

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **024507**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.09.30

(51) Int. Cl. **C07K 14/575** (2006.01)

(21) Номер заявки
201390474

(22) Дата подачи заявки
2011.09.28

(54) ХОРОШО РАСТВОРИМЫЕ ЛЕПТИНЫ

(31) 61/387,402; 61/422,091

(32) 2010.09.28; 2010.12.10

(33) US

(43) 2013.07.30

(86) PCT/US2011/053774

(87) WO 2012/050925 2012.04.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АМИЛИН ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ЛЛК; АСТРАЗЕНЕКА
ФАРМАСЬЮТИКАЛС ЛП (US)**

(72) Изобретатель:
Эриксон Мэри (US)

(74) Представитель:
Лыу Т.Н. (RU)

(56) US-A1-20060030530
UniProtKB Direct Submission Q706D0.
LEP_HALGR (10-JUL-2007) [Retrieved from the
Internet 11 January 2012 <[http://www.uniprot.org/
uniprot/Q706D0.txt?version=22](http://www.uniprot.org/uniprot/Q706D0.txt?version=22)>]

(57) В изобретении предлагаются химерные полипептиды и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие химерные полипептиды. Также предлагаются фармацевтические композиции и способы лечения заболевания и нарушения, включающего в себя липодистрофию, дислипидемию, гиперлипидемию, избыточную массу тела, ожирение, гипоталамическую аменорею, болезнь Альцгеймера, лептиновую недостаточность, жировую дистрофию печени или сахарный диабет (включая тип I и тип II). Дополнительные заболевания и нарушения, которые можно лечить соединениями и способами, описываемыми в настоящем документе, включают в себя неалкогольный стеатогепатит (NASH) и заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD), метаболический синдром X и болезнь Хантингтона.

B1

024507

024507

B1

Ссылки на родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет по заявке на выдачу патента США № 61/387402, поданной 28 сентября 2010 г., и по заявке на выдачу патента США № 61/422091, поданной 10 декабря 2010 г., описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Уровень техники

Изобретение относится к новым соединениям, которые проявляли биологическую активность. Соединения также показали удивительное и значительное улучшение физических свойств, таких как растворимость и стабильность.

Соединения по изобретению основаны на последовательности лептина, описанной в заявке на патент США № 61/387402 и заявке на патент США № 61/422091. Соединения, к удивлению, являются хорошо растворимыми и не демонстрируют склонности к агрегации, в отличие от встречающихся в природе лептинов. Физические свойства соединений облегчают приготовление растворимых, фармацевтически приемлемых препаратов и композиций, также предлагаемых в изобретении. Заболевания, поддающиеся такому лечению, включают в себя липодистрофию, дислипидемию, гиперлипидемию, избыточную массу тела, ожирение, гипоталамическую аменорею, болезнь Альцгеймера, лептиновую недостаточность, жировую дистрофию печени, сахарный диабет (включая I тип и II тип), неалкогольный стеатогепатит (NASH), заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD), метаболический синдром X и болезнь Хантингтона или их сочетания.

Сохраняется необходимость в создании полипептидов, применимых при описанных выше метаболических заболеваниях, состояниях и нарушениях. Таким образом, цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить новые полипептиды, применимые для лечения указанных выше состояний, и способы для их получения и применения.

Каждый патент, патентная заявка и публикация, цитируемая в настоящем документе, таким образом, включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме и во всех отношениях.

Сущность изобретения

Предлагаются химерные полипептидные соединения, характеризующиеся биологической активностью лептина, в дополнение к улучшенным физическим свойствам. Соединения представляют собой химерные полипептиды, которые основаны на полипептиде лептина нерпы дикого типа, где по меньшей мере один непрерывный участок из 1-30 аминокислот последовательности лептина нерпы дикого типа был заменен на непрерывный участок из 1-30 аминокислот зрелой последовательности лептина человека.

В первом аспекте предлагается химерный полипептид, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте предлагается способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в лечении. Способ охватывает введение субъекту химерного полипептида, как описано в настоящем документе.

В еще одном аспекте предлагается фармацевтическая композиция, которая включает в себя химерный полипептид, описываемый в настоящем документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым наполнителем.

Еще одним аспектом являются полинуклеотиды, кодирующие химерный полипептид и его промежуточные продукты, экспрессирующие векторы, несущие такие полинуклеотиды, клетки-хозяева, экспрессирующие такие полинуклеотиды, и способы для их экспрессии, синтеза, посттрансляционной модификации и выделения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1C изображены эффекты ежедневного введения указанных химерных полипептидов, описываемых в настоящем документе, на потребление пищи и изменение массы тела (% с поправкой на носитель) при введении самкам мышей C57/B6, как описано в примере 4. Фиг. 1A: потребление пищи. Фиг. 1B: изменение массы тела (% с поправкой на носитель). Фиг. 1C: кривая зависимости доза-эффект.

На фиг. 2A-2C изображены эффекты ежедневного введения указанных химерных полипептидов, описываемых в настоящем документе, на потребление пищи и изменение массы тела (% с поправкой на носитель) при введении самкам мышей C57/B6, как описано в примере 5. Фиг. 2A: потребление пищи. Фиг. 2B: изменение массы тела (% с поправкой на носитель). Фиг. 2C: кривая зависимости доза-эффект.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

"Ожирение" и "избыточная масса тела" относится к млекопитающим, имеющим более высокую массу тела, чем обычно ожидаемая, и они могут быть определены, например, по физическому состоянию, индексу массы тела (BMI), как известно в данной области, по соотношениям окружности талии к окружности бедер, толщине кожной складки, окружности талии и т.п. Центры контроля и профилактики заболеваний (CDC) определяют наличие избыточной массы тела, когда у взрослого человека BMI от 25 до 29,9; и определяют наличие ожирения, когда у взрослого человека BMI от 30 или выше. Существуют дополнительные показатели для определения ожирения. Например, CDC установили, что человек с соотношением окружности талии к окружности бедра больше чем 1,0 характеризуется избыточной массой тела.

"Безжировая масса тела" обозначает массу тела без жира, т.е. общая масса тела за вычетом массы

жировой ткани представляет собой безжировую массу тела. Безжировую массу тела можно измерить такими способами, как гидростатическое взвешивание, применение компьютеризированных камер, двух-энергетическая рентгеновская абсорбциометрия, применение калиперов для измерения кожных складок, магнитно-резонансная томография (MRI) и биоэлектрический импедансный анализ (BIA), как известно в данной области.

"Млекопитающее" обозначает теплокровных животных, которые, как правило, имеют мех или волосы, которые дают жизнь своему потомству при родах и которые вскармливают своё потомство молоком. Млекопитающие включают в себя людей; домашних животных (например, собаки, кошки); сельскохозяйственных животных (например, коровы, лошади, овцы, свиньи, козы); диких животных и т.п. В одном из вариантов осуществления млекопитающее представляет собой особь женского пола. В одном из вариантов осуществления млекопитающее является женщиной. В одном из вариантов осуществления млекопитающее представляет собой кошку или собаку. В одном из вариантов осуществления млекопитающее представляет собой страдающее сахарным диабетом млекопитающее, например человека, страдающего сахарным диабетом 2 типа. В одном из вариантов осуществления млекопитающее представляет собой млекопитающее, страдающее сахарным диабетом тучных, например, страдающее ожирением млекопитающее с сахарным диабетом 2 типа. Термин "субъект" в контексте способов, описываемых в настоящем документе, относится к млекопитающему.

"Фрагмент" в контексте полипептидов обозначает в настоящем документе в общепринятом химическом смысле часть полипептида. Например, фрагмент может быть результатом N-концевой делеции или C-концевой делеции одного или нескольких остатков исходного полипептида, и/или фрагмент может быть результатом внутренней делеции одного или нескольких остатков исходного полипептида. "Фрагмент" в контексте антитела обозначает часть антитела, которое может быть связано с биологически активной молекулой для регуляции растворимости, распределения внутри субъекта и т.п. Например, лептин A200, описываемый в настоящем документе, представляет собой конъюгат Fc-фрагмента антитела с лептином, как известно в данной области. См., например, WO 98/28427 и US2007/002084. Термин "исходный" в контексте полипептидов в обычном смысле относится к полипептиду, который служи в качестве структуры сравнения до модификации, например, вставки, делеции и/или замены.

"Аналог", как применяют в настоящем документе, в контексте полипептидов обозначает соединение, которое содержит вставки, делеции и/или замены аминокислот, относительно исходного соединения. Аналог может характеризоваться лучшей стабильностью, растворимостью, эффективностью, периодом полувыведения и тому подобным. В некоторых вариантах осуществления аналог представляет собой соединение, характеризующееся по меньшей мере 50%, например 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98% или даже большей идентичностью последовательности в отношении исходного соединения.

"Идентичность", "идентичность последовательности" и т.п. в контексте сравнения двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов обозначает две или более последовательности или подпоследовательности, которые являются одинаковыми или содержат определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. приблизительно 50% идентичности, предпочтительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичности на определенном участке при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения или специально выделенного участка), как определяют, применяя алгоритмы сравнения последовательностей, как известно в данной области, например BLAST или BLAST 2.0. Данное определение включает в себя последовательности, которые содержат делеции и/или присоединения, а также последовательности, которые содержат замены, а также, встречающиеся в природе, например, полиморфные или аллельные варианты, и созданные человеком варианты. В предпочтительных алгоритмах, производится подсчет пропусков и тому подобного, как известно в данной области. Для сравнения последовательности, типично, одна последовательность выступает в качестве последовательности сравнения, с которой сравниваются исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательности исследуемые последовательности и последовательность сравнения вводят в компьютер, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и устанавливают параметры программы алгоритма для последовательности. Предпочтительно можно использовать параметры программы по умолчанию или можно установить альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательности затем вычисляет процент идентичности последовательности для исследуемых последовательностей относительно последовательности сравнения на основе параметров программы. Оптимальное выравнивание последовательности при сравнении можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритма гомологичного выравнивания Нидлмана и Вунша, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, способа поиска сходства Пирсона и Липмана, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, при помощи компьютерной реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), или посредством ручного выравнивания и визуальной проверки. См., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 приложение)). Предпочтительные примеры алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, включают в себя алгоритмы BLAST и BLAST

2,0, которые описаны у Altschul et al., 1977, Nuci. Acids Res. 25:3389-3402 и Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. BLAST и BLAST 2,0 применяют, как известно в данной области, для определения процента идентичности последовательности нуклеиновых кислот и белков по изобретению. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным через веб-сайт National Center for Biotechnology Information. Данный алгоритм охватывает первоначальную идентификацию пар последовательностей с максимальным сходством (HSP), определяя короткие слова длиной W в последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторым положительным пороговым оценкам T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T обозначают в качестве порога оценки соседнего слова (Altschul et al., Id.). Данные первоначальные совпадения соседних слов действуют в качестве начальных точек для инициализации поиска, чтобы обнаружить более длинные их содержащие HSP. Совпадения слов продлевается в обоих направлениях по каждой последовательности по мере того, как возрастает совокупная оценка выравнивания. Совокупные оценки вычисляют, используя, например, для нуклеотидных последовательностей параметры M (вознаграждающая оценка для пары совпавших остатков; всегда >0) и N (штрафная оценка за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей, для вычисления совокупной оценки применяют матрицу замен. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливается, если: совокупная оценка выравнивания уменьшается на величину X от его максимально достигнутого значения; совокупная оценка приближается к нулю или ниже, вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или если достигли конца последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программу BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) применяют, как установлено по умолчанию с длиной слова (W) 11, ожиданием (E) 10, M=5, N=-4 и со сравнением обеих нитей. Для аминокислотных последовательностей, применяют программу BLASTP, как установлено по умолчанию с длиной слова 3 и ожиданием (E) 10 и матрицей замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), выравнивание (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4, и сравнение обеих нитей.

