах реалізації процедуру введення здійснюють шляхом підшкірної болюсної ін'єкції.

У даному винаході розглядаються способи, в яких поліпептид або антитіло або фрагмент антитіла відповідно до даного винаходу вводять суб'єкту щонайменше два рази на день, щонайменше раз на день, щонайменше кожні 48 годин, щонайменше кожні 72 години, щонайменше раз на тиждень, щонайменше раз на 2 тижні, щонайменше раз на місяць, щонайменше раз на 2 місяці або щонайменше раз на 3 місяці або рідше.

Комбінована терапія

У даному винаході розглядається застосування поліпептидів у комбінації з одним або більше з активних терапевтичних агентів або іншими профілактичними або терапевтичними процедурами. При такій комбінованій терапії різні активні агенти часто мають різні механізми дії. Така комбінована терапія може бути особливо вигідною за рахунок зниження дози одного або більше з агентів, за рахунок чого послабляються або усуваються небажані ефекти, асоційовані з одним або більше агентів; крім того, така комбінована терапія може чинити синергетичну терапевтичну або профілактичну дію на основні захворювання, розлад або стан.

У даному документі термін "комбінація" має на увазі включення терапевтичних засобів, які можна вводити окремо, наприклад, в різних складах для роздільного введення (наприклад, як вони можуть бути представлені в комплекті) та терапевтичних засобів, які можна вводити спільно в одному складі (наприклад, "спільному складі").

У деяких варіантах реалізації поліпептиди вводять або застосовують послідовно, наприклад, коли один агент вводять до одного або більше інших агентів. В інших варіантах реалізації поліпептиди вводять одночасно, наприклад, коли два або більше з агентів вводять в один або приблизно той самий час; зазначені два або більше з агентів можуть перебувати у двох або більше окремих складах або бути об'єднані в одному складі (наприклад, спільному складі). Незалежно від послідовного або одночасного введення двох або більше агентів, вважається, що їх вводять у комбінації для цілей даного винаходу.

Поліпептиди відповідно до даного винаходу можна застосовувати в комбінації з іншими агентами, корисними для лікування, профілактики, пригнічення або полегшення захворювань,

розладів або станів, викладених у даному документі, включаючи речовини, які зазвичай вводять суб'єктам, що страждають від ожиріння, розладу харчового поведіння, гіперглікемії, гіперінсулінемії, непереносимості глюкози та інших розладів метаболізму глюкози.

У даному винаході розглядається комбінована терапія з використанням численних агентів (і їх класів), включаючи 1) інсулін, імітатори інсуліну й агенти, що стимулюють секрецію інсуліну, в тому числі похідні сульфонілсечовини (наприклад, хлорпропамід, толазамід, ацетогексамід, толбутамід, глібенкламід, глімепірид, гліпізид) і меглітиніди (наприклад, мітиглінід, репаглінід (PRANDIN) і натеглінід (STARLIX)); 2) бігуаніди (наприклад, метформін (GLUCOPHAGE) і його фармацевтично прийнятні солі, зокрема, метформіну гідрохлорид і його складі з пролонгованим вивільненням, наприклад, Glumetza™, Fortamet™ і GlucophageXR™) та інші агенти, що діють за рахунок стимуляції утилізації глюкози, зниження продукції глюкози у печінці та/або зниження виходу глюкози в кишечнику; 3) інгібітори альфа-глюкозидази (наприклад, акарбозу, воглібозу і міглітол) та інші агенти, які сповільнюють переварювання вуглеводів і, отже, їхнє поглинання в кишечнику та знижують постпрандіальну гіперглікемію; 4) тiazолідиндіони (наприклад, росиглітазон (AVANDIA), троглітазон (REZULIN), піоглітазон (ACTOS), гліпізид, балаглітазон, ривоглітазон, нетоглітазон, AMG 131, MBX2044, мітоглітазон, лобеглітазон, IDR-105, троглітазон, енглітазон, сиглітазон, адаглітазон, дарглітазон, які підсилюють дію інсуліну (наприклад, шляхом сенсibiliзації інсуліну), включаючи інсулін й імітатори інсуліну (наприклад, інсулін деглудек, інсулін гларгін, інсулін ліспро, інсулін детемір, інсулін глулізін й інгаляційні складі кожного з них), тим самим стимулюючи утилізацію глюкози у периферичних тканинах; 5) глюкагон-подібні пептиди, включаючи інгібітори DPP-IV (наприклад, алогліптин, омаригліптин, лінагліптин, вілдагліптин (GALVUS) і ситагліптин (JANUVIA)), і глюкагон-подібний пептид-1 (GLP-1), і агоністи, і аналоги GLP-1 (наприклад, ексенатид (BYETTA й ITCA 650 (осмотичний насос, імплантований під шкіру, що здійснює доставку аналога ексенатиду протягом 12 місяців; Intarcia, Бостон, штат Массачусетс, США)) й агоністи рецептора GLP-1 (наприклад, дулаглютид, семаглютид, альбіглютид, ексенатид, ліраглютид, ліксисенатид, таспоглютид, CJC-1131 і BIM-51077, включаючи їх складі для інтраназального, трансдермального застосування та застосування раз на тиждень); 6) і DPP-IV-стійкі аналоги (імітатори інкретину), агоністи PPAR-гамма, агоністи PPAR-альфа, наприклад, похідні фенофібрової кислоти (наприклад, гемфіброзил, клофібрат, ципрофібрат, фенофібрат, безафібрат), агоністи PPAR подвійної дії (наприклад, ZYH2, ZYH1, GFT505, чиглітазар, мураглітазар, алеглітазар, соделглітазар і наведглітазар), агоністи PPAR загальної дії, інгібітори PTP1B (наприклад, ISIS-113715 і TTP814), інгібітори SGLT (наприклад, ASP1941, SGLT-3, емплагліфлозин, дапагліфлозин, санагліфлозин, BI-10773, PF-04971729, ремогліфлозин, TS-071, тофогліфлозин, іпрагліфлозин і LX-4211), стимулятори секреції інсуліну, інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту (наприклад, алацеприл, беназеприл, каптоприл, церонаприл, цилазаприл, делаприл, еналаприл, еналаприлат, фозиноприл, імідаприл, лізіноприл, мовелтиприл, периндоприл, хінаприл, раміприл, спіраприл, темокаприл або трандолаприл), антагоністи рецептора ангіотензину II (наприклад, лозартан, COZAAR□, валсартан, кандесартан, олмесартан, телмісартан і кожний з цих лікарських засобів, які використовують в комбінації з гідрохлортіазидом, наприклад, HYZAAR□) або інші антигіпертензивні препарати, наприклад, LCZ 696, агоністи RXR, інгібітори кінази-3 глікогенсинтази, імуномодулятори, симпатолітики, бета-адреноблокатори (наприклад, пропранолол, атенолол, бісопролол, карведилол, метопролол або метопрололу тартрат), альфа-адреноблокатори (наприклад, доксазозин, празозин або альфа-метилдофу), центральні агоністи альфа-адренергічних рецепторів, периферичні вазодилататори (наприклад, гідралазін); агоністи бета-3-адренергічних рецепторів, інгібітори 11-бета-HSD1, інгібітори нейтральної ендопептидази (наприклад, тіофан і фосфорамідон), антагоністи альдостерону, інгібітори альдостеронсинтази, інгібітори реніну (наприклад, похідні сечовини та ди- і трипептидів (див. патент США № 5116835), амінокислоти та їх похідні (патенти США 5095119 і 5104869), ланцюги амінокислот, зв'язаних непептидними зв'язками (патент США 5114937), похідні ди- і трипептидів (патент США 5106835), пептидиламінодіоли (патенти США 5063208 і 4845079) і пептидил-бета-аміноациламінодіолкарбамати (патент США 5089471); крім того, ряд інших пептидних аналогів, описаних у наступних патентах США: 5071837; 5064965; 5063207; 5036054; 5036053; 5034512 і 4894437, і низькомолекулярні інгібітори реніну (включаючи діолсульфаніламіди та сульфініли (патент США 5098924), N-морфоліно-похідні (патент США 5055466), N-гетероциклічні спирти (патент США 4885292) та піролімідазолони (патент США 5075451); крім того, похідні пепстатину (патент США 4980283) і фтор- і хлорпохідні статон-вмісних пептидів (патент США 5066643), еналкірен, RO 42-5892, A 65317, CP 80794, ES 1005, ES 8891, SQ 34017, аліскірен (2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(2-карбамоїл-2-метилпропіл)-5-аміно-4-гідрокси-2,7-діізопропіл-8-[4-

метокси-3-(3-метоксипропокси)-феніл]-октанаміду геміфумарат) SPP600, SPP630 і SPP635), антагоністи рецептора ендотеліну, інгібітори фосфодіестерази-5 (наприклад, силденафіл, тадалафіл і варденафіл), вазодилататори, блокатори кальцієвих каналів (наприклад, амлодіпін, ніфедипін, верапаміл, дилтіазем, галопаміл, нілудипін, німодипін, нікардипін), активатори калієвих каналів (наприклад, нікорандил, пінацидил, кромакалім, міноксидил, апрілкалім, лопразолам), агенти, що знижують рівень ліпідів, наприклад, інгібітори ГМГ-КоА-редуктази, наприклад, симвастатин і ловастатин, доступні у продажу як ZOCOR® і MEVACOR® у формі лактону-проліків і діючі як інгібітори після введення, і фармацевтично прийнятні солі інгібіторів ГМГ-КоА-редуктази на основі дигідроксикислот з розірваним кільцем, наприклад, аторвастатину (особливо кальцієву сіль, доступну в продажу як LIPITOR®), розувастатину (особливо кальцієву сіль, доступну в продажу як CRESTOR®), правастатину (особливо натрієву сіль, доступну в продажу як PRAVACHOL®), церивастатину і флувастатину (особливо натрієву сіль, доступну в продажу як LESCOL®); інгібітори всмоктування холестерину, наприклад, езетиміб (ZETIA®) й езетиміб у комбінації з іншими агентами, що знижують рівень ліпідів, наприклад, інгібіторами ГМГ-КоА-редуктази, зазначеними вище, і особливо з симвастатином (VYTORIN®) або з аторвастатин-кальцієм; лікарські засоби, що підвищують рівень ЛПВЩ (наприклад, ніацин й агоністи рецептора нікотинової кислоти та їх варіанти з уповільненим або контрольованим вивільненням, і/або в комбінації з інгібітором ГМГ-КоА-редуктази; агоністи рецептора ніацину, наприклад, аципімокс й ацифран, а також часткові агоністи рецептора ніацину; антагоністи рецептора глюкагону (наприклад, МК-3577, МК-0893, LY-2409021 і KT6-971); агенти, що поглинають жовчні кислоти (наприклад, колестилан, колестимід, колесевеламу гідрохлорид, колестипол, холестирамін і діалкіламіноалкільні похідні перехресно зшитого декстрану), інгібітори ацил-КоА: холестеринацилтрансферази, (наприклад, авазиміб); агенти для застосування при запальних станах, наприклад, аспірин, нестероїдні протизапальні препарати, або НПЗП, глюкокортикоїди та селективні інгібітори циклооксигенази-2, або COX-2; активатори глюкوکінази (GKA) (наприклад, AZD6370); інгібітори 11 β -гідроксистероїддегідрогенази 1 типу, (наприклад, описані у патенті США № 6730690 і LY-2523199); інгібітори СЕТР (наприклад, анацетрапіб, евацетрапіб і торцетрапіб); інгібітори фруктозо-1,6-бісфосфатази, (наприклад, описані у патентах США № 6054587; 6110903; 6284748; 6399782; і 6489476); інгібітори ацетил-КоА-карбоксилази-1 або 2 (ACC1 або ACC2); інгібітори PCSK9; часткові агоністи GPR-40; модулятори SCD; інгібітори синтази жирних кислот; амілін й аналоги аміліну (наприклад, прамлінтид); включаючи фармацевтично прийнятні солі вищевказаних активних агентів, якщо це можливо з хімічної точки зору.