Термин "приблизительно" в контексте численного значения обозначает +/- 10% от численного значения.

Термины "пептид" и "полипептид" в контексте соединений, описываемых в настоящем документе, являются синонимичными.

Лептины. "Лептины" и "лептин" обозначают лептины, активные фрагменты лептина, аналоги лептина и производные лептина; и лептин, активный фрагмент лептина, аналог лептина и производное лептина; соответственно. Таким образом, если не указано иначе, упоминание "лептины", как подразумевают, охватывает лептины, активные фрагменты лептина, аналоги лептина, и производные лептина, как описано в настоящем документе. Схожим образом, если не указано иначе, упоминание "лептин", как подразумевают, охватывает лептин, активный фрагмент лептина, аналог лептина и производное лептина, как описано в настоящем документе. Иллюстративные лептины, которые можно применять при конструировании, получении и применении химерных полипептидов, описываемых в настоящем документе, включают в себя лептины, которые вызывают один или несколько биологических ответов, известных в данной области, вызываемых при введении субъектам лептинов (см., например, опубликованную патентную заявку США № US 2007/0020284 и US 2008/0207512, патенты США № 6309853 и US 7183254, и опубликованную заявку PCT № WO 96/005309, WO 98/28427 и WO 2009/064298), таких как сокращение потребления пищи, снижение массы тела, замедление увеличения массы тела, стимулирование чувства сытости, снижение усвояемости калорий, снижение процента использования калорий, снижение метаболического плато, увеличение чувствительности к инсулину, снижение гиперлипидемии, коррекция дислипидемии, снижение гипертриглицеридемии, улучшение состояния при ожирении, улучшение состояния при избыточной массе тела, улучшение состояния при сахарном диабете (включая сахарный диабет I типа, сахарный диабет II типа и гестационный сахарный диабет), улучшение состояния при резистентности к инсулину, улучшение состояния при состояниях липодистрофии ассоциированных с ними, а также другие биологические ответы, известные в данной области, вызываемые при введении лептина (см., например, опубликованную патентную заявку США № US 2007/0020284 и US 2008/0207512, патенты США № 6309853 и US 7183254, и опубликованную заявку PCT № WO 96/005309, WO 98/28427 и WO 2009/064298).

Лептины включают в себя в качестве неограничивающих примеров соединения, описанные в патентах США № US 5594101, US 5851995, US 5691309, US 5580954, US 5554727, US 5552523, US 5559208, US 5756461, US 6309853, опубликованной патентной заявке США № US 2007/0020284 и опубликованной заявке PCT № WO 96/23517, WO 96/005309, WO 98/28427, WO 2004/039832, WO 98/55139, WO 98/12224 и WO 97/02004, каждая из которой в полном объеме и во всех отношениях включена в настоящий документ. Способы анализа активностей и биологических ответов лептина *in vitro* и *in vivo*, включающих в себя чувство насыщения, ингибирующую активность в отношении потребления пищи и активность снижения массы тела, известны в данной области и описаны в настоящем документе и также в указанных ссылках и других ссылках, приведенных в настоящем документе.

Иллюстративные лептины, аналоги лептина, активные фрагменты лептина и производные лептина

включают в себя следующие ниже.

Зрелые мышинные лептины:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Хаа-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMD
QTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEA
SGYSTEVVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC, где Хаа в позиции 28 представляет собой Q
или отсутствует (SEQ ID NO:1).

Форма 1 зрелого мышинного лептина:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQT
LAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSG LQKPESLDGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGS LQDILQQLDV SPEC (SEQ ID NO:2).

Форма 2 зрелого мышинного лептина:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQTL
AVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSG LQKPESLDGVLEASL
YSTEVVALSRLQGS LQDILQQLDV SPEC (SEQ ID NO:3).

Зрелые мышинные лептины с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Хаа-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPIL TL SK
MDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLES LGGV
LEASGYSTEVVALSRLQGS LQDMLQQLDLSPGC, где Хаа в положении 29 представляет
собой Q или отсутствует (SEQ ID NO:4).

Форма 1 зрелого мышинного лептина с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQ
TLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSG LQKPESLDGVLEA
SLYSTEVVALSRLQGS LQDILQQLDV SPEC (SEQ ID NO:5).

Форма 2 зрелого мышинного лептина с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQT
LAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSG LQKPESLDGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGS LQDILQQLDV SPEC (SEQ ID NO:6).

Зрелый свиной лептин:

VPIWRVQDDTKTLIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSL SKMDQ
TLAIYQQILTSLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGGVLEASL
YSTEVVALSRLQGALQDMLRQLDLSPGC (SEQ ID NO:7).

Зрелый свиной лептин с N-концевым метионином:

MVPIWRVQDDTKTLIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSL SKMD
QTLAIYQQILTSLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGALQDMLRQLDLSPGC (SEQ ID NO:8).

Зрелые бычьи лептины:

VPICKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Хаа-SVSSKQRTGLDFIPGLHP LLSL SKMD
QTLAIYQQILTSLPSRN VVQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGGVLEA
SLYSTEVVALSRLQGS LQDMLRQLDLSPGC, где Хаа в положении 28 представляет собой
Q или отсутствует (SEQ ID NO:9).

Зрелые бычьи лептины с N-концевым метионином:

MVPICKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Хаа-SVSSKQRTGLDFIPGLHP LLSL SK
MDQTLAIYQQILTSLPSRN VVQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGGV L
EASLYSTEVVALSRLQGS LQDMLRQLDLSPGC, где Хаа в положении 29 представляет
собой Q или отсутствует (SEQ ID NO:10).

Непроцессированный полноразмерный лептин человека (т.е. включает в себя N-концевую сигналь-
ную последовательность из 21-остатка):

MHWGTLCGFLWLWPYLFYVQAVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQ
KVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKS
CHLPWASGLETDSLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID
NO: 11)

Зрелые лептины человека (с удаленной N-концевой сигнальной последовательностью из 21 амино-
кислот):

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH-Хаа-Хаа-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSK
MDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGV
LEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC, где: Хаа в положении 27 представляет
собой Т или А; и Хаа в положении 28 представляет собой Q или отсутствует (SEQ ID
NO:12).

Зрелые лептины человека с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISH-Хаа-Хаа-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLS
KMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGV
VLEASGYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC, где: Хаа в положении 28
представляет собой Т или А; и Хаа в положении 29 представляет собой Q или отсутствует
(SEQ ID NO:13).

Зрелый лептин макаки-резус:

VPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPVLTLSQMDQT
LAIYQQILINLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAFSK SCHLPLASGLETLES LGDVLEASLY
STEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:14).

Зрелый лептин макаки-резус с N-концевым метионином:

MVPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPVLTLSQMD
QTLAIYQQILINLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAFSK SCHLPLASGLETLES LGDVLEAS
LYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:15).

Зрелый лептин крысы:

VPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQKVTGLDFIPGLHPILSLSKMDQT
LAVYQQILTSLPSQNVLQIAHDLENLRDLLHLLAFSK SC SLPQTRGLQKPESLDGVLEASL
YSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPGC (SEQ ID NO:16).

Зрелый лептин крысы с N-концевым метионином:

MVPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQKVTGLDFIPGLHPILSLSKMDQ
TLAVYQQILTSLPSQNVLQIAHDLENLRDLLHLLAFSK SC SLPQTRGLQKPESLDGVLEAS
LYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPGC (SEQ ID NO:17).

Зрелый лептин утконоса. Зрелая последовательность лептина утконоса следует ниже:

ISIEKIQADTKTLTKTITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLD FIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQ
QILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVAL
VTDLRLRKS LK NIEKQLDHIQG (SEQ ID NO:18).

Непроцессированный полноразмерный лептин утконоса (т.е. включает в себя N-концевую сигналь-
ную последовательность из 21-остатка). Полноразмерная последовательность лептина утконоса, вклю-
чающая в себя N-концевую сигнальную последовательность из 21-остатка, следует ниже:

MRCILLYGFLCVWQHLYYSHPISEKIQADTKTLTKTITRIIQLSTQNGVSTDQRV
SGLD FIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATLKN
CPFTRSDGLDTMEIWGGIVEESLYSTEVALVTDLRLRKS LK NIEKQLDHIQG (SEQ ID NO:19).

Форма 1 зрелого лептина человека:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:20).

Форма 2 зрелого лептина человека:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:21).

Форма 3 зрелого лептина человека:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTL
AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGVLEASG
YSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:22).

Форма 4 зрелого лептина человека:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTL
AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETLD SLGGVLEASG
YSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:23).

Форма 1 зрелого лептина человека с N-концевым метионином (также известная как метрелептин,
или A100):

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEA
SGYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:24).

Форма 2 зрелого лептина человека с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMD
QTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLE
ASGYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:25).

Форма 3 зрелого лептина человека с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEAS
GYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:26).

Форма 4 зрелого лептина человека с N-концевым метионином:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEAS
GYSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:27).

Лептин нерпы:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:28).

Лептин нерпы с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелеп-
тина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHS
TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:29).

Лептин нерпы с аминокислотами 30 и 71-92, замененными на аминокислоты 32 и 73-94 (спираль 3)
метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHS
TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:30).

Лептин нерпы с N-концевым метионином:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
LATYQQILTSLQSRVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:31).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 71-92, замененными на аминокисло-
ты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQ
QILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTEV
VALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:32).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 30 и 71-92, замененными на амино-
кислоты 32 и 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:33).

Лептин A200. Лептин A200 представляет собой продукт конденсации Fc-фрагмента антитела с леп-
тином, как известно в данной области. См., например, Lo et al., 2005, Protein Eng. Design & Selection,
18:1-10. Аминокислотная последовательность A200 представлена ниже:

MDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSHEALTHNYTQKSLSLSPGKVP
IKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQTLAVYQQIL
TSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGYSTEVVA
LSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:34)

Лептин A300. Лептин A300 представляет собой метрелептин с заменами W101Q и W139Q (N-
концевой 1Met считается как остаток 1):

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDLGGVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (SEQ ID NO:35).

Лептин A400. Лептин A400 представляет собой метрелептин с остатком серина в положении 78, замененным на остаток цистеина, как приведено ниже:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVIQICNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGGVLEA
 SGYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO: 36); к которому присоединена
 группа ПЭГ 20 килодальтон (кДа) через остаток цистеина в положении 78.

Лептин A500. Изыскания множества исследователей, включая авторов изобретения, сосредоточены на влиянии на агрегацию замены остатков в лептине. См., например, главу Ricci et al., 2006. "Mutational approach to improve physical stability of protein therapeutics susceptible to aggregation: Role of altered conformation in irreversible осаждение," Book Chapter. In: MISBEHAVING PROTEINS: PROTEIN (MIS)FOLDING, Aggregation, и Stability, Murphy R.M., Tsai A.M., Eds., New York. Springer, p. 331-350, включенную в настоящий документ в качестве ссылки и во всех отношениях. Таким образом, лептин A500 со следующей ниже последовательностью использовали в определенных соединениях и способах, описываемых в настоящем документе:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVY
 QQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE
 VVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (SEQ ID NO:37).

Варианты лептина A100. Варианты лептина A100 со следующими ниже заменами аминокислот представлены ниже:

D41E, H98S, W101Q, D109E, G113E, M137I, W139Q и G146E:
 MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLKMDQTLAVY
 QQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLES LGGVLEASGYSTE
 VVALSRLQGSLQDILQQLDLSPGC (SEQ ID NO: 38).

H98S, W101Q, A102T, G113E, M137I, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDLGGVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDILQQLDLSPGC (SEQ ID NO: 39).

H98S, W101Q, G113E, M137I, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDLGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 40).

W101Q, G113E, M137I, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 41).

H98S, W101Q, M137I, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLDLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 42).

W101Q, G113E, M137I, W139Q, L143V и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDVSPEC (SEQ ID NO: 43).

H98S, W101Q, A102T, M137I, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLETLDLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 44).

H98S, W101Q, D109E, G113E и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLESLEGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPEC (SEQ ID NO: 45).

W101Q, M137I, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 46).

W101Q, M137I, W139Q, L143V и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDVSPEC (SEQ ID NO: 47).

H98S, W101Q, A102T, M137I, W139Q, L143V и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLETLDLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDILQQLDVSPEC (SEQ ID NO: 48).

H98S, W101Q, A102T, G113E и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLETLDLGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPEC (SEQ ID NO: 49).

W101Q, G113E и W139Q:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPGC (SEQ ID NO: 50).

W101Q, G113E, W139Q и G146E:

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPQASGLETLDLGEVLEAS
GYSTEVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 51).

II. Химерные полипептиды.

В одном из аспектов настоящего описания описаны группы химерных полипептидов. Данные хи-

мерные полипептиды основаны на полипептиде лептина нерпы дикого типа, где по меньшей мере один непрерывный участок 1-30 аминокислоты последовательности лептина нерпы дикого типа заменены на непрерывный участок 1-30 аминокислоты зрелой последовательности лептина человека. Последовательность лептина нерпы дикого типа включает в себя последовательность лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28) и последовательность лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31). Зрелая последовательность лептина человека, применимая для химеризации лептина нерпы дикого типа, как описано в данном документе, включает в себя следующие ниже последовательности, описанные выше: зрелые лептины человека (SEQ ID NO:12), зрелые лептины человека с N-концевым метионином (SEQ ID NO:13), форму 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20), форму 2 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:21), форму 3 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:22), форму 4 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:23), форму 1 зрелого лептина человека с N-концевым метионином (метрелептин или A100, SEQ ID NO:24), форму 2 зрелого лептина человека с N-концевым метионином (SEQ ID NO:25), форму 3 зрелого лептина человека с N-концевым метионином (SEQ ID NO:26), форму 4 зрелого лептина человека с N-концевым метионином (SEQ ID NO:27), A200 (SEQ ID NO:34), A300 (SEQ ID NO:35), A400 (SEQ ID NO:36), A500 (SEQ ID NO:37) и варианты A100 (SEQ ID NO:38-51). В некоторых вариантах осуществления описаны группы химерных полипептидов, где по меньшей мере один непрерывный участок из 1-30 аминокислоты последовательности лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:31) заменили на непрерывный участок из 1-30 аминокислоты A100 (SEQ ID NO:24).

В любом их описываемых химерных полипептидов непрерывный участок из 1-30 аминокислоты может содержать любую встречающуюся в природе или не встречающуюся в природе аминокислоту. Любую комбинацию аминокислот можно применять без ограничения. Т.е. две или более аминокислот в непрерывном участке можно заменить на встречающуюся в природе аминокислоту, не встречающуюся в природе аминокислоту, консервативную замену, неконсервативную замену или любое их сочетание.

Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, продемонстрировали биологическую активность, в дополнение к улучшенным физическим свойствам. Например, химерные полипептиды нерпы-человека проявляют активность лептина *in vitro* и *in vivo*. Химерные полипептиды также показывают улучшенную стабильность и растворимость по сравнению со зрелыми полипептидами лептина человека, которые используют для получения последовательностей, как показано в примерах.

Термин "активность лептина" включает в себя связывающую активность лептина и функциональную активность лептина. Специалисты в данной области определяют соединения аналогов лептина с активностью лептина, применяя подходящие анализы для измерения связывающей или функциональной активности лептина. Соединения аналоги лептина могут характеризоваться IC_{50} приблизительно 200 нМ или меньше, приблизительно 100 нМ или меньше или приблизительно 50 нМ или меньше, или приблизительно 5 нМ или меньше, или приблизительно 1 нМ или меньше, при анализе связывания лептина, таком как анализ, описываемый в настоящем документе. Термин

" IC_{50} " относится, в обычном смысле, к половине максимальной ингибирующей концентрации соединения, ингибирующего биологическую или биохимическую функцию. Таким образом, в контексте исследований связывания с рецептором, IC_{50} относится к концентрации тестируемого соединения, которая конкурирует с половиной известного лиганда определенного рецептора. Соединения аналоги лептина могут характеризоваться EC_{50} приблизительно 20 нМ или меньше, приблизительно 10 нМ или меньше, приблизительно 5 нМ или меньше, приблизительно 1 нМ или меньше или приблизительно 0,1 нМ или меньше при функциональном анализе лептина, таком как анализ, описываемый в настоящем документе. Термин " EC_{50} " относится, в обычном смысле, к эффективной концентрации соединения, которая вызывает ответ половинный в диапазоне от начального ответа до максимального ответа, как известно в данной области.

А. Химерные полипептиды, включающие в свою структуру спираль 1 человека.

Участок спирали 1 зрелого полипептида лептина человека охватывает непрерывный участок 20 аминокислот. Спираль 1 и спираль 3 являются антипараллельными спиралями, которые входят в состав участка связывания II лептина с его рецептором. Данный участок взаимодействует с гомологичным цитокиническим рецептором доменом (CRH) рецептора лептина и, как думают, является основным участком связывания рецептора, но он не вовлечен в активацию рецептора. См., например, Peelman et al., 2004, J. Biol. Chem. 279: 41038.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 1 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 3-22 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 5-24 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:52.

Лептин нерпы с аминокислотами 3-22, замененными на аминокислоты 5-24 (спираль 1) метрелептина соответственно:

PIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:52).

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 3-22 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 5-24 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:53.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 3-22, замененными на аминокислоты 5-24 (спираль 1) метрелептина соответственно:

MPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:53).

В. Химерные полипептиды, включающие в свою структуру спираль 2.

Участок спирали 2 зрелого полипептида лептина человека охватывает участок из 16 смежных аминокислот. Данная спираль заглублена в 4-спиральном тяже, как описано в статье о изначальной структуре кристалла Zhang et al. (Nature 1997, 387:206).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 2 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 50-65 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 52-67 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:54.

Лептин нерпы с аминокислотами 50-65, замененными на аминокислоты 52-67 (спираль 2) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSKMDQTL
 AVYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:54).

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 50-65 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 52-67 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:55.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 50-65, замененными на аминокислоты 52-67 (спираль 2) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSKMDQT
 LAVYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:55).

С. Химерные полипептиды, включающие в свою структуру спираль 3 человека.

Участок спирали 3 зрелого полипептида лептина человека охватывает непрерывный участок из 22 аминокислоты. Спираль 3 и спираль 1 являются антипараллельными спиралями, которые входят в состав участка связывания II лептина с его рецептором. Данный участок взаимодействует с гомологичным цитокиническим рецептором доменом (CRH) рецептора лептина и, как думают, является основным участком связывания рецептора, но он не вовлечен в активацию рецептора. См., например, Peelman et al., 2004, J. Biol. Chem. 279: 41038.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 3 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:29.

Лептин нерпы с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:29).

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:32.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:32).

D. Химерные полипептиды, включающие в свою структуру спираль 4 человека.

Участок спирали 4 зрелого полипептида лептина человека охватывает непрерывный участок из 22 аминокислот. Спираль 4, как полагают, входит в состав участка связывания I и участка связывания III лептина, оба из которых являются важными для активации рецептора. См., например, Peelman et al., 2004, J. Biol. Chem. 279: 41038.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 4 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 120-141 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 122-143 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:56.

Лептин нерпы с аминокислотами 120-141, замененными на аминокислоты 122-143 (спираль 4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:56).

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 120-141 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 122-143 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:57.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 120-141, замененными на аминокислоты 122-143 (спираль 4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRNVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:57).

E. Химерные полипептиды, включающие в свою структуру петлю AB человека.

Участок петли AB зрелого полипептида лептина человека охватывает непрерывный участок из 27 аминокислот. Петля AB, как полагают, находится в составе участка связывания III, а также небольшой части участка связывания I лептина. См., например, Peelman et al., 2004, J. Biol. Chem. 279: 41038. Данный участок также содержит совершенно консервативный мотив GLDFIP (SEQ ID NO:164).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью петли AB из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:58.

Лептин нерпы с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLSRSVVIANDLANLRALLRLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:58).

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:59.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLSRSVVIANDLANLRALLRLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:59).

F. Химерные полипептиды, включающие в свою структуру петлю 3-4 человека.

Участок петли 3-4 зрелого полипептида лептина человека охватывает непрерывный участок из 27 аминокислот. Петля 3-4, как полагают, содержит часть участка связывания III лептина с его рецептором. См., например, Peelman et al., 2004, J. Biol. Chem. 279: 41038.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью петли 3-4 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:60.

Лептин нерпы с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILATYQQI
 LTSLSRSVVIANDLANLRALLRLASAKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVV
 ALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:60).

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:61.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLSRSVVIANDLANLRALLRLASAKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEAS
 GYSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:61).

G. Химерные комбинированные полипептиды.

В другом аспекте настоящего изобретения описаны группы химерных комбинированных полипептидов. Данные химерные комбинированные полипептиды основаны на полипептиде лептина нерпы дикого типа, где два или более непрерывных участка из 1-30 аминокислоты последовательности лептина нерпы дикого типа (например, SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:31) были заменены в каждом участке на непрерывный участок из 1-30 аминокислоты последовательности зрелого лептина человека. Химерные комбинированные полипептиды можно сконструировать для того, чтобы они проявляли улучшенные физические свойства по сравнению со зрелыми полипептидами лептина человека, которые применяют для получения последовательностей, в то же время, сохраняя биологическую активность лептина человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 1 и со встроенной последовательностью спирали 3 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 3-22 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 5-24 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипеп-

тид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:62.

Лептин нерпы с аминокислотами 3-22, замененными на аминокислоты 5-24 (спираль 1) метрелептина, и аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

PIQKVQDDTKLIKTIIVTRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:62)

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 3-22 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 5-24 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:63.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 3-22, замененными на аминокислоты 5-24 (спираль 1) метрелептина и с аминокислотами 72-93, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPQKVQDDTKLIKTIIVTRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:63)

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 3 и встроенной последовательностью петли AB из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:64.

Лептин нерпы с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина, и с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:64)

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:31 был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:65.

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина, и с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина соответственно:

MPQRVQDDTKLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:65)

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью спирали 3 и встроенной последовательностью петли 3-4 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный поли-

пептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:66.

Лептин нерпы с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина, и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYS
TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:66)

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:31 был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:31 был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:67.

Лептин нерпы с N-концевым метионином с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина, и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
LATYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASG
YSTEVVALSRLKAALODMLROLDNRNPGC (SEQ ID NO:67)

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью петли AB и со встроенной последовательностью спирали 4 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 120-141 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 122-143 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:68.

Лептин нерпы с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина, и с аминокислотами 120-141, замененными на аминокислоты 122-143 (спираль 4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:68)

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:31 был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 120-141 из SEQ ID NO:31 был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 122-143 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:69.

Лептин нерпы с N-концевым метионином с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина, и с аминокислотами 120-141, замененными на аминокислоты 122-143 (спираль 4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
ATYQQILTSLQSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASV
HSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:69)

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью петли AB и со встроенной последовательностью петли 3-4 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты

в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:70.