Крім того, у даному винаході розглядається комбінована терапія з використанням агентів і способів для стимуляції втрати ваги, наприклад, агентів, що стимулюють обмін речовин або знижують апетит, і зміною дієти та/або схем фізичного навантаження, що сприяє втраті ваги.

Поліпептиди відповідно до даного винаходу можна використовувати в комбінації з одним або більше з інших агентів будь-яким чином, що відповідають обставинам. В одному варіанті реалізації лікування із застосуванням щонайменше одного активного агента та щонайменше одного поліпептиду відповідно до даного винаходу підтримують протягом певного часу. В ще одному варіанті реалізації лікування із застосуванням щонайменше одного активного агента знижують або припиняють (наприклад, при стабільному стані суб'єкта), у той час як лікування із застосуванням поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу підтримують без зміни схеми прийому. У додатковому варіанті реалізації лікування із застосуванням щонайменше одного активного агента знижують або припиняють (наприклад, при стабільному стані суб'єкта), у той час як лікування із застосуванням поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу знижують (наприклад, знижуючи дозу, частоту прийому або тривалість схеми прийому). В ще одному варіанті реалізації лікування із застосуванням щонайменше одного активного агента знижують або припиняють (наприклад, при стабільному стані суб'єкта), а лікування із застосуванням щонайменше поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу підсилюють (наприклад, підвищуючи дозу, частоту прийому або тривалість схеми прийому). В ще одному варіанті реалізації лікування із застосуванням щонайменше одного активного агента підтримують, а лікування із застосуванням поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу знижують або припиняють (наприклад, знижуючи дозу, частоту прийому або тривалість схеми прийому). В ще одному варіанті реалізації лікування із застосуванням щонайменше одного активного агента та лікування із застосуванням поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу знижують або припиняють (наприклад, знижуючи дозу, частоту прийому або тривалість схеми прийому).

Схема прийому

Поліпептиди відповідно до даного винаходу можна вводити суб'єкту в кількості, що залежить, наприклад, від мети введення (наприклад, бажаного ступеня нормалізації стану); віку,

ваги, статі, стану здоров'я та фізичного стану суб'єкта, що підлягає лікуванню; природи поліпептиду, що вводять, та/або складу; шляхи введення; і характеру захворювання, розладу, стану або їх симптомів (наприклад, тяжкості порушення регуляції глюкози/інсуліну та стадії розладу). Схему прийому можна також розробляти з урахуванням наявності, характеру і ступеня небажаних ефектів, пов'язаних із введеним(и) агентом(ами). Ефективні дози та схеми прийому легко визначити, наприклад, на підставі досліджень безпеки та досліджень із збільшенням дози, досліджень *in vivo* (наприклад, на тваринних моделях) та інших способів, відомих фахівцю в даній області техніки.

У загальному випадку, параметри режиму прийому визначають, що доза в кількісному відношенні повинна бути менше кількості, яка може бути незворотно токсичною для суб'єкта (тобто максимально переносимої дози, MTD) і не менше кількості, необхідної для вимірюваного впливу на суб'єкта. Такі кількості визначаються, наприклад, фармакокінетичними та фармакодинамічними параметрами, пов'язаними з поглинанням, розподілом, метаболізмом і виведенням ("ADME"), з урахуванням шляху введення та інших факторів.

Ефективна доза (ЕД) є дозою або кількістю препарату, що дає терапевтичну відповідь або бажаний ефект у деякої частки пацієнтів, що приймають його. "Медіанна ефективна доза" або ЕД₅₀ агента являє собою дозу або кількість агента, що дозволяє одержати терапевтичну відповідь або бажаний ефект у 50 % популяції суб'єктів, яким вводять даний агент. Хоча ЕД₅₀ зазвичай використовують як показник обґрунтованої ймовірності ефекту агента, вона не обов'язково являє собою дозу, яку клініцист може вважати доцільною з урахуванням всіх відповідних факторів. Так, у деяких ситуаціях ефективна кількість перевищує розрахункове значення ЕД₅₀, в інших ситуаціях ефективна кількість становить менше розрахункового значення ЕД₅₀, а в інших ситуаціях ефективна кількість аналогічна розрахунковому значенню ЕД₅₀.

Крім того, ефективна доза поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу може являти собою кількість, яка при введенні суб'єкту у вигляді однієї або декількох доз дозволяє одержати бажаний результат у порівнянні із здоровим суб'єктом. Наприклад, ефективна доза може являти собою дозу, яка при введенні суб'єкту з підвищеним рівнем глюкози й/або інсуліну в плазмі дозволяє досягти бажаного зниження у порівнянні з рівнем у здорового суб'єкта, щонайменше приблизно на 10 %, щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 25 %, щонайменше приблизно на 30 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 50 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 70 %, щонайменше приблизно на 80 % або більше ніж на 80 %.

Доцільний рівень дозування зазвичай становить від приблизно 0,001 до 100 мг/кг маси тіла пацієнта на день, які можна вводити у вигляді однієї або декількох доз. У деяких варіантах реалізації рівень дозування становить від приблизно 0,01 до приблизно 25 мг/кг на день, а в інших варіантах реалізації – від приблизно 0,05 до приблизно 10 мг/кг на день. Підходящий рівень дозування може становити від приблизно 0,01 до 25 мг/кг на день, від приблизно 0,05 до 10 мг/кг на день, або від приблизно 0,1 до 5 мг/кг на день. У межах цього діапазону дозування може становити від 0,005 до 0,05, від 0,05 до 0,5 або від 0,5 до 5,0 мг/кг на день.

Для перорального введення агента композицію можна представити у формі таблеток, капсул і тому подібного, що містять від 1,0 до 1000 мг активного інгредієнта, зокрема, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 і 1000,0 мг активного інгредієнта. Поліпептид(и) можна вводити за схемою, наприклад, від 1 до 4 разів на день, і часто один або два рази на день.

Прийом поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу можна повторювати з відповідною частотою, що може перебувати в межах від одного разу на день до одного разу на три місяці, залежно від фармакокінетики поліпептиду(ів) (наприклад, часу напівжиття) та фармакодинамічної відповіді (наприклад, тривалості терапевтичного ефекту поліпептиду(ів)). У деяких варіантах реалізації прийом часто повторюють від одного разу на тиждень до одного разу кожні 3 місяці. В інших варіантах реалізації поліпептид(и) вводять приблизно один раз на місяць.

У деяких варіантах реалізації дозування описаного(их) поліпептиду(ів) знаходиться в "дозованій лікарській формі". Фраза "дозована лікарська форма" відноситься до фізично дискретних одиниць, причому кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість поліпептиду(ів) відповідно до даного винаходу окремо або в комбінації з одним або більше додатковими агентами, достатню для одержання бажаного ефекту. Варто брати до уваги, що параметри дозованої лікарської форми залежать від конкретного агента та планованого ефекту.

Набори

У даному винаході також розглядаються набори, які містять описаний(і) поліпептид(и) та їх фармацевтичні композиції. Набори, як правило, представлені у вигляді фізичної структури, в якій розміщені різні компоненти, описані нижче, яку можна використовувати, наприклад, при практичній реалізації способів, описаних вище (наприклад, введенні поліпептиду(ів) суб'єкту, що потребує зниження маси тіла).

Набір може містити один або більше з поліпептиду(ів), описаного(их) у даному документі (наприклад, у стерильному контейнері), що може бути присутнім у формі фармацевтичної композиції, придатної для введення суб'єкту. Поліпептид(и) можуть бути присутніми у формі, готовій до застосування, або у формі, що вимагає, наприклад, відновлення або розведення перед введенням. Якщо поліпептид(и) перебувають у формі, що вимагає відновлення користувачем, набір може також містити буфери, фармацевтично прийнятні допоміжні речовини та тому подібне, упаковані з поліпептидом(ами) або окремо. Якщо розглядається комбінована терапія, набір може містити декілька агентів окремо, або вони вже можуть бути об'єднані в складі набору. Кожний компонент набору можна помістити в окремий контейнер, і всі контейнери можуть перебувати в одному упакованні. Набір відповідно до даного винаходу може передбачати умови, необхідні для належної підтримки компонентів, розміщених в ньому (наприклад, охолодження або заморожування).

Набір може містити етикетку або вкладиш в упакування, що містять ідентифікуючу інформацію про компоненти, що входять в його склад, а також інструкції з їх застосування (наприклад, параметри прийому, клінічну фармакологію активного(их) інгредієнта(ів), у тому числі механізм дії, фармакокінетику і фармакодинаміку, побічні ефекти, протипоказання і так далі). Етикетки або вкладиші можуть містити інформацію про виробника, наприклад, номери партій і дати закінчення строку придатності. Етикетку або вкладиш в упакування можна, наприклад, інтегрувати у фізичну структуру, в якій розміщені компоненти, окремо помістити в зазначену фізичну структуру, або прикріпити до компонента набору (наприклад, ампули, пробірки або флакону). Типові інструкції включають інструкції зі зменшення або зниження рівня глюкози в крові, лікування гіперглікемії, лікування цукрового діабету і так далі із застосуванням описаних модуляторів і фармацевтичних композицій на їх основі.

Етикетки або вкладиші можуть додатково містити або міститися на машинозчитуваному носії, наприклад, диску (наприклад, жорсткому диску, карті, носії пам'яті), оптичному диску, наприклад, CD- або DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнітній стрічці або електричному носії інформації, наприклад, ОЗП і ПЗП або їх гібридах, наприклад, магнітно/оптичних носіях, флеш-носіях або картах пам'яті. У деяких варіантах реалізації інструкції фактично відсутні в наборі, однак надані засоби для одержання інструкцій з видаленого джерела, наприклад, мережі Інтернет.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Наступні приклади представлені з метою забезпечити фахівців у даній області техніки повним описом способів реалізації та застосування даного винаходу та не призначені для обмеження рамок того, що автори винаходу вважають своїм винаходом; крім того, автори винаходу не мають намір сказати, що експерименти, описані нижче, являють собою всі виконані експерименти або єдині виконані експерименти. Були початі зусилля для забезпечення точності використовуваних чисельних значень (наприклад, кількостей, температури і так далі), однак варто враховувати можливість деяких експериментальних помилок і відхилень.

Якщо не зазначено інше, частки є масовими частками, молекулярна маса є середньою молекулярною масою, температура наведена в градусах Цельсія (°C), а тиск дорівнює або близький до атмосферного. Використані стандартні скорочення, у тому числі: п.о. = пара основ; т.п.о. = тисяч пар основ; пл = піколітр(и); с або сек = секунда(и); хв = хвилина(и); год. = година(и); АК = амінокислота(и); т.п.о. = тисяч пар основ; нт = нуклеотид(и); нг = нанограм; мкг = мікрограм; мг = міліграм; г = грам; кг = кілограм; дл = децилітр; мкл = мікролітр; мл = мілілітр; л = літр; мкм = мікромолярний; мм = мілімолярний; М = молярний; кда = кілодальтон; в/м = внутрішньом'язово(ий); в/ч = внутрішньочеревинно(ий); п/ш = підшкірно(ий); р/д = два рази на день; ВЕРХ = вискоєфективна рідинна хроматографія; МТ = маса тіла; Од = одиниця; нс = не є статистично значимим; РG = рівень глюкози у плазмі натще; FPI = рівень інсуліну в плазмі натще; ITT = тест переносимості інсуліну; PTT = тест переносимості пірувату; oGTT = пероральний тест переносимості глюкози; GSIS = секреція інсуліну під дією глюкози; PBS = фізіологічний розчин з фосфатним буфером; ПЛР = полімеразна ланцюгова реакція; NHS=N-гідроксисукцинімід; DMEM = середовище Ігла, модифіковане за Дульбекко; GC = копія геному; ЕДТА = етилендіамінтетраоцтова кислота.

Матеріали та способи

Наступні способи та матеріали використані у прикладах, описаних нижче.