Лептин нерпы с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина, и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRVQIANDLANLRALLRLASAKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGY
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:70)

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:71.

Лептин нерпы с N-концевым метионином с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина, и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRVQIANDLANLRALLRLASAKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:71).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к химерным полипептидам, которые основаны на лептине нерпы дикого типа со встроенной последовательностью петли AB, встроенной последовательностью петли 3-4 и встроенной последовательностью спирали 3 из зрелого лептина человека. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа (SEQ ID NO:28), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24), непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:72.

Лептин нерпы с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина, с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина, и с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:72)

В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность полипептида лептина нерпы дикого типа с N-концевым метионином (SEQ ID NO:31), где непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 23-49 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 25-51 из A100 (SEQ ID NO:24), непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 93-119 из SEQ ID NO:31, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 95-121 из A100 (SEQ ID NO:24), и непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 71-92 из SEQ ID NO:28, был заменен на непрерывный участок, охватывающий аминокислоты в положениях 73-94 из A100 (SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид содержит последовательность, описанную в SEQ ID NO:73.

Лептин нерпы с N-концевым метионином с аминокислотами 23-49, замененными на аминокислоты 25-51 (петля AB) метрелептина, с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина, и с аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETLDSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:73).

В некоторых вариантах осуществления химерные полипептиды, предлагаемые по изобретению, содержат замену аминокислоты Cys на Ser в положении 30 последовательности полипептида нерпы дикого

типа. Согласно некоторым вариантам осуществления, предлагаются следующие далее химерные полипептиды.

Лептин нерпы с аминокислотами 30 и 3-22, замененными на аминокислоты 32 и 5-24 (спираль 1) метрелептина соответственно:

PIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:74).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 30 и 3-22, замененными на аминокислоты 32 и 5-24 (спираль 1) метрелептина соответственно:

MPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:75).

Лептин нерпы с аминокислотами 30 и 50-65, замененными на аминокислоты 32 и 52-67 (спираль 2) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQTL
 AVYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:76).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 30 и 50-65, замененными на аминокислоты 32 и 52-67 (спираль 2) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQTLAVYQ
 QILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE
 VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:77).

Лептин нерпы с аминокислотами 30 и 71-92, замененными на аминокислоты 32 и 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:30).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 30 и 71-92, замененными на аминокислоты 32 и 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:33).

Лептин нерпы с аминокислотами 30 и 120-141, замененными на аминокислоты 32 и 122-143 (спираль 4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQILA
 TYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:78).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 30 и 120-141, замененными на аминокислоты 32 и 122-143 (спираль 4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQILATYQ
 QILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHSTE
 VVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:79).

Лептин нерпы с аминокислотами 30 и 93-119, замененными на аминокислоты 32 и 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQILA
 TYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGY
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:80).

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотами 30 и 93-119, замененными на аминокислоты 32 и 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

MPIQRVQDDTKTLIKTITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLKMDQILATYQ
 QILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGYSTE
 VVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:81).

Лептин нерпы с аминокислотой 30, замененной на аминокислоту 32, аминокислотами 3-22, замененными на аминокислоты 5-24 (спираль 1) метрелептина, и аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

PIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:82)

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотой 30, замененной на аминокислоту 32, аминокислотами 3-22, замененными на аминокислоты 5-24 (спираль 1) метрелептина, и аминокислотами 72-93, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина соответственно:

MPIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:83)

Лептин нерпы с аминокислотой 30, замененной на аминокислоту 32, аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина, и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептина соответственно:

PIQRVQDDTKTIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLSLGGVLEASGYS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:84)

Лептин нерпы с N-концевым метионином и с аминокислотой 30, замененной на аминокислоту 32, аминокислотами 71-92, замененными на аминокислоты 73-94 (спираль 3) метрелептина, и с аминокислотами 93-119, замененными на аминокислоты 95-121 (петля 3-4) метрелептин соответственно:

MPIQRVQDDTKTIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDLSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:85)

Дополнительные варианты осуществления. Известно, что каждый из полипептидов, описываемых в настоящем документе, также, как предусмотрено, включает в себя (необязательно) метионин на N-конце в рамке считывания с ее встречающейся в природе первой аминокислотой. Например, метрелептин (лептин A100) состоит из зрелого лептина человека, к которому присоединен N-концевой метионин, как описано в SEQ ID NO:24. Схожим образом, остаток метионина можно включать в N-конец любой из аминокислотных последовательностей и формул, описываемых в настоящем документе на всем протяжении.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются аналоги химерных полипептидов. Аналог химерного полипептида может характеризоваться по меньшей мере 80%, например 80, 85, 90, 95, 98 или даже большей идентичностью последовательности относительно исходного химерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления исходный химерный полипептид представляет собой полипептид, указанный в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 или SEQ ID NO:85. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления аналог химерного полипептида может характеризоваться по меньшей мере 80%, например 80, 85, 90, 95, 98% или даже большей идентичностью последовательности относительно любого химерного полипептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления аналог химерного полипептида может характеризоваться по меньшей мере 80%, например 80, 85, 90, 95, 98% или даже большей идентичностью последовательности относительно химерного полипептида, указанного в SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления аналог химерного полипептида может характеризоваться по меньшей мере 90% идентичностью последовательности относительно химерного полипептида, указанного в SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32 или SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления аналог химерного полипептида может характеризоваться по меньшей мере 90% идентичностью последовательности относительно химерного полипептида, указанного в SEQ ID NO:33.

Дополнительно, аналоги химерных полипептидов можно сконструировать, получить и применять в соответствии с изобретением, в котором 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или даже 21 аминокислота химерного полипептида, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85; заменена/заменены на другую аминокислоту, такую как консервативная аминокислота или неконсервативная аминокислота, или ее/их изменяют иным способом. Как обычно в данной области, термин "консервативный" в контексте замены аминокислот относится к замене, которая сохраняет свойства типа заряда (например, анионный, катионный, нейтраль-

ный, полярный и т.п.), гидрофобности или гидрофильности, объема (например, ван-дер-ваальсовы контакты и т.п.), и/или функциональности (например, гидроксигруппа, амин, сульфгидрил и т.п.). Термин "неконсервативный" относится к замене аминокислоты, которая не является консервативной.

В другом аспекте изобретение относится к аналогам химерного полипептида, содержащего по меньшей мере один непрерывный участок 1-30 аминокислоты из зрелой последовательности аналога лептина человека, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, где наблюдается отличие в соответствующем положении лептина из другого вида.

Как известно в данной области, например, мышинные лептины, крысиные лептины, бычьи лептины, свиные лептины и лептины макаки-резус, такие как лептины, описываемые в настоящем документе, каждый по существу гомологичен лептинам человека; в частности, зрелые формы таких лептинов по существу гомологичны зрелым лептинам, и, дополнительно, особенного вблизи N-концевой части белка. Можно получить аналоги таких лептинов, таких как форма 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20) и метрелептин (SEQ ID NO:24), такие как при замене или при изменении иным способом аминокислотных остатков в одном или нескольких положениях в таких последовательностях, где наблюдается отличие в соответствующем зрелом мышинном, крысином, бычьем, свином лептине или лептине макаки-резус. Например, зрелые лептины человека (например, SEQ ID NO:20) вызывают биологические ответы, например, у мышей, крысы и обезьяны). См., например, WO 98/28427, WO 2009/064298, US2007/0020284, US2008/0207512 и Murakami et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Comm. 209: 944-952. Поскольку зрелые лептины человека характеризуются биологической активностью, например, в таких видах, можно сконструировать и получить аналоги лептинов, в которых одна или несколько аминокислот в положениях, которые отличаются в соответствующем положении(ях) в лептине из одного или нескольких таких видов, заменены на аминокислоту(ы) в таких соответствующих отличающихся положениях.

Например, используя зрелый белок лептина человека согласно SEQ ID NO:20, где первая аминокислота представляет собой валин и аминокислота в положении 146 представляет собой цистеин, одну или нескольких аминокислот можно заменить другой аминокислотой в положениях 32, 35, 50, 64, 68, 71, 74, 77, 89, 97, 100, 101, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 и 145 на соответствующую аминокислоту(ы), обнаруженные в соответствующем положении(ях) в SEQ ID NO:2, для того чтобы сконструировать и получить аналоги лептинов, образованные химерными полипептидами в соответствии с изобретением. Дополнительно, аминокислоту можно также заменить другой аминокислотой, такой как консервативная аминокислота или неконсервативная аминокислота, в одном или нескольких положениях 32, 35, 50, 64, 68, 71, 74, 77, 89, 97, 100, 101, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 и 145, например, из SEQ ID NO:20 для того чтобы сконструировать и получить аналоги лептинов, образованные химерными полипептидами в соответствии с изобретением.

Далее можно получить дополнительные аналоги лептинов на основе зрелой последовательности белка лептина крысы (SEQ ID NO:16). См., например, WO 98/28427, US2007/0020284 и Murakami et al., 1995, Id., включенные в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте и во всех отношениях. Зрелый лептин крысы отличается от формы 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20) в следующих ниже положениях: 4, 32, 33, 35, 50, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 101, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138 и 145. Таким образом, в одном или нескольких таких положениях в SEQ ID NO:20, можно произвести замену на аминокислоту, обнаруженную в соответствующем положении(ях), обнаруженных в зрелом лептине крысы (SEQ ID NO:16), для того чтобы сконструировать и получить аналоги лептинов, образованные химерными полипептидами в соответствии с изобретением. Дополнительно, также можно производить замену на другую аминокислоту, такую как консервативная аминокислота или неконсервативная аминокислота, в одном или нескольких положениях 4, 32, 33, 35, 50, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 101, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138 и 145, например, из SEQ ID NO:20, для того чтобы сконструировать и получить аналоги лептинов, образованные химерными полипептидами в соответствии с изобретением.

Положения как в зрелом лептине крысы (SEQ ID NO:16), так и в форме 1 зрелого мышинного лептина (SEQ ID NO:2), которые отличаются от формы 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20), представляют собой 4, 32, 33, 35, 50, 64, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 и 145. Таким образом, в одном или нескольких таких положениях в SEQ ID NO:20, можно произвести замену на аминокислоту, обнаруженную в соответствующем положении(ях), обнаруженных в зрелой последовательности лептина крысы (SEQ ID NO:16), или зрелой последовательности мышинной формы 1 (SEQ ID NO:2), для того чтобы сконструировать и получить аналоги лептинов, образованные химерными полипептидами в соответствии с изобретением. Дополнительно, также можно производить замену на другую аминокислоту, такую как консервативная аминокислота или неконсервативная аминокислота, в одном или нескольких положениях 4, 32, 33, 35, 50, 64, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 и 145 для того чтобы сконструировать и получить аналоги лептинов, образованные химерными полипептидами в соответствии с изобретением.

Кроме того, аминокислоты, обнаруженные в зрелом лептине макаки-резус (SEQ ID NO:14), которые отличаются от формы 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20) представляют собой (с аминокислотными остатками, отмеченными в круглых скобках в однобуквенном сокращении для аминокислоты): 8(S),

35(R), 48(V), 53(Q), 60(I), 66(I), 67(N), 68(L), 89(L), 100(L), 108(E), 112(D) и 118(L). Поскольку зрелые лептины человека вызывают биологический ответ у обезьян, лептин, такой как форма 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20), содержащий один или несколько отличных от макаки-резус аминокислот, замененных на другую аминокислоту, такую как аминокислоты в круглых скобках, можно применять для конструирования и получения аналогов лептина, образованных химерными полипептидами в соответствии с изобретением. Следует отметить, что определенные отличные у макаки-резус аминокислоты представляют собой также аминокислоты, обнаруженные, например, в указанной выше форме 1 зрелого мышинного лептина (положения 35, 68, 89, 100 и 112). Таким образом, можно получить аналоги лептинов, в которых одну или несколько аминокислот в положениях 4, 8, 32, 33, 35, 48, 50, 53, 60, 64, 66, 67, 68, 71, 74, 77, 78, 89, 97, 100, 102, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 118, 136, 138, 142 и 145, например, формы 1 зрелого лептина человека (SEQ ID NO:20) заменяют на соответствующую аминокислоту(ы) в таком положении(ях) в лептинах мыши или макаки-резус (например, SEQ ID NO:2 и/или SEQ ID NO:14).

В соответствии с изобретением, аналоги химерных полипептидов можно сконструировать и получить так, чтобы они содержали непрерывные участки аминокислот из аналогов лептинов человека. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к аналогам химерных полипептидов на основе на основе полипептида лептина нерпы дикого типа, где по меньшей мере один непрерывный участок из 1-30 аминокислот последовательности лептина нерпы дикого типа был заменен на непрерывный участок из 1-30 аминокислот зрелой последовательности аналога лептина человека, и где зрелая последовательность аналога лептина человека содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, где наблюдают отличие в соответствующем положении в лептине из другого вида. Также предлагаются аналоги химерных полипептидов, содержащие два или более непрерывных участков из 1-30 аминокислот зрелой последовательности аналога лептина человека.

Химерные полипептиды, к которым присоединяют химическую группу, представляют собой производные полипептиды. Получение производных химерных полипептидов посредством присоединения одной или нескольких химических групп, как было обнаружено, при определенных обстоятельствах позволяет получить некоторое преимущество, такое как увеличение стабильности и время циркуляции в крови терапевтического белка и снижение иммуногенности и склонности, например, к образованию нейтрализующих антитела и/или частоты возникновения реакций в месте инъекции. См., например, WO 98/28427, US2007/0020284, патент США № 4179337, Davis et al., изданный 18 декабря 1979 г. Для обзора, см. Abuchowski et al., в ENZYMES AS DRUGS. (J. S. Holcserberg и J. Roberts, eds. p. 367-383 (1981)); Francis et al., Id.

Производные полипептидов могут включать в себя полипептиды, в которых были произведены химические модификации одной или нескольких боковых групп его аминокислот, α -атомов углерода, концевой аминогруппы или концевой группы карбоновой кислоты. Химическая модификация включает в качестве неограничивающих примеров присоединение одной или нескольких химических групп, создание новых связей и удаление одной или нескольких химических групп. Модификации боковых групп аминокислот включают в себя без ограничения алкилирование, ацилирование, образование сложных эфиров, образование амида, присоединение малеимида, ацилирование ϵ -аминогрупп лизинов, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксильных групп глутаминовой и аспарагиновой кислоты и дезаминирование глутамин или аспарагина. Модификации концевых аминокислот включают в себя без ограничения модификации дезаминогрупп, N-низших алкиловых, N-ди-низших алкиловых и N-ацильных групп. Модификации концевых аминокислот включают в себя без ограничения модификации дезаминогрупп, N-низших алкиловых, N-ди-низших алкиловых и N-ацильных групп, такие как алкилации, разветвленные алкилации, алкиларилации. Модификации концевых карбоксильных групп включают в себя без ограничения модификации амидных, низших алкиламидных, диалкиламидных, ариламидных, алкилариламидных групп и низшего алкилового эфира. Низший алкил представляет собой C₁-C₄-алкил. Кроме того, одну или несколько боковых групп или концевых групп можно защитить при помощи защитных групп, известных обычному специалисту в синтетической химии α -углерод аминокислоты может быть моно- или диметилирован.

Такие производные включают в себя полипептиды, конъюгированные с одним или несколькими растворимыми в воде молекулами полимера, такими как полиэтиленгликоль ("ПЭГ"), или цепями жирных кислот различной длины (например, стеариловой, пальмитоиловой, октаноиловой), добавляя полиаминокислоты, такие как поли-his, поли-arg, поли-lys и поли-ala, или добавляя замещающие группы низкомолекулярных соединений, которые включают в себя короткие алкилы и стесненные алкилы (например, разветвленные, циклические, слитые, адамантильные) и ароматические группы. В некоторых вариантах осуществления молекулы растворимого в воде полимера будут иметь молекулярную массу в диапазоне от приблизительно 500 до приблизительно 60000 Да.

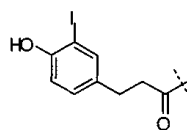
Такие конъюгирования полимеров могут произойти однократно в N- или C-конце или в боковых цепях аминокислотных остатков в последовательности химерного полипептида, как описано в настоящем документе. Альтернативно, могут иметь место множественные сайты для образования производных по аминокислотной последовательности такого химерного полипептида. Замена одной или нескольких

аминокислот на лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин может привести к появлению дополнительных участков для получения производных. См., например, патенты США № 5824784 и 5824778. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид можно конъюгировать с одной, двумя или тремя полимерными молекулами.

В некоторых вариантах осуществления растворимые в воде полимерные молекулы связаны с аминогруппой, карбоксильной или тиоловой группой, и могут быть связаны с N-или C-концевыми группами или с боковыми цепями лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина. Альтернативно, растворимые в воде полимерные молекулы могут быть связаны с диамино- и дикарбоксильными группами. В некоторых вариантах осуществления химерный полипептид конъюгируют с одной, двумя или тремя молекулами ПЭГ через эпсилон-аминогруппу аминокислоты лизина.

Производные полипептидов также включают в себя полипептиды с химическими изменениями одного или нескольких аминокислотных остатков. Такие химические изменения включают в себя амидирование, гликозилирование, ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование и циклизацию. Химические изменения могут происходить однократно в N- или C-конце или в боковых цепях аминокислотных остатков в последовательности пептида. В одном из вариантов осуществления C-конец данных пептидов может содержать свободную -ОН или -NH₂ группу. В другом варианте осуществления N-конец можно экзипировать при помощи изопропилоксикарбонильной группы, п-бутилоксикарбонильной группы, этоксикарбонильной группы, изокапроильной группой ("isocap"), октанильной группой, октилглициновой группой (обозначаемой "G(Oct)" или "octylGly"), группой 8-аминооктановой кислоты, дансилом и/или Fmoc-группой. В некоторых вариантах осуществления циклизацию можно осуществить посредством образования дисульфидных мостиков. Альтернативно, могут иметь место множественные сайты химического изменения по аминокислотной последовательности полипептида.

В определенных вариантах осуществления химерные полипептиды химически изменены так, чтобы включать группы Болтона-Хантера. Реагенты Болтона-Хантера известны в данной области ("Radioimmunoassay and related methods," A.E. Bolton and W.M. Hunter, Chapter 26 of Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, IMMUNOCHEMISTRY, edited by D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications, 1986), и их можно использовать для введения тирозинподобных групп с нейтральной связью посредством аминоконцевой α-аминогрупп или ε-аминогрупп лизина. В некоторых вариантах осуществления N-конец полипептида модифицирован группой Болтона-Хантера. В некоторых вариантах осуществления внутренний остаток лизина модифицирован группой Болтона-Хантера. В некоторых вариантах осуществления могут иметь место множество сайтов модификации Болтона-Хантера по аминокислотной последовательности полипептида. Реагенты Болтона-Хантера. Используемые для модификации полипептида коммерчески доступны, и могут включать в качестве неограничивающих примеров, водорастворимый реагент Болтона-Хантера, сульфосукцинимидил-3-[4-гидрофенил]пропионат (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) и реагент-2 Болтона-Хантера, N-сукцинимидил-3-(4-гидрокси-3-йодофенил)пропионат (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan, catalog # 199-09341). Иллюстративная группа Болтона-Хантера, конъюгированная через амидную связь с полипептидом показана ниже, где пунктирная линия проходит через амидную связь:



Полипептиды можно иодинировать (такие как радиоактивно пометить I) до или после модификации Болтона-Хантера.

Производные полипептидов могут включать в себя одну или несколько модификаций "несущественного" аминокислотного остатка. В контексте по изобретению, "несущественный" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который можно изменить, например, дериватизировать, без исчезновения или существенного снижения активности (например, агонистической активности) химерного полипептида. Химерные полипептиды по изобретению могут включать в себя дериватизацию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотных остатков; среди них, один или несколько аминокислотных остатков могут являться несущественными аминокислотными остатками. Дополнительно, полипептиды по изобретению можно дериватизировать так, чтобы они включали добавления по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот без исчезновения или существенного снижения активности полипептида. Дополнительно, такие несущественные аминокислотные остатки можно заменять на аминокислотный остаток, который пригоден для получения производного, как описано на всем протяжении заявки.

Как применяют на всем протяжении заявки, "аминокислота", "аминокислотный остаток" и т.п. охватывает природные аминокислоты, неприродные аминокислоты и модифицированные аминокислоты. Если не заявлено обратного, любое упоминание аминокислоты, вообще или определенно по названию, включает в себя ссылку как на D-, так и на L-стереоизомеры, если ее структура позволяет иметь такие стереоизомерные формы. Природные аминокислоты включают в себя аланин (Ala), аргинин (Arg), аспа-

рагин (Asn), аспарагиновую кислоту (Asp), цистеин (Cys), глутамин (Gln), глутаминовую кислоту (Glu), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys), метионин (Met), фенилаланин (Phe), пролин (Pro), серин (Ser), треонин (Thr), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и валин (Val). Неприродные аминокислоты включают в качестве неограничивающих примеров гомолизин, гомоаргинин, гомосерин, азетидинкарбоновую кислоту, 2-аминоадипиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, аминопропионовую кислоту, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, третичный бутилглицин, 2,4-диаминоизомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гомопролин, гидроксизин, аллогидроксизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилаланин, N-метилглицин, N-метилизолейцин, N-метилпентилглицин, N-метилвалин, нафталанин, норвалин, норлейцин, орнитин, пентилглицин, пипеколиновую кислоту и тиопролин. Дополнительные неприродные аминокислоты включают в себя модифицированные аминокислотные остатки, которые являются химически блокированными, обратимо или необратимо, или химически модифицированными по их N-концевой аминогруппе или по их группам боковых цепей, как, например, N-метилированные D- и L-аминокислоты или остатки, где функциональные группы боковой цепи химически модифицированы в другую функциональную группу. Например, модифицированные аминокислоты включают в себя сульфоксид метионина; сульфон метионина; бета-метилэфир аспарагиновой кислоты, модифицированную аминокислоту аспарагиновая кислота; N-этилглицин, модифицированную аминокислоту глицин; или карбоксамид аланина, модифицированную аминокислоту аланин. Дополнительные остатки, которые могут быть включены, описаны у Sandberg et al., J. Med. Chem. 41:2481-91, 1998.

Как указано выше, химические группы, подходящие для получения производных химерных полипептидов, включают в себя, например, различные растворимые в воде полимеры. Предпочтительно для терапевтического применения препарата в виде готового продукта, полимер будет фармацевтически приемлемым. Специалист в данной области будет способен выбрать необходимый полимер на основе таких соображений как, будет ли конъюгат полимер/белок использоваться терапевтически, и если так, то на основе необходимой дозировки, времени циркуляции в крови, устойчивости к протеолизу и других соображений. Для химерных полипептидов эффективность дериватизации можно установить, вводя дериватизированный полипептид в требуемой форме (т.е. при помощи омотического насоса или, более предпочтительно, посредством инъекции или инфузии или дополнительно приготовленной для пероральной, легочной или назальной доставки, например) и наблюдая биологические эффекты и биологические ответы, как описано в настоящем документе.