Тварини. Самців мишей C57BL/6J з аліментарним ожирінням (The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мейн) тримали на кормі з високим вмістом жирів (D12492, Research Diets, Inc., Нью-Брансуїк, штат Нью-Джерсі, США), що містить 60 ккал% жиру, 20 ккал% білка та 20 ккал% вуглеводів протягом 12-20 тижнів. Всі дослідження на тваринах були схвалені комітетом з догляду за тваринами та їх використанням NGM. Миші DIO C57BL/6J являють собою модель ожиріння, аналогічну ожирінню в людини, де ожиріння засноване на споживанні надмірної кількості калорій. Миші C57BL/6J схильні до ожиріння, при якому спостерігається виражене збільшення маси тіла, а також гіперінсулінемія й іноді гіперглікемія. Ця лінія являє собою найбільш часто використовувану лінію мишей для моделювання аліментарного ожиріння. (Nilsson C., et al., *Acta Pharmacologica Sinica* (2012) 33: 173-181).

Нуклеотидні й амінокислотні послідовності. Послідовність з обліковим номером GenBank BC000529.2 являє собою кДНК OPC, що кодує варіанти GDF15 людини, а послідовність з обліковим номером GenBank NP_004855.2 являє собою амінокислотну послідовність, що кодує зазначену кДНК. кДНК сироваткового альбуміну *Homo sapiens* придбали в Origene (SC319937), обліковий номер GeneBank NM_000477.3, NP_000468).

Елемент Козака та послідовність IgK-сигнальний пептид людини (5'CACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT3') (SEQ ID NO: 98) вмонтували у вектор рТТ5 (National Research Council, Канада) між сайтами Pme й EcoRI. Хоча обидва зазначені сайти рестрикції були вилучені, для подальшого клонування в рамці зчитування створили сайт Age. Для створення конструкта hlgK-GDF15 ДНК GDF15 ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням прямого праймера: 5'-CTCCGAGGTGCCAGATGTGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGG 3" (SEQ ID NO: 102) і зворотного праймера: 5'-CCTCGAGCGGCCGCTAGCTCATATGCAGTGGCAGTCTTTGGCTAACA 3" (SEQ ID NO: 99) і ПЛР-суміші Sapphire (Clontech). Продукт ПЛР очищали в гелі (набір для виділення з гелю Qiagen Gel Extraction Kit) та клонували у рТТ5-hlgK (лінеаризовану за допомогою AgeI/HindIII) з використанням In-Fusion (Clontech). Для створення конструкта hlgK-ЛСА-лінкер-GDF15 ЛСА-лінкер і GDF15 окремо ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням відповідних праймерів: Після очищення в гелі збирали два ПЛР-фрагменти та лінеаризований вектор рТТ5 за допомогою мастер-мікса для збирання Gibson Assembly Master Mix. Клітини Stellar або NEB 5α, трансформовані за допомогою реакцій In-Fusion і Gibson, відповідно, висіювали на LB-агар, що містить карбеніцилін, і інкубували протягом ночі при 37 °С. Одиночні колонії збирали й аналізували за допомогою секвенування. ДНК позитивних колоній очищали (ДНК-Maxi-prep, Qiagen), підтверджували за допомогою повного секвенування та використовували для трансфекції клітин ссавців з метою експресії рекомбінантного білка.

Для створення специфічних мутантів виконували сайт-специфічний мутагенез із використанням набору QuikChange Lightning (Agilent) і відповідних праймерів.

Тимчасова експресія. Всі мутанти GDF15 трансфікували в клітини Expi 293F (Invitrogen Corporation, Карлсбад, штат Каліфорнія, США). Клітини в робочому порядку пересіювали в середовищі для експресії Expi (Invitrogen) та підтримували у вигляді суспензійних культур в колбах різного розміру. Як правило, клітини пересіювали при щільності клітин 5e5 життєздатних клітин/мл і вирощували протягом 3-х днів до пересіювання. Колби підтримували у зволоженому CO₂-інкубаторі при 37 °С і 5 % рівні CO₂. Клітини підтримували на шейкерах New Brunswick (New Brunswick Scientific Company, Едісон, штат Нью-Джерсі, США) при швидкості перемішування 120 об/хв.

Трансфекцію виконували за досягненням щільності клітин у культурі, рівній 2,5e6 життєздатних клітин/мл при більше ніж 95 % життєздатності. Як правило, для 50-мл трансфекції інокулювали 2,5e6 клітин/мл X 50 мл в 250-мл струшувану колбу в об'ємі культури 42,5 мл. 50 мкг плазмідної ДНК, що складається з експресуючого вектора, що містить досліджуваний ген, спочатку розбавляли 2,5 мл відновленого сироваткового середовища OPTI-MEM (Invitrogen). У той самий час реагент для трансфекції експіфектамін (Invitrogen) в 2,67-кратному об'ємі (у порівнянні з кількістю плазмідної ДНК) також розбавляли 2,5 мл відновленого сироваткового середовища OPTI-MEM. Після 5 хвилин інкубування при кімнатній температурі розведений реагент для трансфекції повільно додавали до розведеного плазмідною ДНК для утворення трансфекційних компетентних комплексів. Після 20 хвилин інкубування при кімнатній температурі 5 мл трансфекційних комплексів додавали до 42,5 мл клітинної культури. Потім трансфіковані клітини поміщали у зволожений CO₂-інкубатор на орбітальний шейкер із швидкістю перемішування 120 об/хв. Через двадцять чотири години після трансфекції в трансфіковану культуру вносили 250 мкл енхансерного розчину 1 (Invitrogen) і 2,5 мл енхансерного розчину 2 (Invitrogen). Потім культуру знову поміщали у зволожений CO₂-інкубатор на орбітальний шейкер. Через 6-7 днів після трансфекції культури збирали

центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 30 хв, а потім фільтрували через 0,2-мкм фільтр (Nalgene). Потім зразки аналізували на предмет експресії в гелі з фарбуванням кумасси.

Стабільна експресія в клітинах CHO. Мутеїни GDF15 стабільно експресували в системі GS Xseed™ з використанням лінії клітин-хазяїнів CHOK1SV GS-KO, заснованої на добре вивченій системі експресії компанії Lonza для клітин CHOK1SV. Система GS Xseed забезпечує одержання ліній клітин з високим рівнем експресії, придатних для продукції цГМФ. Система включає клітини-хазяїни CHOK1SV GS-KO, що накопичують цГМФ, GS-експресуючі вектори, повні протоколи культивування клітин, трансфекції, селекції та скринінгу ліній клітин і процесів продукції версії 8 (середовища та реакційні суміші). При розробці ліній клітин для мутеїнів GDF15 дотримувались рекомендацій виробника, спочатку одержавши неклоновані лінії клітин. Потім неклоновані лінії клітин піддавали клонуванню з обмеженим розведенням для виділення генетично однорідних клонів клітин високим рівнем експресії.

Очищення рекомбінантного білка GDF15. Гібриди ЛСА-GDF15 очищали від культурального середовища, використовуючи афінне захоплення на блакитній сефарозі або іонообмінне захоплення. В обох випадках гібриди ЛСА-GDF15 елюювали з використанням градієнта відповідної солі/pH, що підходить для оптимального елюювання та відділення від домішок білка клітини-хазяїна. Потім всі гібриди ЛСА-GDF15 очищали з використанням колонки GE Healthcare Superdex 200 (26/60) і 1X PBS в якості рухомого буфера. Потім досліджували характеристики та підтверджували послідовність очищених гібридів за допомогою PX/MC (Agilent 6500-series Q-TOF), підтверджували монодисперсність гель-фільтрацією-BEPX (Agilent 1200-BEPX) й електрофорезом у ДСН-ПААГ (невідновлюючому і відновлюючому) з фарбуванням кумасси та/або сріблом. Для експериментів in vivo підтверджували, що вміст ендотоксинів був менше 5 ЕЕ/мг при підшкірній ін'єкції.

Глікозилізовані мутеїни GDF15 очищали від культурального середовища за допомогою іонообмінного захоплення. У всіх випадках мутеїни GDF15 елюювали з використанням градієнта відповідної солі/pH, що підходить для оптимального елюювання та відділення від домішок білка клітини-хазяїна. Потім всі мутеїни GDF15 додатково очищали за допомогою GE HiTrap Phenyl HP при pH 8,0 з використанням лінійного градієнта, що знижується, сульфату амонію. Фракції оцінювали та поєднували на підставі чистоти і параметрів глікозилування за допомогою зрушення гелю при електрофорезі в ДСН-ПААГ в невідновлюваних умовах. Потім додатково оцінювали характеристики остаточних об'єднаних зразків кожного мутеїну GDF15 і підтверджували послідовність/присутність глікану (+/- ПНГазу F, № у каталозі NEB P0704S) за допомогою PX/MC (Agilent 6500-series Q-TOF), підтверджували монодисперсність гель-фільтрацією-BEPX (Agilent 1200-BEPX) й електрофорезом у ДСН-ПААГ (невідновлюючому і відновлюючому) з фарбуванням кумасси та/або сріблом. Склади всіх мутеїнів GDF15 одержували в 10 мМ ацетаті натрію pH 4,0.

Оцінка розчинності мутеїнів GDF15 людини. Мутеїни діалізували в 0,01 % (об/об) мурашину кислоту (pH 2,0) і концентрували за допомогою відцентрових фільтрів Amicon Ultra Centrifugal Filters з регенованої нітроцелюлози 10000 NMWL (UFC901096) у деяких випадках до концентрації більше 10 мг/мл. Початкову концентрацію кожного мутеїну визначали за оптичною щільністю при довжині хвилі 280 нм за законом Бера (коефіцієнт екстинкції = 14400, молекулярна маса = 12287 Да). Потім кожний мутеїн послідовно дворазово розбавляли 0,01 % мурашиною кислотою, і 90 мкл кожного розведення додавали в 96-ячковий планшет. 10 мкл 10X PBS (що містить 0,5 М трис, pH 7,0) додавали в кожну ямку і підтверджували, що pH був рівний 7. Після інкубування при кімнатній температурі протягом ночі при струшуванні вимірювали мутність при довжині хвилі 370 нм. Граничне значення, при якому виникала мутність, приймали за максимальну розчинність кожного мутеїну. Мутеїни відносили до однієї з п'яти груп залежно від рівня їх розчинності: < 0,2 мг/мл = +; ≥ 0,2 мг/мл = ++; ≥ 0,5 мг/мл = +++; ≥ 1,0 мг/мл = ++++; ≥ 5,0 мг/мл = +++++.

Приклад 1: Конструювання стабілізованої гібридної молекули ЛСА-GDF15

Експресія конструктора M1 виявила проблеми продукції в стабільній лінії клітин CHOK1SV GSKO (фігура 4). У середовищі для культивування клітин відзначали значне укорочування димерної гібридної молекули ЛСА-GDF15. Укорочені різновиди виділяли за допомогою іонообмінної та/або гідрофобної хроматографії та/або гель-фільтрації з метою одержання джерела збагачених різновидів для подальшої оцінки характеристик. Після PX/MC-аналізу на приладі Agilent 6500-series Q-TOF виявили сайти укорочування на С-кінці ЛСА-гібриду, в лінкері та на N-кінці GDF15. Виявлено наступні основні різновиди конструктора M1 (лінкер = підкреслений шрифт, GDF15 = напівжирний шрифт):

Різновид 1 (SEQ ID NO:103):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS
 LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE
 5 NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPV
 SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPK
 ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVA

Різновид 2 (SEQ ID NO:104):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS
 LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE
 15 NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPV
 SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPK
 ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALG

Різновид 3 (SEQ ID NO:105):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS
 LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE
 25 NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPV
 SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPK
 ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLG

Відзначено, що різновид 3 містить амінокислотну послідовність зрілого людського сироваткового альбуміну й одну (першу) амінокислоту послідовності лінкера. У різновидах 1 і 2 не вистачає восьми останніх амінокислот й однієї останньої амінокислоти на С-кінці амінокислотної послідовності зрілого людського сироваткового альбуміну.