Такие водорастворимые полимеры можно выбрать из группы, состоящей из, например, полиэтиленгликоля, сополимеров этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, поли-1,3-диоксолана, поли-1,3,6-триоксана, сополимера этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислот (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), и декстрана или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоля, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксизтилированные полиолы и поливиниловый спирт. Полиэтиленгликольпропиональдегид может характеризоваться преимуществом при промышленном производстве вследствие его стабильности в воде. Также можно использовать сукцинат, стирол и гидроксизтиловый крахмал.

Производные химерных полипептидов в соответствии с изобретением можно получать, присоединяя полиаминокислоты или аминокислоты с точкой ветвления. Например, полиаминокислоты могут представлять собой дополнительный белок-носитель, такой как Fc-фрагмент, который может служить также для увеличения периода полувыведения из кровообращения химерного полипептида. Дополнительно, такие полиаминокислоты можно выбрать из группы, состоящей из сывороточного альбумина (такого как сывороточный альбумин человека), дополнительного антитела или его части (например, Fc-область), или других полиаминокислот, например, полилизин. Как указано ниже, место присоединения полиаминокислоты может представлять собой N-конец полипептида, или C-конец, или другие участки между ними, и также может присоединяться к полипептиду посредством химической "линкерной" группы, такой как пептидный линкер или непептидный линкер.

Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Для полиэтиленгликоля, предпочтительной является молекулярная масса приблизительно от 2 килодальтон (кДа) до приблизительно 100 кДа (термин "приблизительно" указывает на то, что в препаратах полиэтиленгликоля, некоторые молекулы будут иметь массу большую, некоторые меньшую, чем указанная молекулярная масса) для простоты в обращении и при промышленном производстве. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне приблизительно от 2 до приблизительно 60 кДа. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне приблизительно от 2 до приблизительно 40 кДа. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне приблизительно от 5 до приблизительно 40 кДа. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне прибли-

тельно от 10 до приблизительно 40 кДа. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне приблизительно от 5 до приблизительно 30 кДа. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне приблизительно от 5 до приблизительно 20 кДа. В определенных вариантах осуществления масса полиэтиленгликоля находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 20 кДа. Можно использовать другие размеры в зависимости от необходимого терапевтического профиля (например, необходимой продолжительности замедленного высвобождения, характеристик растворимости, воздействий, если таковые имеются, на биологическую активность, простоты в обращении, степени или отсутствия антигенности и других известных эффектов полиэтиленгликоля, присоединенного к лептину и/или к химерному полипептиду по изобретению). Дополнительные соображения, которые могут повлиять на выбор ПЭГ определенной молекулярной массы, который можно присоединить к химерному полипептиду для получения химерного производного в соответствии с изобретением, включают в себя степень, до которой ПЭГ такой молекулярной массы может снижать агрегацию и/или увеличивать растворимость химерного полипептида, когда он присутствует в фармацевтически приемлемой композиции или препарате, или когда подвергается воздействию физиологических жидкостей или тканей при введении субъекту (таком как при инъекции); снижать частоту встречаемости реакций в месте введения, вызванных введением химерного полипептида при введении субъекту путем инъекции; снижать образование нейтрализующих антител, которые могут индуцироваться против химерного полипептида в результате введения такого химерного полипептида субъекту; и т.п.

Количество молекул полимера, таким образом присоединенного, может меняться, и специалист в данной области будет способен установить проистекающее из этого воздействие на функцию. Можно получить монопроизводное, или можно обеспечить получение ди-, три-, тетра- или некоторую комбинацию при получении производных с использованием одной и той же или различных химических групп (например, полимеры, такие как полиэтиленгликоли разных масс). Соотношение молекул полимера и молекул химерного полипептида, из которого будут получать производное, будет меняться, как их концентрации в реакционной смеси. В основном, оптимальное соотношение в аспекте эффективности реакционной смеси, в которой нет избытка не вступившего в реакцию химерного полипептида или полимера, будет определяться такими факторами, как необходимая степень дериватизации (например, моно-, ди-, три- и т.д.), молекулярной массой выбранного полимера, разветвлен ли или не разветвлен полимер и условия реакции.

Химические группы следует присоединять к химерному полипептиду с учетом воздействий на функциональные или антигенные домены химерного полипептида. Существует множество способов присоединения, доступных специалистам в данной области. Например, в EP 0401384, включенной в настоящий документ в качестве ссылки (связывание ПЭГ с G-CSF), см. также Malik et al., 1992, Exp. Nematol. 20:1028-1035 (сообщающей о ПЭГилировании GM-CSF, используя тризилхлорид). Например, полиэтиленгликоль может ковалентно связываться с аминокислотными остатками через реакционноспособную группу, такую как, свободная амино- или карбоксильная группа. Реакционноспособными группами являются группы, с которыми может связаться активированная молекула полиэтиленгликоля. Аминокислотные остатки, содержащие свободную аминогруппу, могут включать в себя остатки лизина и N-концевой аминокислотный остаток. Остатки, содержащие свободную карбоксильную группу, могут включать в себя остатки аспарагиновой кислоты, остатки глутаминовой кислоты и C-концевой аминокислотный остаток. Сульфгидрильные группы также можно использовать в качестве реакционноспособной группы для присоединения молекулы(молекул) полиэтиленгликоля. Предпочтительным для терапевтических целей является присоединение к аминогруппе, такое как присоединение к N-концу или к группе лизина. Присоединения к остаткам, важным для связывания с рецептором, следует избегать, если необходимо связывание с рецептором.

Может специально потребоваться сконструировать и получить химически модифицированные с N-конца химерные полипептиды по изобретению. Применяя полиэтиленгликоль в качестве иллюстрации настоящих композиций, можно выбрать из множества молекул полиэтиленгликоля (по молекулярной массе, разветвленности и т.д.) соотношение молекул полиэтиленгликоля к молекулам химерного полипептида в реакционной смеси, тип реакции ПЭГилирования, который необходимо осуществить, и способ получения выбранного ПЭГилированного с N-конца белка. Способ получения ПЭГилированного с N-конца препарата (т.е. отделение данной группы от других моноПЭГилированных групп, в случае необходимости) может представлять собой очистку ПЭГилированного с N-конца вещества из популяции молекул ПЭГилированных белков.

Селективную N-концевую химическую модификацию можно осуществлять восстановительным алкилированием, при котором используется различная реакционноспособность разных типов первичных аминогрупп (лизин в сравнении с N-концом), доступных для получения производного в определенном белке. При соответствующих условиях реакции достигают по существу селективное получение N-концевого производного белка с полимером, содержащим карбонильную группу. Например, можно селективно ПЭГилировать белок с N-конца, проводя реакцию при величине pH, которая позволяет воспользоваться различиями в pKa между ϵ -аминогруппой остатков лизина и pKa α -аминогруппы N-

концевого остатка белка. При помощи такого избирательного получения производного контролируется присоединение водорастворимого полимера к белку: конъюгация с полимером имеет место преимущественно на N-конце белка и не происходит никакой значительной модификации других реакционноспособных групп, таких как аминокислотные боковые цепи лизина. Применяя восстановительное алкилирование, водорастворимый полимер может представлять собой тип, описанные выше, и он должен содержать один реакционноспособный альдегид для связывания с белком. Можно использовать полиэтиленгликольпропиональдегид, содержащий один реакционноспособный альдегид.

III. Способы конструирования и получения.

Создание конструкций. Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, можно сконструировать на аминокислотном уровне. Данные последовательности затем можно обратно транслировать, применяя множество продуктов программного обеспечения, известных в данной области, так что нуклеотидная последовательность оптимизируется в отношении требуемого хозяина экспрессии, основываясь, например, на экспрессии белка, оптимизации кодонов, составе участка рестрикции. Например, можно оптимизировать нуклеотидную последовательность для экспрессии белка на основе *E.coli* и для состава участка рестрикции. На основе интересующей нуклеотидной последовательности, можно предложить перекрывающиеся олигонуклеотиды для многостадийной ПЦР, как известно в данной области. Данные олигонуклеотиды можно использовать в множественных реакциях ПЦР в условиях, хорошо известных в данной области, чтобы сконструировать кДНК, кодирующую интересующий белок. В качестве одного примера служит 1X буфер AmpliTaq, 1,3 mM MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 4 ед. AmpliTaq Gold, 0,2 мкМ каждого праймера (AmpliTaq Gold, ABI), с параметрами для циклов: (94C:30 с, 58C:1 мин, 72C:1 мин), 35 циклов.

Участки рестрикции можно добавлять к концам продуктов ПЦР для применения в лигировании вектора, как известно в данной области. Специфические участки могут включать в себя NdeI и XhoI, так что кДНК может тогда находиться в надлежащей рамке считывания в экспрессирующем векторе pET45b (Novagen). Используя данные участки, любые N-концевые His-метки, которые находятся в данном векторе, можно удалить, поскольку участок начала трансляции был бы тогда ниже метки. Как только завершается экспрессия конструктов, можно провести проверку секвенированием, применяя, например, праймер к T7-промотору, праймер к T7-терминатору и стандартные протоколы ABI BigDye Term v3.1, как известно в данной области. Информацию о последовательности можно получать, например, при помощи ДНК-анализатора ABI 3730 и можно проанализировать, используя программное обеспечение Vector NTI v.10 (Invitrogen). Экспрессирующие конструкции можно конструировать модульным образом так, что последовательности линкеров легко можно вырезать или изменять, как известно в данной области.

Участки распознавания протеаз, известные в данной области или описываемые в настоящем документе, можно встраивать в конструкции, применимые для разработки, конструирования, манипуляции и получения рекомбинантных химерных полипептидов, описываемых в настоящем документе.

Основные способы получения. Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, можно получать, применяя биологические, химические способы и/или способы рекомбинантной ДНК, которые известны в данной области. Иллюстративные способы описаны в настоящем документе и в патенте США № 6872700; WO 2007/139941; WO 2007/140284; WO 2008/082274; WO 2009/011544; и публикации США № 2007/0238669, описания которых полностью и во всех отношениях включено в настоящий документ в качестве ссылки. Другие способы получения соединений приведены в настоящем документе.

Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, можно получать, применяя стандартные методики твердофазного пептидного синтеза, такие как для автоматизированного или полуавтоматизированного пептидного синтезатора. Химерные полипептиды можно получить при небиологическом пептидном синтезе, используя аминокислоты и/или производные аминокислот, содержащие реакционноспособные защищенные боковые цепи, при небиологическом пептидном синтезе, включающем в себя пошаговое связывание аминокислот и/или производных аминокислот для получения полипептида по первому аспекту, содержащего реакционноспособные защищенные боковые цепи, удаление защитных групп с реакционноспособных боковых цепей полипептида и сворачивание полипептида в водном растворе. Таким образом, нормальные аминокислоты (например, глицин, аланин, фенилаланин, изолейцин, лейцин и валин) и предварительно защищенные производные аминокислот используют для последовательного построения последовательности полипептида в растворе или на твердой подложке в органическом растворителе. Когда построена полная последовательность полипептида, защитные группы удаляют и полипептиду позволяют произвестись сворачивание в водном растворе.

Типично, применяя такие методики, защищенную альфа-N-карбамоилом аминокислоту и аминокислоту, прикрепленную к растущей пептидной цепи на смоле, связывают при RT в инертном растворителе (например, в диметилформамиде, N-метилпирролидиноне, метилхлориде и тому подобном) в присутствии связывающих агентов (например, дициклогексилкарбодиимида, 1-гидроксibenзотриазола и тому подобного) в присутствии основания (например, диизопропилэтиламина и тому подобного). Альфа-N-карбамоильную защитную группу удаляют с полученного пептида на смоле, применяя реагент (например, трифторуксусную кислоту, пиперидин и т.п.), реакцию связывания повторяют со следующей требуемой N-защищенной аминокислотой, которую необходимо добавить к пептидной цепи. Подходя-

щие N-защитные группы хорошо известны в данной области, такие как t-бутилоксикарбонил (tBoc), флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) и т.п. Растворители, производные аминокислот и 4-метилбензгидриламиновую смолу, применяемые в пептидном синтезаторе можно приобрести в Applied Biosystems Inc. (Foster City, Calif.).

В отношении химического синтеза для химерных полипептидов можно использовать твердофазный пептидный синтез, так как в основном твердофазный синтез является эффективным подходом с превосходной возможностью наращивания производства до коммерческого масштаба. Твердофазный пептидный синтез можно выполнить при помощи автоматизированного пептидного синтезатора (модель 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.), используя систему NMP/HOBt (опция 1) и tBoc-или Fmoc-химию (см. Applied Biosystems User's Manual for the ABI 430A Peptide Synthesizer, Version 1,3B Jul. 1, 1988, section 6, p. 49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.) с использованием кэппирования. Комплекс Boc-пептид-смола можно расщепить с использованием HF (от -5 до 0°C, 1 ч). Пептид можно экстрагировать из смолы при использовании попеременно воды и уксусной кислоты и фильтраты можно лиофилизировать. Комплекс Fmoc-пептид-смола можно расщепить согласно стандартным способам (например, Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, p. 6-12). Пептиды можно также собрать, используя синтезатор Advanced Chem Tech Synthesizer (Model MPS 350, Louisville, Ky.).

Соединения, описываемые в настоящем документе, можно также получить, применяя способы рекомбинантной ДНК, используя известные в данной области способы, такие как Sambrook et al., 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d Ed., Cold Spring Harbor. Непептидные соединения можно получать известными в данной области способами. Например, содержащие фосфат аминокислоты и пептиды, содержащие такие аминокислоты, можно получать, используя известные в данной области способы, такие, как описано у Bartlett et al., 1986, Biorg. Chem. 14:356-377.

Химерные полипептиды можно альтернативно получать рекомбинантными способами, хорошо известными в данной области. См., например, Sambrook et al., 1989 (Id.). Такие химерные полипептиды, получаемые рекомбинантными способами, можно экспрессировать из полинуклеотида. Специалист в данной области определит, что полинуклеотиды, включая ДНК и РНК, которые кодируют такие химерные полипептиды, можно получить из кДНК дикого типа, например лептина человека, принимая во внимание вырожденность частоты использования кодона, и можно дополнительно сконструировать, как требуется для того, чтобы встроить указанные замены. Такие полинуклеотидные последовательности могут содержать кодоны, способствующие транскрипции и трансляции мРНК в микробальном хозяине. Такие промышленно производимые последовательности можно легко сконструировать согласно способам, хорошо известным в данной области. См., например, WO 83/04053, включенную в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме и во всех отношениях. Указанные выше полинуклеотиды также могут необязательно кодировать N-концевой остаток метионина. Непептидные соединения, применимые в настоящем изобретении можно получать известными в данной области способами. Например, содержащие фосфат аминокислоты и пептиды, содержащие такие аминокислоты можно получать, применяя известные в данной области способы. См., например, Bartlett и Landen, 1986, Bioorg. Chem. 14: 356-77.

Множество систем экспрессирующий вектор/хозяин можно применять, чтобы они включали в себя и экспрессировали кодирующую последовательность химерного полипептида. Такие системы включают в себя в качестве неограничивающих примеров микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантными бактериофагами, плазмидными или космидными ДНК-экспрессирующими векторами; дрожжи, трансформированные дрожжевыми экспрессирующими векторами; системы из клеток насекомых, инфицированные вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирус); системы из растительных клеток, трансфецированные вирусными экспрессирующими векторами (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированные бактериальными экспрессирующими векторами (например, плазмиды Ti или pBR322); или системы из клеток животных. Клетки млекопитающих, которые применимы для рекомбинантного получения белков включают в себя в качестве неограничивающих примеров клетки VERO, клетки HeLa, клеточные линии яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS (такие как COS-7), клетки WI 38, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 и 293. Иллюстративные протоколы для рекомбинантной экспрессии белка описаны в настоящем документе и/или известны в данной области.

Как таковые, полинуклеотидные последовательности применимы при создании новых и применимых вирусных и плазмидных ДНК-векторов, новых и применимых трансформированных и трансфецированных прокариотических и эукариотических клеток-хозяев (включая бактериальные, дрожжевые и клетки млекопитающих, растущих в культуре), и новых и применимых способов для роста в культуре таких клеток-хозяев, способных экспрессировать настоящие химерные полипептиды. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие химерные полипептиды в настоящем документе, можно применять для генотерапии в случаях, где недостаточное производство химерных полипептидов было бы уменьшено, или была бы обеспечена необходимость в их повышенном уровне.

Настоящее изобретение также относится к способам получения рекомбинантной ДНК настоящих химерных полипептидов. Предлагается способ получения химерных полипептидов из клетки-хозяина, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие химерный полипептид, охватывающий (а) культивиру-

вание клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие химерный полипептид, в условиях, способствующих экспрессии молекулы ДНК; и (b) получение химерного полипептида.

Клетки-хозяева могут быть прокариотическими или эукариотическими и включают в себя бактерии, клетки млекопитающих (такие как клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки обезьяны, клетки почки новорожденного хомяка, злокачественные клетки или другие клетки), дрожжевые клетки и клетки насекомых.

Системы клеток-хозяев млекопитающих для экспрессии рекомбинантного белка тоже хорошо известны специалистам в данной области. Линии клеток-хозяев можно выбирать в отношении определенной способности процессировать экспрессируемый белок или производить определенные посттрансляционные модификации, которые будут полезны при обеспечении активности белка. Такие модификации полипептида включают в себя в качестве неограничивающих примеров, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование.

Посттрансляционный процессинг, при котором расщепляется "препро" форма белка, может также быть важным для правильного встраивания, укладки и/или функции. Разные клетки-хозяева, такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 и т.п., обладают специфичным клеточным аппаратом и особенными механизмами для таких посттрансляционных активностей, и их можно выбирать, чтобы гарантировать правильную модификацию и процессинг введенного чужеродного белка.

Альтернативно, дрожжевые системы можно применять для создания химерных полипептидов по настоящему изобретению. Кодирующую область ДНК химерных полипептидов амплифицируют ПЦР. ДНК, кодирующую дрожжевую препо-альфа лидирующую последовательность амплифицируют из дрожжевой геномной ДНК в реакции ПЦР, применяя один праймер, содержащий нуклеотиды 1-20 гена фактора альфа-спаривания и другой праймер, комплементарный нуклеотидам 255-235 данного гена (Kurjan и Herskowitz, 1982, Cell, 30: 933-43). Препо-альфа-лидирующую кодирующую последовательность и фрагменты кодирующей последовательности химерного полипептида лигируют в плазмиду, содержащую промотор дрожжевой алкогольдегидрогеназы (ADH2), так что промотор управляет экспрессией слитого белка, содержащего препо-альфа-фактор, слитый со зрелым химерным полипептидом. Как указано у Rose и Broach, Meth. Enz. 185: 234-79, Goeddel ed, Academic Press, Inc., San Diego, California (1990), вектор дополнительно включает в себя терминатор транскрипции ADH2 ниже сайта клонирования, "2-микронный" участок начала репликации дрожжей, ген leu-2d дрожжей, гены REP1 и REP2 дрожжей, ген бета-лактамазы E.coli и участок начала репликации E.coli. Гены бета-лактамазы и leu-2d обеспечивают селекцию в бактериях и дрожжах соответственно. Ген leu-2d также способствует увеличению количества копий плазмиды в дрожжах для индукции более высоких уровней экспрессии. Гены REP1 и REP2 кодируют белки, вовлеченные в регуляцию количества копий плазмиды.

Конструкции ДНК, описанные в предыдущем абзаце, трансформируют в дрожжевые клетки, применяя известный способ, например, обработку ацетатом лития (Steams et al., 1990, Meth. Enz. 185: 280-297). Промотор ADH2 индуцируется при истощении глюкозы в средах для выращивания (Price et al., 1987, Gene 55:287). Препо-альфа-последовательность влияет на секрецию слитого белка из клеток. Наряду с этим, дрожжевой белок KEX2 отщепляет препоследовательность от зрелых химерных полипептидов (Bitter et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330-5334).

Химерные полипептиды по изобретению можно также рекомбинантно экспрессировать в дрожжах, например в Pichia, используя коммерчески доступную экспрессирующую систему, например, Pichia Expression System (Invitrogen, San Diego, California), по инструкциям производителя. Данная система также основана на препо-альфа-последовательности для контроля секрецией, но интересующая транскрипция управляется промотором алкогольоксидазы (AOX1) при индукции метанолом. Секретированный химерный полипептид очищают от дрожжевой среды для выращивания, например, способами, применяемыми для очистки указанного химерного полипептида из бактериальной надосадочной жидкости и надосадочной жидкости клеток млекопитающего.

Альтернативно, ДНК, кодирующую химерный полипептид, можно клонировать в экспрессирующий вектор бакуловируса, например, pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). Данный кодирующий химерный полипептид вектор затем применяют согласно указаниям производителя (PharMingen) или по известным методикам для инфицирования клеток Spodoptera frugiperda, растущих, например, в безбелковых средах sF9, и для получения рекомбинантного белка. Белок очищают и концентрируют из среды, применяя известные в данной области способы, например, на колонке гепарин-сефарозы (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) и на последовательных колонках с молекулярными ситами (Amicon, Beverly, Massachusetts), и ресуспендируют в подходящем растворе, например PBS. Для того чтобы охарактеризовать белок можно использовать анализ SDS-PAGE, например, демонстрируя одну полосу, которая подтверждает размер требуемого химерного полипептида, также можно использовать анализ полной аминокислотной последовательности, например, секвенирование по Эдману на пептидном секвенаторе Proton 2090, или подтверждение его N-концевой последовательности.

Например, последовательность ДНК, кодирующую предсказанный зрелый химерный полипептид, можно клонировать в плазмиду, содержащую необходимый промотор и, необязательно, лидирующую последовательность (см., например, Better et al., 1988, Science 240:1041-1043). Последовательность такой

конструкции можно подтвердить при автоматическом секвенировании. Затем плазмиду трансформируют в *E. coli*, штамм MC1061, используя стандартные процедуры, применяющие инкубацию в CaCl_2 и воздействие тепловым шоком на бактерии (Sambrook et al., Id.). Трансформированные бактерии выращивают в среде LB, дополненной карбенициллином, и продукцию экспрессированного белка индуцируют выращиванием в подходящей среде. При наличии, лидирующая последовательность будет влиять на секрецию зрелого химерного полипептида и будет отщепляться во время секреции. Секретированный рекомбинантный химерный полипептид очищают от бактериальной среды для культивирования способом, описываемым в настоящем документе.

Альтернативно, химерные полипептиды, альтернативно, сконструированные полипептиды можно экспрессировать в системе насекомых. Системы насекомых для экспрессии белка хорошо известны специалистам в данной области. В одной такой системе, *Autographa californica* вирус ядерного полиэдроза (AcNPV) применяют в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в клетках *Spodoptera frugiperda* или в *Trichoplusia larvae*. Кодировующую последовательность химерного полипептида клонируют в несущественный участок вируса, такой как ген полиэдрина, и размещают под контролем промотора полиэдрина. Успешное встраивание химерного полипептида приведет к неактивному состоянию гена полиэдрина и к получению рекомбинантных вирусов без белковой оболочки. Рекомбинантные вирусы затем применяют для инфицирования *S. frugiperda* cells или *Trichoplusia larvae*, в которых экспрессируется сконструированный полипептид по настоящему изобретению (Smith et al., 1983, J. Virol. 46:584; Engelhard et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227).