Різновид 4 (SEQ ID NO:106):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS
 LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE
 35 NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPV
 SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPK
 ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSAR

Різновид 5 (SEQ ID NO:107):

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS
 LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNE
 ETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLK
 CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE
 40 NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYK
 FQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEYDLSVVLNQLCVLHEKTPV
 SDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPK
 ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGGSGGGGSARN

Для мінімізації та виправлення проблем з укорочуванням поблизу лінкерної області гібридної молекули конструкт M2 зробили еквівалентним конструкту M1, хоча він був укорочений на перші три N-кінцевих залишки GDF15 (ΔARN або ΔN3) (фігура 3). Отриманий стабілізований конструкт M2 при експресії в стабільній лінії клітин CHOK1SV GSKO демонстрував мінімальні проблеми з укорочуванням, що спостерігалися для M1, при порівнянні кондиціонованих середовищ для кожного експресованого конструкта. На фігурі 4

продемонстроване значне укорочування, що спостерігалось для M1, і стабільність конструкта M2.

На підставі поліпшеної стабільності, спостережуваної для конструкта M2, подальше проектування дозволило визначити оптимальну довжину лінкера та можливість укорочування. Лінкери оптимізованої довжини $[(G_4S)]_5$ одержали та приєднали до N-кінцевих делецій 3 залишків (M3 – Δ ARN або ΔN) або 6 залишків (M4 – Δ ARNGDH або ΔN) (див. фігуру 5).

Приклад 2: Вплив стабільності поліпшених гібридних молекул LCA-GDF15 на масу тіла та прийом їжі в моделі DIO миші

Вплив підшкірного введення гібридної молекули, що містить рекомбінантний LCA, об'єднаний з рекомбінантним GDF15 людини, на масу тіла та прийом їжі оцінювали протягом 7 днів. Коротко, гібридні білки M1 (фігура 3), M3 і M4 (фігура 5) вводили в дозах 4 нмоль/кг, 12 нмоль/кг і 40 нмоль/кг у вигляді однократної підшкірної болюсної ін'єкції (10 мл/кг) DIO-мишам масою приблизно 38-40 г. Через 24 години та 7 днів після введення контрольного середовища-носія або гібридних білків виконували моніторинг маси тіла та прийому їжі з метою моніторингу ефективності. Результати, отримані для DIO-мишей, що одержали дозу 40 нмоль/кг, представлені на фігурах 6 і 7.

Як показано на фігурі 6, введення гібридних білків у дозі 40 нмоль/кг (4 нмоль/кг і 12 нмоль/кг не показані) призвело до значного поліпшення з погляду зниження споживання їжі. У кожній групі мишей (n=8) значення p (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001, нз = не значиме) визначали за допомогою Т-критерію Стьюдента для незалежних вибірок при порівнянні споживання їжі при одержанні різних концентрацій з контрольною групою, що одержувала носій, у кожний зазначений момент часу.

На фігурі 6 показано, що введення гібридних білків у порівнянні з контрольним середовищем-носієм через 24 години (1 день) призвело до зниження споживання їжі (середовище-носії = 2,8 г +/- 0,13 гр.): група, що одержувала 4 нмоль/кг (M1=1,9 г +/- 0,25 гр., **; M3=1,8 г +/- 0,18 г, ***; M4=1,8 г +/- 0,10 г, ***), група, що одержувала 12 нмоль/кг (M1=1,5 г +/- 0,19 г, ***; M3=1,9 г +/- 0,16 г, ***; M4=1,7 г +/- 0,12 г, ***), і група, що одержувала 40 нмоль/кг (M1=1,3 г +/- 0,11 г, ***; M3=1,8 г +/- 0,06 г, ***; M4=1,5 г +/- 0,15 г, ***). Введення гібридних молекул у порівнянні з контрольним середовищем-носієм через 7 днів призвело до зниження споживання їжі (середовище-носії = 2,7 г +/- 0,09 г): група, що одержувала 4 нмоль/кг (M1=2,0 +/- 0,18 г, **; M3=2,5 г +/- 0,08 г, нз; M4=2,5 г +/- 0,09 г, нз), група, що одержувала 12 нмоль/кг (M1=2,0 г +/- 0,20 г, **; M3=2,2 г +/- 0,17 г, *; M4=2,4 г +/- 0,28 г, нз) і група, що одержувала 40 нмоль/кг (M1=1,7 г +/- 0,14 г, ***; M3=2,4 г +/- 0,25 г, нз; M4=2,2 г +/- 0,24 г, нз).

Як показано на фігурі 7, введення гібридних молекул у дозі 40 нмоль/кг (4 нмоль/кг і 12 нмоль/кг не показані) призвело до значного зниження маси тіла. У кожній групі мишей (n=8) значення p (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001, нз = не значиме) визначали за допомогою Т-критерію Стьюдента для незалежних вибірок при порівнянні споживання їжі при одержанні різних концентрацій з контрольною групою, що одержувала носій, у кожний зазначений момент часу.

На фігурі 7 показано, що під час обробки (день = 0) до введення гібридних білків або контрольного середовища-носія були зареєстровані наступні значення маси тіла (середовище-носії = 39,0 г +/- 0,92 г): група, що одержувала 4 нмоль/кг (M1=39,2 г +/- 0,66 г; M3=39,4 г +/- 0,91 г; M4=39,3 г +/- 0,77 г), група, що одержувала 12 нмоль/кг (M1=39,4 г +/- 0,78 г; M3=39,3 г +/- 1,09 г; M4=39,3 г +/- 0,81 г), і група, що одержувала 40 нмоль/кг (M1=39,2 г +/- 0,64 г; M3=39,2 г +/- 0,68 г; M4=38,9 г +/- 0,60 г). Через 24 години (день = 1) після введення гібридних молекул і контрольного середовища-носія зареєстрували наступні значення маси тіла (% зниження = дельта (різниця) у порівнянні з масою тіла в групі до введення дози). Середовище-носії = +0,3 г +/- 0,11 г, +0,6 %), група, що одержувала 4 нмоль/кг (M1 = -0,6 г +/- 0,21 г, -1,5 %, ***, M3 = -0,6 г +/- 0,17 г, -1,6 %, ***, M4 = -0,9 г +/- 0,13 г, -2,4 %, ***), група, що одержувала 12 нмоль/кг (M1 = -0,9 г +/- 0,11 г, -2,3 %, ***, M3 = -0,7 г +/- 0,18 г, -1,6 %, ***, M4 = -0,6 г +/- 0,16 г, -1,7 %, ***), і група, що одержувала 40 нмоль/кг (M1 = -1,0 г +/- 0,14 г, -2,5 %, ***, M3 = -0,6 г +/- 0,09 г, -1,5 %, ***, M4 = -0,8 г +/- 0,22 г, -2,1 %, ***). Через 7 днів після введення гібридних молекул і контрольного середовища-носія зареєстрували наступні значення маси тіла (% зниження = дельта (різниця) у порівнянні з масою тіла в групі до введення дози). Середовище-носії = +1,2 г +/- 0,25 г, +3,1 %), група, що одержувала 4 нмоль/кг (M1 = -1,3 г +/- 0,30 г, -3,3 %, ***, M3 = -1,1 г +/- 0,32 г, -2,8 %, ***, M4 = -2,0 г +/- 0,29 г, -5,0 %, ***), група, що одержувала 12 нмоль/кг (M1 = -1,8 г +/- 0,34 г, -4,7 %, ***, M3 = -1,4 г +/- 0,43 г, -3,6 %, ***, M4 = -1,5 г +/- 0,32 г, -3,7 %, ***), і група, що одержувала 40 нмоль/кг (M1 = -2,6 г +/- 0,28 г, -6,7 %, ***, M3 = -2,1 г +/- 0,28 г, -5,4 %, ***, M4 = -2,6 г +/- 0,31 г, -6,7 %, ***)).

Дані на фігурах 6 і 7 показують, що гібриди ЛСА з оптимізованим лінкером і GDF15, укороченим за N-кінцем, є активними, і що такі гібридні молекули являють собою життєздатний підхід для підвищення певних вигідних властивостей молекул GDF15.

Приклад 3: Мутеїни GDF15 людини з поліпшеними фізичними властивостями

Дані, викладені у прикладі 3, спрямовані на усунення обмежень розчинності, пов'язані з гідрофобністю та гідрофільністю поверхні, властиву зрілому GDF15 людини. Крім того, виконана оцінка впливу введення консенсусного(их) сайту(ів) N-зв'язаного глікозилювання у послідовність зрілого GDF15 людини на розчинність. Для полегшення оцінки характеристик експресії; параметрів глікозилювання та розчинності зрілих рекомбінантних мутеїнів GDF15 людини, всі мутеїни сконструювали у вигляді зрілих мутеїнів, об'єднаних з послідовністю сигнального пептиду IgK, зображених на фігурі 8A. Одержали 17 мутеїнів GDF15 (позначені як M5-M21; SEQ ID NO: 81-97, відповідно). Для M16 одержали варіант із N-кінцевою делецією: мутеїн Δ N3-M16, і виконали оцінку його розчинності. Мутеїн M5 містив два консенсусних сайти N-зв'язаного глікозилювання, впроваджені шляхом заміни D у положенні 5 в GDF15 дт (SEQ ID NO: 1) на T і заміни R у положенні 21 GDF15 дт (SEQ ID NO: 1) на N. У мутеїні M6-M21 ввели один консенсусний сайт N-зв'язаного глікозилювання (див. фігуру 8A). Слід зазначити, що, хоча мутеїни містять сигнальну послідовність IgK на N-кінці з метою вказівки положення заміни, залишки нумерують відповідно до положення відповідного залишку в SEQ ID NO: 1. Так, наприклад, хоча T присутній у мутеїні M5 у положенні 27, його вважають положенням 5, оскільки положення відповідного залишку D в SEQ ID NO: 1 відповідає 5.

Оцінку розчинності виконували стосовно мутеїнів (в 0,01 % мурашиній кислоті), додаючи 10X PBS+0,5 M трис рН 7,0, твердий буфер, у якому можна виконати оцінку поліпшення розчинності мутеїну в порівнянні зі зрілим GDF15 людини.

Оцінку розчинності виконували на підставі оптичної щільності при довжині хвилі 280 нм за законом Бера, розраховуючи її з використанням коефіцієнта екстинкції (зрілий GDF15 людини = 14400/мономер) і молекулярної маси (зрілий GDF15 людини = 12278 Да/мономер).

Перед оцінкою розчинності кожний з сконструйованих N-глікозилюваних мутеїнів на фігурі 8A та мутеїн Δ N3-M16 оцінювали на предмет секреції у вигляді укладеного гомодимера GDF15 в середовище для тканинних культур ссавців і на зайнятість сайту N-гліканом. Як зазначено на фігурі 9, чотирнадцять з вісімнадцяти глікозилюваних мутеїнів секретувались у вигляді укладених гомодимерів GDF15, у той час як M8, M10, M14 і M15 не утворювали димерів й експресувались у вигляді агрегатів. Потім всі чотирнадцять експресованих глікозилюваних мутеїнів, що секретувались у вигляді гомодимерів, оцінювали за допомогою РХ/МС, і зрушення гелю при електрофорезі в ДСН-ПААГ з метою визначення присутності N-гліканових груп у консенсусному сайті після очищення від кондиціонованого середовища. У всіх 14 випадках експресовані мутеїни характеризувались високим ступенем зайнятості, і даний субнабір аналізували на предмет поліпшення фізичних властивостей, наприклад, розчинності.

Сконструйовані N-глікозилювані мутеїни GDF15, що секретувались у вигляді гомодимерів і мали високий ступінь зайнятості консенсусного сайту гліканом, піддавали моніторингу на предмет поліпшення розчинності у порівнянні із зрілим GDF15 людини. Граничне значення, при якому виникала мутність, приймали за максимальну розчинність кожного мутеїну. Мутеїни відносили до однієї з п'яти груп залежно від рівня їх розчинності: < 0,2 мг/мл =+; \geq 0,2 мг/мл =++; \geq 0,5 мг/мл =+++; \geq 1,0 мг/мл =++++; \geq 5,0 мг/мл =+++++. Кожний з N-глікозилюваних мутеїнів GDF15, що піддавалися оцінці, демонстрував поліпшену розчинність у порівнянні із зрілим GDF15 людини: M5: +++++, M7: +++, M11: +++, M12: +++, M13: +++++, M16: +++++, Δ N3-M16: +++++, M17: +++++, M20: +++++, M21: +++.

Приклад 4: Вплив мутеїнів M16, Δ N3-M16 і M17 на споживання їжі в моделі DIO миші

Оцінювали вплив підшкірно введених глікомутеїнів на споживання їжі. Глікомутеїн M16 (SEQ ID NO: 92) і M17 (SEQ ID NO: 93) описані вище у прикладі 3. Крім того, виконали оцінку глікомутеїну, позначеного як Δ N3-M16. Послідовність глікомутеїну Δ N3-M16 представлена нижче:

mdmrvpaqlgllllwlgarcGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 100)

Слід зазначити, що поліпептиди, які вводять мишам, не містили сигнальної послідовності IgK (mdmrvpaqlgllllwlgarc, SEQ ID NO: 101), оскільки сигнальна послідовність IgK відщеплялася від секретованого поліпептиду сигнальною пептидазою, експресованою клітинами (клітинами 293).

На фігурі 10 показано, що підшкірне введення однократної дози 1,0 мг/кг (40 нмоль/кг) середовища-носія (PBS), зрілого GDF15 людини або N-глікозилюваного мутеїну здійснювали 17-тижневим самцям DIO мишей (n=9). Виконували моніторинг споживання їжі (грам/тварина)

протягом 24 годин після підшкірного введення. Значення p визначали за допомогою Т-критерію Стьюдента для незалежних вибірок у порівнянні з групою, що одержувала середовище-носії (PBS).

5 Як показано на фігурі 10, введення глікомутеїнів призвело до зниження споживання їжі. У кожній групі мишей значення p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) визначали за допомогою Т-критерію Стьюдента для незалежних вибірок при порівнянні споживання їжі з контрольною групою, що одержувала середовище-носії. GDF15 дикого типу також знижував споживання їжі.

Приклад 5: Вплив мутеїнів M16, $\Delta N3$ -M16 і M17 на масу тіла в моделі DIO миші

10 Оцінювали вплив підшкірно введених глікомутеїнів на масу тіла. Підшкірне введення однократної дози 1,0 мг/кг (40 нмоль/кг) середовища-носія (PBS), зрілого GDF15 людини або N-глікозилізованого мутеїну (M16, M17 і $\Delta N3$ -M16) здійснювали 17-тижневим самцям DIO мишей ($n=9$). Виконували моніторинг маси тіла протягом 24 годин після підшкірного введення. Значення p визначали за допомогою Т-критерію Стьюдента для незалежних вибірок у порівнянні з групою, що одержувала середовище-носії (PBS).

15 Введення глікомутеїнів призвело до зниження маси тіла (фігура 11). У кожній групі мишей значення p (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) визначали за допомогою Т-критерію Стьюдента для незалежних вибірок при порівнянні споживання їжі з контрольною групою, що одержувала середовище-носії. GDF15 дикого типу також знижував масу тіла.

20 У даному документі описані конкретні варіанти реалізації даного винаходу, включаючи найкращі способи його здійснення, відомі авторам. При читанні вищенаведеного опису для осіб, що працюють в даній області техніки, можуть стати очевидні зміни описаних варіантів реалізації, і очікується, що досвідчені фахівці можуть при необхідності використовувати такі зміни. Відповідно, передбачається, що на практиці винахід буде використаний інакше, ніж описано у даному документі, і що даний винахід включає всі модифікації та еквіваленти предмета винаходу, викладені у формулі винаходу, прикладеної до даного документа

25 відповідно до діючого законодавства. Крім того, будь-яка комбінація вищеописаних елементів у всіх їх можливих варіантах охоплюється винаходом, якщо інше не зазначено у даному документі, або іншим способом явно не суперечить контексту.

30 Всі публікації, патентні заявки, облікові номери та інші джерела, згадані в даному описі, включені у даний документ за допомогою посилань для всіх цілей, як якби кожна окрема публікація, патент або патентна заявка були спеціально й окремо включені за допомогою посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> NGM Biopharmaceuticals, Inc.
Lindhout, Darrin A
Haldankar, Raj
Tian, Hui

<120> КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ РОЗЛАДІВ

<130> NGMB-139WO

<150> US 62/031,063
<151> 2014-07-30

<160> 127

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 2
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 2

Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys

35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 3

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Asn
1 5 10 15

Leu Thr Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 4

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp

20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 5
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 5

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 6

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg

1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Asn Gln Thr Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 7

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Asn Phe Thr Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 8

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

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 9

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

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 10

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Asn
50 55 60

Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 11

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Asn His Thr Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 12

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Asn Tyr Thr Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
 100 105 110

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 13

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
 1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
 20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
 35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
 50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 14

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 15

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gly Thr
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 16

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Asn
85 90 95

Ser Thr Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 17

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 18

Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg
1 5 10 15

Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp
20 25 30

Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser
50 55 60

Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val
85 90 95

Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn Lys Thr Cys His Cys Ile
100 105 110

<210> 19
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 19

Gly Thr His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 20
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 20

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Asn Leu Thr Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 21

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 22
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 22

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 23
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 23

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Asn Gln
35 40 45

Thr Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 24
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 24

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Asn
35 40 45

Phe Thr Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 25
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 25

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Asn Arg Thr Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 26
<211> 109
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 26

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Asn Ala Thr Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 27
<211> 109
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 27

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 28

<211> 109

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 28

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Asn His Thr
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 29

<211> 109
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 29

```
Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1          5          10          15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
          20          25          30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
          35          40          45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
          50          55          60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Asn Tyr
65          70          75          80

Thr Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
          85          90          95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
          100          105
```

<210> 30
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 30

```
Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1          5          10          15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
          20          25          30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
          35          40          45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
          50          55          60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65          70          75          80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln
          85          90          95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
```

100

105

<210> 31
<211> 109
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 31

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 32
<211> 109
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 32

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Asn Gly Thr Ser Leu Gln

85

90

95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 33
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 33

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Asn Ser Thr Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 34
<211> 109
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 34

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr

65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Asn Leu Thr
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
100 105

<210> 35
<211> 109
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 35

Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr
1 5 10 15

Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser
20 25 30

Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln
35 40 45

Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg
50 55 60

Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln
85 90 95

Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn Lys Thr Cys His Cys Ile
100 105

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 36

Arg Gly Arg Arg
1

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 37

Arg Lys Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 38

Arg Lys Lys Arg
1

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 39

Arg Arg Arg Lys Lys Arg
1 5

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 40

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 41

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 42

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 43

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 44

Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 45

Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 46

Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 47

Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5

<210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 48
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Glu Gly Arg
 1 5 10

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 49
 Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 50
 Glu Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 51
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> амінокислота у цьому положенні може бути будь-якою амінокислотою

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> амінокислота у цьому положенні може бути будь-якою гідрофобною амінокислотою

<400> 51
 Pro Хаа Хаа Хаа
 1

<210> 52
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> амінокислота у цьому положенні може бути будь-якою амінокислотою

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> амінокислота у цьому положенні може бути будь-якою гідрофобною амінокислотою

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> амінокислота у цьому положенні може бути Ser або Thr

<400> 52

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> амінокислота у цьому положенні може бути Leu або Gln

<400> 53

Pro Xaa Gly Met Thr Ser
1 5

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> амінокислота у цьому положенні може бути Leu або Gln

<400> 54

Pro Xaa Gly Met Thr
1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 55

Cys Gly Leu Val Pro Ala Gly Ser Gly Pro
 1 5 10

<210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 56

Ser Leu Leu Lys Ser Arg Met Val Pro Asn Phe Asn
 1 5 10

<210> 57
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 57

Ser Leu Leu Ile Ala Arg Arg Met Pro Asn Phe Asn
 1 5 10

<210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 58

Ser Lys Leu Val Gln Ala Ser Ala Ser Gly Val Asn
 1 5 10

<210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність
 <400> 59

Ser Ser Tyr Leu Lys Ala Ser Asp Ala Pro Asp Asn
 1 5 10

<210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 60

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met Asn
1 5 10

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 61

Ser Leu Arg Pro Leu Ala Leu Trp Arg Ser Phe Asn
1 5 10

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 62

Ser Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 63

Asp Val Asp Glu Arg Asp Val Arg Gly Phe Ala Ser Phe Leu
1 5 10

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 64

Ser Leu Pro Leu Gly Leu Trp Ala Pro Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 65

Ser Leu Leu Ile Phe Arg Ser Trp Ala Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 66

Ser Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr
1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 67

Ser Leu Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Phe Asn
1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 68

Lys Lys Ser Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Ser Val
1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 69

Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly
1 5 10

<210> 70

<211> 31

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 70

His Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Val Met
1 5 10 15

Gly Arg Gly His Ala Arg Leu Val His Val Glu Glu Pro His Thr
20 25 30

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 71

Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val
1 5 10

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 72

Gly Gly Ser Gly Gln Arg Gly Arg Lys Ala Leu Glu
1 5 10

<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 73

Ser Leu Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Phe Asn
1 5 10

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 74

Ser Leu Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Phe Asn
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 75

Ser Leu Leu Gly Ile Ala Val Pro Gly Asn Phe Asn
1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 76

Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro
1 5 10

<210> 77

<211> 734

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 77

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 180 185 190
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 195 200 205
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 210 215 220
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 245 250 255
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 260 265 270
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 275 280 285
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 290 295 300
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 305 310 315 320
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 325 330 335
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 340 345 350
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 355 360 365
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 370 375 380
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 385 390 395 400
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 405 410 415
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460

Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
465 470 475 480

Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
485 490 495

Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
500 505 510

Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
515 520 525

Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
530 535 540

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg
610 615 620

Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His
625 630 635 640

Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu
645 650 655

Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser
660 665 670

Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His
675 680 685

Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser
690 695 700

Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu
705 710 715 720

Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
725 730

<210> 78
<211> 731

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
130 135 140

Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
145 150 155 160

Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
165 170 175

Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
180 185 190

Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
195 200 205

Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
210 215 220

Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
225 230 235 240

Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
245 250 255

Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 260 265 270
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 275 280 285
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 290 295 300
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 305 310 315 320
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 325 330 335
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 340 345 350
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 355 360 365
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 370 375 380
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 385 390 395 400
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 405 410 415
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 515 520 525
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 530 535 540

Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
545 550 555 560

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
565 570 575

Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
580 585 590

Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
595 600 605

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Asp
610 615 620

His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg
625 630 635 640

Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg
645 650 655

Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg
660 665 670

Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys
675 680 685

Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro
690 695 700

Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr
705 710 715 720

Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
725 730

<210> 79
<211> 741
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 79

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

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

Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 355 360 365
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 370 375 380
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 385 390 395 400
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 405 410 415
 Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 515 520 525
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 530 535 540
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 545 550 555 560
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 565 570 575
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 580 585 590
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 610 615 620
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro
 625 630 635 640

Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu
645 650 655

Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met
660 665 670

Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala
675 680 685

Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala
690 695 700

Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys
705 710 715 720

Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
725 730 735

Asp Cys His Cys Ile
740

<210> 80
<211> 738
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність
<400> 80

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg
20 25 30

Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala
35 40 45

Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu
50 55 60

Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser
65 70 75 80

Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu
85 90 95

Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys
100 105 110

Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys
115 120 125

Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val
 130 135 140
 Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr
 145 150 155 160
 Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu
 165 170 175
 Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln
 180 185 190
 Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg
 195 200 205
 Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser
 210 215 220
 Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
 245 250 255
 Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu
 260 265 270
 Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu
 275 280 285
 Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro
 290 295 300
 Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met
 305 310 315 320
 Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp
 325 330 335
 Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe
 340 345 350
 Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu
 355 360 365
 Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala
 370 375 380
 Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys
 385 390 395 400
 Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu
 405 410 415

Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg
 420 425 430
 Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val
 435 440 445
 Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu
 450 455 460
 Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn
 465 470 475 480
 Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr
 485 490 495
 Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala
 500 505 510
 Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr
 515 520 525
 Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln
 530 535 540
 Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
 545 550 555 560
 Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe
 565 570 575
 Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu
 580 585 590
 Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 610 615 620
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys
 625 630 635 640
 Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
 645 650 655
 Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
 660 665 670
 Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
 675 680 685
 Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
 690 695 700

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
705 710 715 720

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
725 730 735

cys ile

<210> 81
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 81

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Thr His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Asn Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 82
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 82

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Asn Leu Thr Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 83
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 83

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Asn Leu Thr Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 84
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 84

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Asn Glu Thr
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 85
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 85

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Asn Gln Thr Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 86
<211> 134
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 86

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Asn Phe Thr Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 87
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 87

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Asn Arg Thr Ala Asn Met His
 65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 88
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 88

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
 20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
 35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
 50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Asn Ala Thr Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 89
<211> 134
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність
<400> 89

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Asn Leu Thr Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 90
<211> 134
<212> PRT
<213> штучна послідовність
<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 90

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Asn His Thr Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 91

<211> 134

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 91

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Asn Tyr Thr Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 92
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 92

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Asn Thr Thr Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 93
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 93

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asn Thr Thr Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 94
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 94

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Asn Gly Thr Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 95
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 95

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Asn Ser Thr Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 96
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 96

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Asn Leu Thr Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
130

<210> 97
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 97

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp
35 40 45

Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr
50 55 60

Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His
65 70 75 80

Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro
85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Asn
115 120 125

Lys Thr Cys His Cys Ile
130

<210> 98
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична полінуклеотидна послідовність

 <400> 98
 caccatggac atgaggggtcc ccgctcagct cctgggggtc ctgctactct ggctccgagg 60
 tgccagatgt 70

 <210> 99
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична полінуклеотидна послідовність

 <400> 99
 cctcgagcgg ccgctagctc atatgcagtg gcagtccttg gctaaca 48

 <210> 100
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

 <400> 100
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg
 20 25 30

 Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp
 35 40 45

 Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile
 50 55 60

 Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile
 65 70 75 80

 Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys
 85 90 95

 Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Asn Thr Thr
 100 105 110

 Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys
 115 120 125

 His Cys Ile
 130

<210> 101
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична поліпептидна послідовність

<400> 101

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
 20

<210> 102
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична полінуклеотидна послідовність

<400> 102
 ctccgaggtg ccagatgtgc gcgcaacggg gacctgtc cgctcggg

48

<210> 103
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний поліпептид

<400> 103

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175
 Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala

<210> 104

<211> 584

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний поліпептид

<400> 104

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

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

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 580
 <210> 105
 <211> 586
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 <220>
 <223> синтетичний поліпептид
 <400> 105
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

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

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly
 580 585

<210> 106
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний поліпептид

<400> 106

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg
595 600

<210> 107

<211> 603

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний поліпептид

<400> 107

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
 195 200 205
 Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
 210 215 220
 Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
 225 230 235 240
 Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
 245 250 255
 Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
 260 265 270
 Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
 275 280 285
 Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
 290 295 300
 Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg Asn
595 600

<210> 108
<211> 405
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 108
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgcgc gcaacgggac tcaactgtccg ctccgggccc ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtcaacg cgtcgtgga agacctgggc tgggcccatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 109
<211> 405
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 109
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccc ggctgtgctg caatctgacc 120
acgggtccgc cgtcgtgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgt gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccag gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 110
<211> 405
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 110
atggacatga ggggtccccg tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccc ggctgtgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgaacctgac ggacctgggc tgggccgatt ggggtgctgt gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccag gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 111
<211> 405
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 111
atggacatga ggggtccccg tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccc ggctgtgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgtcgaatga aacctgggc tgggccgatt ggggtgctgt gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccag gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 112
<211> 405
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 112
atggacatga ggggtccccg tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

```

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctcggggccc ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgtcgtgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgaaccaga cccgggaggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

```

<210> 113
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

```

<400> 113
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctcggggccc ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgtcgtgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagcaact tcacggcggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

```

<210> 114
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

```

<400> 114
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctcggggccc ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgc cgtcgtgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccaga accggacggc aaacatgcac 240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cggtgccagc gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc 360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

```

<210> 115
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

```

<400> 115
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

```


agatgtgctg gcaacgggga ccaactgtccg ctctgggccc ggcgttgctg ccgtctgcac	120
acgggtccgc cgctcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag	180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgct cggagccagt tcaacgcgac gaacatgcac	240
gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagccccgaca cggtgccagc gccctgctgc	300
gtgcccgcga gctacaatcc catgggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc	360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga	405

<210> 116
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 116	
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc	60
agatgtgctg gcaacgggga ccaactgtccg ctctgggccc ggcgttgctg ccgtctgcac	120
acgggtccgc cgctcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag	180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgct cggagccagt tccgggcggc aaacatgcac	240
gcgcagatca agacgaacct gacgcgcctg aagccccgaca cggtgccagc gccctgctgc	300
gtgcccgcga gctacaatcc catgggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc	360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga	405

<210> 117
 <211> 402
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 117	
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc	60
agatgtgctg gcaacgggga ccaactgtccg ctctgggccc ggcgttgctg ccgtctgcac	120
acgggtccgc cgctcgctgga agacctgggc tgggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag	180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgctgct cggagccagt tccgggcggc aaacatgcac	240
gcgcagatca agacgagcaa ccacaccctg aagccccgaca cggtgccagc gccctgctgc	300
gtgcccgcga gctacaatcc catgggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc	360
cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca ta	402

<210> 118
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 118	
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc	60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctggggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
 acgggtccgc cgctgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
 gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc 300
 gtgcccgcga actacactcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgctc 360
 cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 119
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 119
 atggacatga ggggtcccg ctagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
 agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctggggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
 acgggtccgc cgctgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
 gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc 300
 gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccaccaccgg ggtgtcgctc 360
 cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 120
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 120
 atggacatga ggggtcccg ctagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
 agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctggggcccg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
 acgggtccgc cgctgctgga agacctgggc tggggccgatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggaggc aaacatgcac 240
 gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagaca cggtgccagc gccctgctgc 300
 gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccaacaccac ggtgtcgctc 360
 cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

<210> 121
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 121
 atggacatga ggggtcccg ctagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgсgc gcaacgggga cсactgtccg ctсgggссcg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acggтссcgс cgтсgтgga agacctgggc tgggссgatt gggтgтgтc gccacgggag 180
gtgcaagtga cсatgtgсat cggсgсgtgс cсgagccagt тссgggсggс aaсatgсac 240
gсgсagatсa agacgagсct gсaccgсctg aagсссgaca cggтgссagс gccтgтgтc 300
gtgсссgссa gтacaatсс catggтgтc attcaaaaga cсgacaсcg gacгтсгтс 360
cagacctatg atgacttgтt agссaaagac тgссactgсa tatga 405

<210> 122
<211> 405
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 122
atggacatga gggтссссgс тсagтсctg gggтсctgс tactтгггt cсgaggтgсс 60
agatgtgсgc gcaacgggga cсactgtccg ctсgggссcg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acggтссcgс cgтсgтgga agacctgggc tgggссgatt gggтgтgтc gccacgggag 180
gtgcaagtga cсatgtgсat cggсgсgtgс cсgagccagt тссgggсggс aaсatgсac 240
gсgсagatсa agacgagсct gсaccgсctg aagсссgaca cggтgссagс gccтgтgтc 300
gtgсссgссa gтacaatсс catggтgтc attcaaaaga cсgacacсgg gaactггacс 360
cagacctatg atgacttgтt agссaaagac тgссactgсa tatga 405

<210> 123
<211> 405
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 123
atggacatga gggтссссgс тсagтсctg gggтсctgс tactтгггt cсgaggтgсс 60
agatgtgсgc gcaacgggga cсactgtccg ctсgggссcg ggcgttgctg ccgtctgcac 120
acggтссcgс cgтсgтgga agacctgggc tgggссgatt gggтgтgтc gccacgggag 180
gtgcaagtga cсatgtgсat cggсgсgtgс cсgagccagt тссgggсggс aaсatgсac 240
gсgсagatсa agacgagсct gсaccgсctg aagсссgaca cggтgссagс gccтgтgтc 300
gtgсссgссa gтacaatсс catggтgтc attcaaaaga cсgacacсgg ggtgaacтс 360
acgacctatg atgacttgтt agссaaagac тgссactgсa tatga 405

<210> 124
<211> 405
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 124
atggacatga gggтссссgс тсagтсctg gggтсctgс tactтгггt cсgaggтgсс 60

agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctctgggccc ggctgtgctg ccgtctgcac 120
acgggtccgcg cgtcgtgga agacctgggc tgggcccatt ggggtgctgt gccacgggag 180
gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccgggcggc aaacatgcac 240
gctcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccgaca cgggtgccag gccctgctgc 300
gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc 360
cagacctatg atgacttggt aaacaaaacc tgccactgca tatga 405

<210> 125
<211> 396
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 125
atggacatga ggggtccccg tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgtgggg accactgtcc gctcggggcc gggcgttctg gccgtctgca caggtccgc 120
gcgtcgtgga aagacctggg ctgggcccgt tgggtgctgt cgccacggga ggtgcaagt 180
accatgtgca tcggcgcgtg cccgagccag ttccgggcgg caaacatgca cgcgcagatc 240
aagacgagcc tgcaccgcct gaagcccgac acgggtgccag cgccctgctg cgtgcccgcc 300
agctacaatc ccatggtgct cattcaaaac accaccaccg ggggtgtcgt ccagacctat 360
gatgacttgt tagccaaaga ctgccactgc atatga 396

<210> 126
<211> 134
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний поліпептид

<400> 126

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

Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln
 100 105 110

Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala
 115 120 125

Lys Asp Cys His Cys Ile
 130

<210> 127
 <211> 405
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 127
 atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
 agatgtgctg gcaacgggga ccactgtccg ctcgggcccgc ggcgttgctg ccgtctgcac 120
 acgggtccgcg cgtcgtctga agacctgggc tgggcccatt ggggtgctgtc gccacgggag 180
 gtgcaagtga ccatgtgcat cggcgcgtgc ccgagccagt tccggggggc aaacatgcac 240
 gcgcagatca agacgagcct gcaccgcctg aagcccagca cggtgccagc gccctgctgc 300
 gtgcccgcga gctacaatcc catggtgctc attcaaaaga ccgacaccgg ggtgtcgtc 360
 cagacctatg atgacttggt agccaaagac tgccactgca tatga 405

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Димер, який містить два поліпептиди, ковалентно приєднані один до одного, причому кожен із зазначених двох поліпептидів містить одну з таких амінокислотних послідовностей:
 i) SEQ ID NO: 30; або
 ii) SEQ ID NO: 30 із заміною треоніну (Т) у положенні 90 серином (S).
- 10 2. Димер за п. 1, причому кожен із зазначених двох поліпептидів містить амінокислотну послідовність: SEQ ID NO: 30.
3. Димер за п. 1, причому кожен із зазначених двох поліпептидів містить амінокислотну послідовність: SEQ ID NO: 30 із заміною треоніну (Т) у положенні 90 серином (S).
4. Димер за будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що щонайменше один із зазначених двох поліпептидів об'єднаний з гетерологічним поліпептидом, необов'язково - цей
- 15 гетерологічний поліпептид може бути сироватковим альбуміном, білком, що зв'язує мальтозу, або імуноглобуліновим Fc-поліпептидом, при цьому цей гетерологічний поліпептид кон'югований з N-кінцем або C-кінцем згаданого щонайменше одного із зазначених поліпептидів.
5. Димер за п. 4, який **відрізняється** тим, що згаданий гетерологічний поліпептид є
- 20 сироватковим альбуміном, і зазначений сироватковий альбумін є людським сироватковим альбуміном, сироватковим альбуміном яванської макаки або бичачим сироватковим альбуміном.
6. Димер за п. 4, який **відрізняється** тим, що гетерологічний поліпептид є людським імуноглобуліновим Fc-поліпептидом.
7. Димер за будь-яким із пп. 1-6, причому зазначений димер є N-глікозильованим.
8. Димер за п. 7, причому цей димер є гомодимером, в якому два зазначені поліпептиди містять однакову амінокислотну послідовність.
9. N-глікозильований димер, який містить два поліпептиди, ковалентно приєднані один до одного, причому кожний із зазначених двох поліпептидів містить амінокислотну послідовність
- 30 SEQ ID NO: 30.
10. N-глікозильований димер за п. 9, де кожний із зазначених двох поліпептидів складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 30.
11. Фармацевтична композиція, яка містить димер за будь-яким із пп. 1-8 і фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або допоміжну речовину.

12. Фармацевтична композиція, яка містить:
N-глікозилований димер, який містить два поліпептиди, ковалентно приєднані один до одного, причому кожний із зазначених двох поліпептидів включає в себе амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30;
- 5 і фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або допоміжну речовину.
13. Фармацевтична композиція, яка містить:
N-глікозилований димер, який містить два поліпептиди, ковалентно приєднані один до одного, причому кожний із зазначених двох поліпептидів складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 30;
- 10 і фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або допоміжну речовину.
14. Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує щонайменше один із зазначених поліпептидів димера за будь-яким із пп. 1-10.
15. Вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 14.
16. Клітина-хазяїн, яка експресує димер за будь-яким із пп. 1-10.
17. Клітина-хазяїн, яка експресує молекулу нуклеїнової кислоти за п. 14.
18. Спосіб одержання димера за п. 1, який включає:
культивування клітини-хазяїна, що експресує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність:
i) SEQ ID NO: 30; або
- 20 ii) SEQ ID NO: 30 із заміною треоніну (T) у положенні 90 серином (S); і
очищення експресованого димеру.
19. Спосіб лікування ожиріння у суб'єкта-ссавця, який включає введення цьому суб'єкту димеру за будь-яким із пп. 1-10, причому зазначений димер вводять в кількості, ефективній для лікування ожиріння у цього суб'єкта.
- 25 20. Спосіб лікування гіперглікемії у суб'єкта-ссавця, причому зазначений спосіб включає введення цьому суб'єкту димеру за будь-яким із пп. 1-10, причому зазначений димер вводять в кількості, ефективній для лікування гіперглікемії у цього суб'єкта.
21. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що лікування приводить до зниження споживання їжі суб'єктом.
- 30 22. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що зазначений суб'єкт є людиною, і лікування приводить до зниження маси тіла у цього суб'єкта.
23. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що лікування приводить до зниження маси тіла у згаданого суб'єкта.
24. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що лікування приводить до зниження споживання їжі згаданим суб'єктом.
- 35 25. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що зазначений суб'єкт є людиною, і лікування приводить до зниження рівня глюкози в крові у цього суб'єкта.
26. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що зазначений суб'єкт страждає на цукровий діабет.
- 40 27. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що згаданий суб'єкт є людиною.
28. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що згаданий суб'єкт є людиною.
29. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що згаданий суб'єкт страждає на ожиріння.
30. Спосіб за будь-яким із пп. 19-29, який **відрізняється** тим, що введення здійснюють за допомогою парентеральної ін'єкції.
- 45 31. Спосіб за п. 30, який **відрізняється** тим, що парентеральна ін'єкція є підшкірною.

Мутанти за глікозилюванням (номери 1-17; SEQ ID NO: 2 -18), вирівняні з GDF15 дикого типу (SEQ ID NO: 1)

	1	10	20	30	40	50	
ДТ	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
1	ARNGTHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
2	ARNGDHCPLGPGRCCLNTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
3	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
4	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASNETLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
5	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPNQTRAANMHAQ	60					
6	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSNFTAANMHAQ	60					
7	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQNRTANMHAQ	60					
8	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFNATNMHAQ	60					
9	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
10	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
11	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
12	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
13	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
14	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
15	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
16	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
17	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQ	60					
		70	80	90	100	110	
ДТ	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:1)					
1	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:2)					
2	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:3)					
3	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:4)					
4	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:5)					
5	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:6)					
6	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:7)					
7	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:8)					
8	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:9)					
9	IKTNLTRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:10)					
10	IKTSNHLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:11)					
11	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPANYTPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:12)					
12	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:13)					
13	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKNTTGTGVSQTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:14)					
14	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:15)					
15	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGNSTQTYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:16)					
16	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVNLTYYDDLLAKDCHCI	(SEQ ID NO:17)					
17	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSQTYYDDLLNKTCHCI	(SEQ ID NO:18)					

Fig. 1

Мутанти $\Delta N3$ за глікозилюванням (номери 18-34; SEQ ID NO: 19-35), вирівняні з GDF15 дикого типу (SEQ ID NO: 1)

	1	10	20	30	40	50	
ДТ	ARNGDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
18	GTHCPLGPGRCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
19	GDHCPLGPGRCNLTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
20	GDHCPLGPGRCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
21	GDHCPLGPGRCRLHTVRSNETLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
22	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPNQTRAANMHAQ 60						
23	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSNFTAANMHAQ 60						
24	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQNRATANMHAQ 60						
25	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFNATNMHAQ 60						
26	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
27	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
28	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
29	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
30	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
31	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
32	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
33	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
34	GDHCPLGPGRCRLHTVRSLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQ 60						
	61	70	80	90	100	110	
ДТ	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 1)						
18	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 19)						
19	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 20)						
20	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 21)						
21	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 22)						
22	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 23)						
23	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 24)						
24	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 25)						
25	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 26)						
26	IKTNLTRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 27)						
27	IKTSNHTLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 28)						
28	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPANYTPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 29)						
29	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTIGVSQTYYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 30)						
30	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKNTTIVSLQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 31)						
31	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 32)						
32	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGNTSTQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 33)						
33	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVNLTQTYDILLAKDCHCI (SEQ ID NO: 34)						
34	IKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSQTYYDILLNKTCHCI (SEQ ID NO: 35)						

Фіг. 2

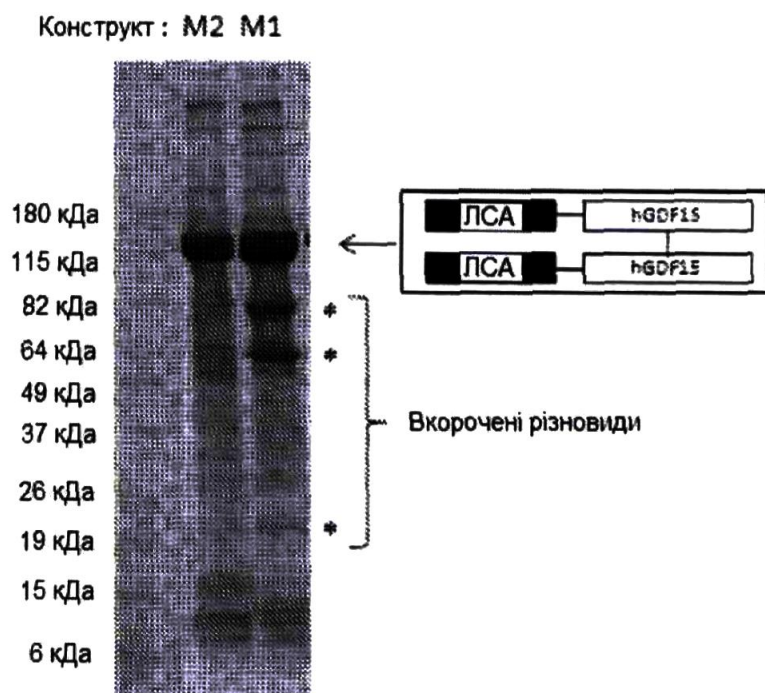
Гібридний білок M1: Сигнальна послідовність IgK (нижній регістр), об'єднана з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднана з лінкером [(Gly-Ser)₃] (підкреслений шрифт) на N-кінці зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт) (SEQ ID NO: 77)

mdmrvpagllgllllwlgarcDAHKSEVAHREFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCA SLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLT KVHTECCGHDLL ECADDRADLAKYICENQDS ISSKLKECCEKPLEK
SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCAA
ADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKQTALVELVKNKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGLGGGGSGGGG
SGGGGSARNGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
TVPA PCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI

Гібридний білок M2: Сигнальна послідовність IgK (нижній регістр), об'єднана з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднана з лінкером [(Gly-Ser)₃] (підкреслений шрифт) на N-кінці зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт), що містить делецію 3 амінокислот (ΔARN) (SEQ ID NO: 78)

mdmrvpagllgllllwlgarcDAHKSEVAHREFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCA SLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLT KVHTECCGHDLL ECADDRADLAKYICENQDS ISSKLKECCEKPLEK
SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCAA
ADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNL IKQNCLEFQELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKQTALVELVKNKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGLGGGGSGGGG
SGGGGSGDHCPLGPGRCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPD
TVPA PCVPASYNPMVLIQKTDGTGVS LQTYDDLLAKDCHCI

Фіг. 3



Фіг. 4

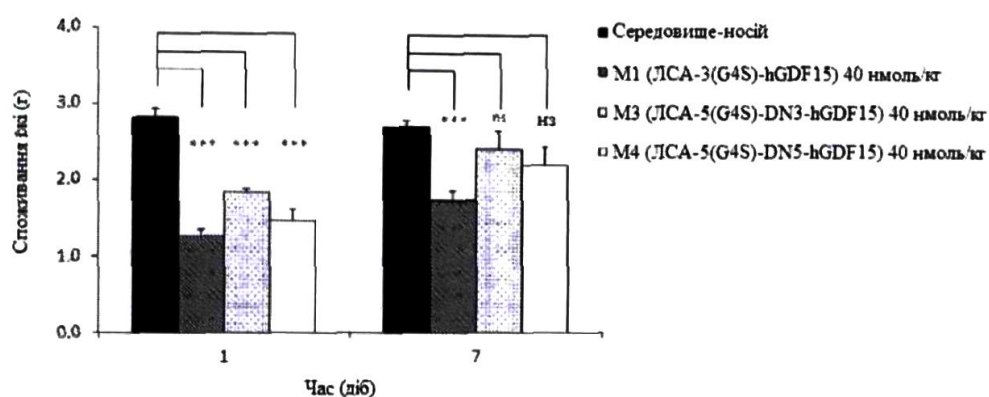
Гібридний білок М3: Сигнальна послідовність IgK (нижній регістр), об'єднана з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднаною з лінкером [(Gly₄-Ser)₅] (підкреслений шрифт) на N-кінці амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт), що містить делецію 3 амінокислот (позначену як ΔARN або ΔN3) (SEQ ID NO: 79)

mdmrvpaglllgllllwlgarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLNVNEVEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCAQLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEK
SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAA
ADPHESYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGG
SGGGSGGGSGGGSGG**GDHCP****LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV****TMIGACPSQFRAANMHAQIKTS**
LHRLKPD**TVAPCCVPASYNPMVLIQKTD****TGVS****LQTYDDLLAKDCHCI**

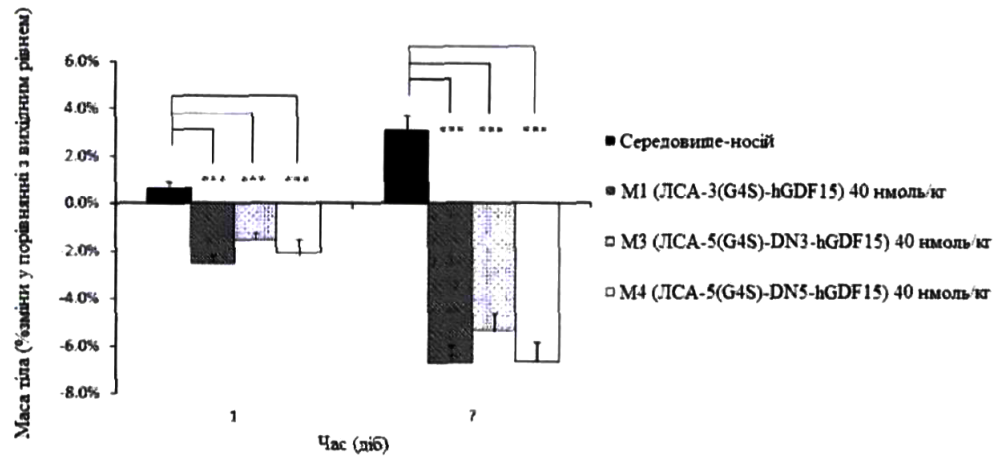
Гібридний білок М4: Сигнальна послідовність IgK (нижній регістр), об'єднана з амінокислотною послідовністю ЛСА, об'єднаною з лінкером [(Gly₄-Ser)₅] (підкреслений шрифт) на N-кінці амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт), що містить делецію 6 амінокислот (позначену як ΔARNGDH або ΔN6) (SEQ ID NO: 80)

mdmrvpaglllgllllwlgarcDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLNVNEVEFAKTCVA
DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEE
TFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCAQLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDTLTKVHTECCHGDLLECAADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEK
SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAA
ADPHESYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFQ LGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLS
EKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGG
SGGGSGGGSGGGSGG**CPLGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV****TMIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHR**
LKPD**TVAPCCVPASYNPMVLIQKTD****TGVS****LQTYDDLLAKDCHCI**

Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

Глікозильовані мутеїни hGDF15, які містять сигнальну послідовність IgK (нижній регістр), приєднану до N-кінця амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт)

M5 - (SEQ ID NO: 81)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGTHCPLGPGRCCRLHTVNASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M6 - (SEQ ID NO: 82)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCNLTTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M7 - (SEQ ID NO: 83)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRANLTDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M8 - (SEQ ID NO: 84)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASNETLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M9 - (SEQ ID NO: 85)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PNQTRAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M10 - (SEQ ID NO: 86)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSNFTAANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M11 - (SEQ ID NO: 87)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQNRTANMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M12 - (SEQ ID NO: 88)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFNATNMHAQIKTSLHRLKPDTV**PAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M13 - (SEQ ID NO: 89)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFRAANMHAQIKTNLTRLKPD**TVAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

M14 - (SEQ ID NO: 90)

mdmrvpaglllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV**TMCI**GAC**
PSQFRAANMHAQIKTSNHTLKPD**TVAPCCVPASYNPMVLIQKTD**TGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Fig. 8A

M15 - (SEQ ID NO: 91)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPANYTPMVLIQKTDGVSQTYDDLLAKDCHCI

M16 - (SEQ ID NO: 92)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSQTYDDLLAKDCHCI

M17 - (SEQ ID NO: 93)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTNNTTVSLQTYDDLLAKDCHCI

M18 - (SEQ ID NO: 94)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDNGTSLQTYDDLLAKDCHCI

M19 - (SEQ ID NO: 95)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGNSQTYDDLLAKDCHCI

M20 - (SEQ ID NO: 96)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSQTYDDLLAKDCHCI

M21 - (SEQ ID NO: 97)

mdmrtpaqllgllllwlrgrc**ARNGDHCPLGPGRCCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSQTYDDLLNKTCHCI

Фіг. 8А (продовження)

Нуклеотидні послідовності, які кодують глікозильовані мутейни hGDF15, що містять сигнальну послідовність IgK, приєднану до N-кінця амінокислотної послідовності зрілого GDF15 людини (як показано на фігурі 8A).

Нуклеотидні послідовності, які кодують M5

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGACTCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCAA
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 108)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M6

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCAATCTGACCACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 109)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M7

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGAACCTGACGGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 110)

Fig. 8B

Нуклеотидні послідовності, які кодують M8

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGAATGAAACCCCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 111)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M9

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAACCAGACCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 112)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M10

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCAACTTCACGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 113)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M11

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGCCCGAGCCAGAACCGGACGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 114)

Фіг. 8В (продовження)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M12

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGTCCGAGCCAGTTCAACGCGACGAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 115)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M13

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGTCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
ACCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 116)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M14

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGTCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCAACCACACCCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATA (SEQ ID NO: 117)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M15

atggacatgaggggtccccgctcagctcctgggggtcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGTCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAACTACACTCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 118)

Фіг. 8В (продовження)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M16

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCGGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAACACCACCACGGGGTGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 119)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M17

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCGGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAAGACCAACACCACGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 120)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M18

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCGGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAAGACCGACAACGGGACGTGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 121)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M19

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCGGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAAGACCGACACCGGGAACCGACCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 122)

Фіг. 8В (продовження)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M20

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
CATGGTGCTCATTCAAAAGACCGACACCGGGGTGAACCTCACGACCTATGATGACTTGTTAGCC
AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 123)

Нуклеотидні послідовності, які кодують M21

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGCGCGCAACGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTC
GCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATCGGC
GCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACCGCCTGAAGC
CCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAAGACCGA
CACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAAACAAAACCTGCCACTGCATATGA (SEQ ID
NO: 124)

Фіг. 8В (продовження)

Амінокислотна послідовність ΔN3-M16 (сигнальна послідовність IgK (нижній регістр), приєднана до N-кінця зрілого GDF15 людини (напівжирний шрифт)

mdmrvpagllgllllwlrgrar**GDHCP**LGPRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQ
FRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVFAPCCVPASYNPMVLIQNTTTGVSLQTYDDLAKDCHCI (SEQ ID
NO: 100)

Нуклеотидна послідовність, яка кодує ΔN3-M16

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctgggtccgaggtgccagat
gtGGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCGCGCGTCGCT
GGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTCGCCACGGGAGGTGCAAGTGACCATGTGCATC
GGCGCGTGCCCGAGCCAGTTCCGGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGAGCCTGCACC
GCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCCCATGGTGCT
CATTCAAAACACCACCACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTTAGCCAAAGACTGC
CACTGCATATGA (SEQ ID NO: 125)

Фіг. 8С

Амінокислотна послідовність зрілого GDF15 людини дикого типу, приєднана за N-кінцем до сигнальної послідовності IgK (IgK-дт-GDF15)

mdmrtpaqlllgllllwlrgrar**ARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC**
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGVSLSQTYDDLAKDCHCI (SEQ
 ID NO: 126)

Нуклеїнова кислота, яка кодує IgK-дт-GDF15

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctactctggtccgaggtgccagat
 gtGCGCGCAACGGGACCACTGTCCGCTCGGGCCCGGGCGTTGCTGCCGTCTGCACACGGTCCG
 CGCGTCGCTGGAAGACCTGGGCTGGGCCGATTGGGTGCTGTGCCACGGGAGGTGCAAGTGACC
 ATGTGCATCGGCGCGTGGCCGAGCCAGTTCGGGCGGCAAAACATGCACGCGCAGATCAAGACGA
 GCCTGCACCGCCTGAAGCCCGACACGGTGCCAGCGCCCTGCTGCGTGCCCGCCAGCTACAATCC
 CATGGTGCTCATTCAAAGACCGACACCGGGGTGTCGCTCCAGACCTATGATGACTTGTAGCC
 AAAGACTGCCACTGCATATGA (SEQ ID NO: 127)

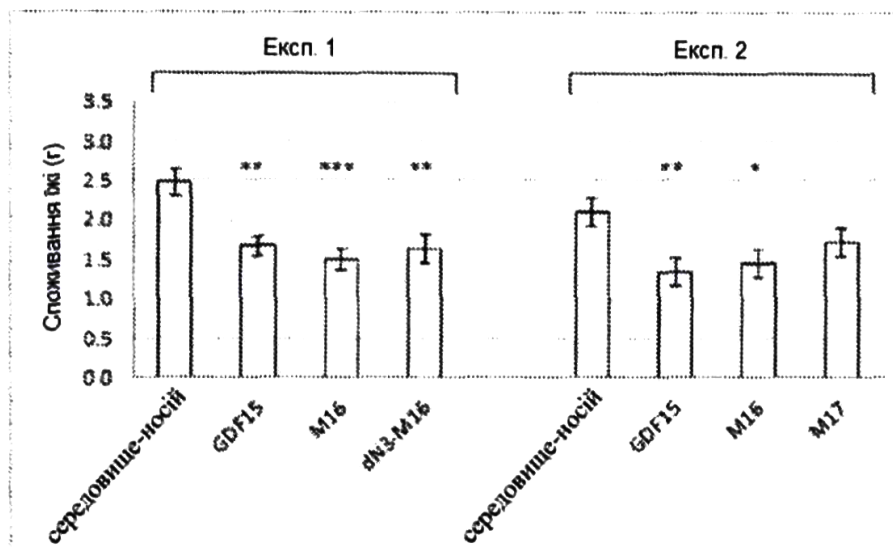
Фіг. 8D

Оцінка утворення димерів мутантів GDF15 людини, зайнятості сайту N-гліканом і розчинності

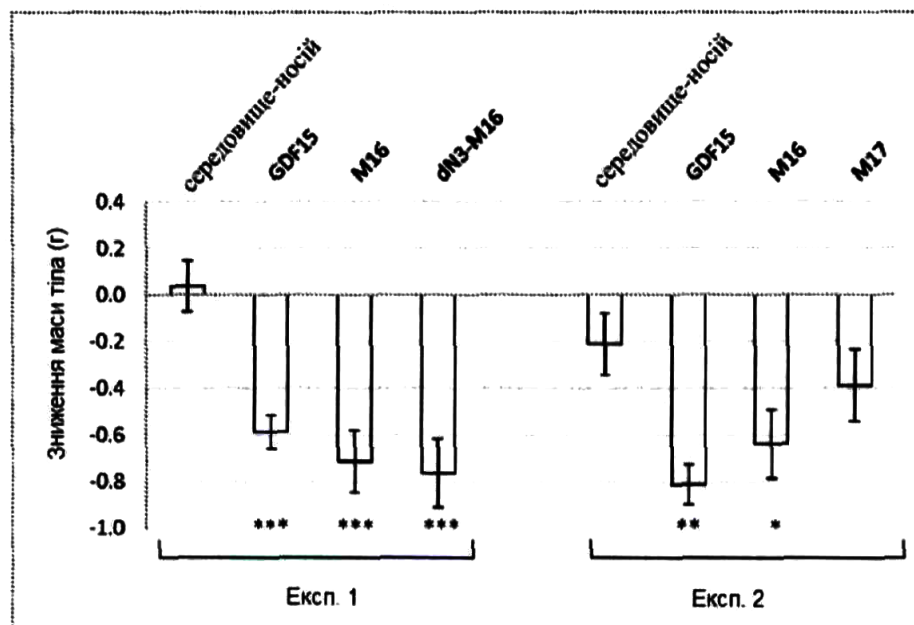
<u>Ідентифікатор мутанту</u>	<u>Димер</u>	<u>N-глікан</u>	<u>Граничне значення розчинності</u>
hGDF15	ТАК	-	++
M5	ТАК	ТАК	++++
M6	ТАК	ТАК	Не виконували
M7	ТАК	ТАК	+++
M8	НІ	НІ	Не виконували
M9	ТАК	ТАК	Не виконували
M10	НІ	НІ	Не виконували
M11	ТАК	ТАК	+++
M12	ТАК	ТАК	+++
M13	ТАК	ТАК	++++
M14	НІ	НІ	Не виконували
M15	НІ	НІ	Не виконували
M16	ТАК	ТАК	+++++
ΔN3-M16	ТАК	ТАК	+++++
M17	ТАК	ТАК	+++++
M18	ТАК	ТАК	Не виконували
M19	ТАК	ТАК	Не виконували
M20	ТАК	ТАК	++++
M21	ТАК	ТАК	+++

Фіг. 9

Модель ДІО мишей



Фіг. 10



Фіг. 11