В другом примере последовательность ДНК, кодирующую химерные полипептиды, можно амплифицировать при ПНР и клонировать в подходящий вектор, например, pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Вектор pGEX создан для продукции слитого белка, включающего в себя глутатион-S-трансферазу (GST), кодируемую вектором, и белок, кодируемый фрагментом ДНК, встроенным в сайт клонирования вектора. Праймеры для ПЦР можно сконструировать так, чтобы включить, например, подходящий сайт расщепления. Рекомбинантный слитый белок можно затем отщепить от части GST в слитом белке. Конструкцию pGEX-3X/химерный полипептид трансформируют в клетки XL-1 Blue *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA), и отдельные трансформанты выделяют и выращивают при 37°C в среде LB (дополненной карбенициллином) до оптической плотности 0,4 при длине волны 600 нм, после чего следует дальнейшая инкубация в течение 4 ч в присутствии 0,5 мМ изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). ДНК плазмиды из отдельных трансформантов очищают и частично секвенируют, применяя автоматические секвенаторы, чтобы подтвердить наличие встраивания требуемого гена, кодирующего химерный полипептид, в правильной ориентации.

Слитый белок, когда ожидается, что он будет получен в виде нерастворимого тельца включения у бактерий, можно очистить, как описано выше или как следует ниже. Клетки получают посредством центрифугирования; промывают в 0,15 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM ЭДТА; и обрабатывают 0,1 мг/мл лизоцимом (Sigma Chemical Co.) в течение 15 мин при RT. Лизат очищают озвучиванием и клеточные инородные вещества осаждают при центрифугировании в течение 10 мин при 12000×g. Содержащий слитый белок осадок ресуспендируют в 50 mM Tris, pH 8, и 10 mM ЭДТА, нанесенными слоями над 50% глицерином и центрифугируют в течение 30 мин. при 6000×g. Осадок ресуспендируют в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), не содержащем Mg^{++} и Ca^{++} . Слитый белок далее очищают при фракционировании ресуспендированного осадка в денатурирующем полиакриламидном геле с SDS (Sambrook et al., выше). Гель выдерживают в 0,4 M KCl для визуализации белка, который вырезают и осуществляют электроэлюцию в буфере для проведения электрофореза без SDS. Если слитый белок GST/химерный полипептид получают в бактериях в качестве растворимого белка, его можно очищать, применяя GST Purification Module (Pharmacia Biotech).

Слитый белок можно подвергнуть расщеплению для удаления GST от зрелого химерного полипептида. Реакционную смесь для расщепления (20-40 мкг слитого белка, 20-30 единиц тромбина человека (4000 Ед./мг (Sigma) в 0,5 мл PBS) инкубируют 16-48 ч при RT и загружают в гель для SDS-PAGE в денатурирующих условиях для разделения продуктов реакции. Гель выдерживают в 0,4 M KCl для визуализации белковых полос. Идентичность белковых полос, соответствующих ожидаемой молекулярной массе химерного полипептида, можно подтвердить частичным анализом аминокислотной последовательности, применяя автоматический секвенатор (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, California).

В особенно иллюстративном способе рекомбинантной экспрессии химерных полипептидов по настоящему изобретению, клетки 293 можно совместно трансфецировать с плазмидами, содержащими кДНК химерных полипептидов кДНК в векторе pCMV (5' промотор CMV, 3' полиА последовательность HGH) и pSV2neo (содержащем ген устойчивости нео) фосфаткальциевым способом. В одном из вариантов осуществления векторы следует линеаризовать для трансфекции при помощи ScaI. Схожим образом, можно использовать альтернативные конструкции, использующие подобный вектор pCMV с встроенным геном нео. Подходящие клеточные линии выбирают из клонов от одной клетки, ограничивая разведение в средах для выращивания, содержащих 0,5 мг/мл G418 (подобного неомицину антибиотика) в течение 10-14 дней. Клеточные линии проверяют в отношении экспрессии химерных полипептидов при помощи

ELISA или вестерн-блоттинга и клеточные линии с высокой экспрессией наращивают для крупномасштабного роста.

Предпочтительно, что трансформированные клетки применяют для продолжительной высокопроизводительной продукции белка, и как таковая устойчивая экспрессия является необходимой. Как только такие клетки трансформируются векторами, которые содержат селективные маркеры совместно с необходимой экспрессирующей кассетой, клеткам можно позволить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде до переноса на селективные среды. Селективный маркер конструируют так, чтобы придать устойчивость к селекции и его присутствие позволяет вырастить и выделить клетки, которые успешно экспрессируют встроенные последовательности. Устойчивые очаги стабильно трансформированных клеток можно размножить, применяя культуральные методики, подходящие для клеток.

Можно использовать множество систем селекции, чтобы извлечь клетки, которые трансформированы в отношении продукции рекомбинантного белка. Такие системы селекции включают в качестве неограничивающих примеров, тимидинкиназу HSV, гены гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы и аденинфосфорибозилтрансферазы, в tk-, hgrpt- или arpt-клетках соответственно. Также, устойчивость к метаболитам можно использовать как основу для селекции к dhfr, который придает устойчивость к метотрексату; gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте; neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G418; также, который придает устойчивость к хлорсульфону; и hyg, который придает устойчивость к гигромицину. Дополнительные гены пригодные для селекции, которые можно применять, включают в себя trpB, который позволяет клеткам использовать индол вместо триптофана, или hisD, который позволяет клеткам использовать гистинол вместо гистидина. Маркеры, которые придают видимые признаки для определения трансформантов, включают в себя антоцианины, бета-глюкуронидазу и ее субстрат, GUS, и люциферазу и ее субстрат, люциферин.

Химерные полипептиды по настоящему изобретению Сконструированные полипептиды по настоящему изобретению можно получать, применяя сочетание и автоматизированного пептидного синтеза, и рекомбинантных способов. Например, химерный полипептид по настоящему изобретению сочетание из модификаций, включающих в себя делецию, замену, вставку и получение производного при пегилировании (или при помощи другой группы, например полимера, ацильной цепи жирной кислоты, С-концевого амидирования). Такой химерный полипептид можно получить постадийно. На первой стадии промежуточный химерный полипептид, содержащий модификации из делеции, замены, вставки и любого их сочетания, можно получить рекомбинантными способами, как описано. Затем после необязательной стадии очищения, как описано в настоящем документе, промежуточный химерный полипептид ПЭГилируют (или подвергают другой химической дериватизации, например, ацилированию, С-концевому амидированию) посредством химической модификации с подходящим реагентом для пегилирования (например, из NeKtar Transforming Therapeutics, San Carlos, California) для получения требуемого производного химерного полипептида. Специалист в данной области понимает, что описанные выше процедуры можно обобщить для применения к химерному полипептиду, содержащему сочетание модификаций, выбранных из делеции, замены, вставки, производного и других способов модификации, хорошо известных в данной области и рассматриваемых в настоящем изобретении.

Пептиды можно любым количеством известных в данной области способов, включающих в себя способы, как описано в настоящем документе. В одном способе очищают при помощи ОФ-ВЭЖХ (препаративной и аналитической), применяя систему Waters Delta Prep 3000. Препаративную колонку C4, C8 или C18 (10 μ , 2,2 \times 25 см; Vydac, Hesperia, Калифорния) можно использовать для выделения пептидов, и чистоту можно определить, применяя аналитическую колонку C4, C8 или C18 (5 μ , 0,46 \times 25 см; Vydac). Растворители (A=0,1% TFA/вода и B=0,1% TFA/CH₃CN) можно доставлять к аналитической колонке при скорости потока 1,0 мл/мин и к препаративной колонке при 15 мл/мин. Аминокислотный анализ можно проводить на системе Waters Pico Tag и обрабатывая данные, используя программу Maxima. Пептиды можно гидролизовать при кислотном гидролизе в газовой фазе (115°C, 20-24 ч). Гидролизаты можно дериватизировать и анализировать стандартными способами (Cohen et al., The Pico TAG Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, p. 11-52, Millipore Corporation, Milford, Mass. (1989)). Анализ с бомбардировкой ускоренными атомами можно осуществлять при помощи M-Scan, Incorporated (West Chester, Pa.). Калибровку масс можно проводить, применяя йодид цезия или йодид цезия/глицерин. Анализ методом плазменной десорбционной ионизации с использованием времяпролетной детекции можно проводить на масс-спектрометре Applied Biosystems Bio-Ion 20.

Анализ экспрессии химерного полипептида. Доступны способы для анализа уровня экспрессии белка клеткой-хозяином. Способы, применимые для анализа уровня экспрессии белка клеткой-хозяином приведены в качестве примеров в следующем ниже типичном протоколе. Приблизительно 25 мкл клеток BL21 E.coli трансформируют 2 мкл плазмидной ДНК (экспрессирующий вектор для химерного полипептида). Клетки можно высевать и инкубировать в течение ночи при 37°C или при комнатной температуре (RT) в течение периода времени 48 ч. Единичную колонию можно выделить и применить для роста стартовой культуры в 4 мл среды LB с подходящим антибиотиком в течение ~6 ч. Глицериновые маточные растворы можно приготовить, добавляя 100 мкл 80% стерильного глицерина к 900 мкл маточного

раствора, который можно затем осторожно перемешать и хранить при -80°C . 250 мкл образца можно удалить для неиндуцированного ТСП образца. Аликвоты, например, 2 мл среды Magic Media, содержащей подходящий антибиотик, можно инокулировать 5 мкл стартовой культурой, которые можно затем инкубировать в течение ночи (вплоть до 24 ч) при 37°C , 300 об/мин. Как известно в данной области, среда Magic Media является самоиндуцируемой. Альтернативно, 60 мл Magic Media, содержащей подходящий антибиотик, можно инокулировать 60 мкл стартовой культурой в колбе Томпсона объемом 250 мл или 125 мл, которую затем можно инкубировать в течение ночи (вплоть до 24 ч) при 30°C , 300 об/мин. После инкубирования 250 мкл культуры можно удалить из каждой пробирки и клетки осадить. Клетки можно ресуспендировать в 1 мл 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, к которому можно добавлять 0,1 объем (100 мкл) реагента для культивирования POP и 1 мкл г-лизоцима (разведение в г-лизоцимовом буфере 1:750). Смесь можно хорошо перемешать и инкубировать по меньшей мере 10 мин при RT. Препараты можно затем центрифугировать 10 мин при $14000 \times G$. Надосадочную жидкость (растворимую фракцию) можно удалить и сохранить и образцы можно приготовить для анализа в геле (15 мкл + 5 мкл LDS). Оставшийся осадок с тельцами включения можно ресуспендировать в 1 мл 1% SDS при обработке ультразвуком. Образец можно приготовить для анализа в геле (15 мкл + 5 мкл LDS). Для неиндуцированных образцов можно добавить 1,0 объем реагента для культивирования POP и 1 мкл г-лизоцима (1:750 разведение в г-лизоцимовом буфере 1:750). Смесь можно хорошо перемешать и инкубировать по меньшей мере 10 мин при RT. Данные образцы, возможно, не следует центрифугировать. Образец затем можно приготовить для анализа в геле (15 мкл + 5 мкл LDS). Гели NU-PAGE (4-12%), невосстановленные в буфере 1X MES можно прогнать и окрасить по протоколу с микроволновой печью SimplyBlue. Обесцвечивание можно проводить в течение ночи, как известно в данной области. Изображение геля сохраняют и анализируют для того, чтобы определить уровни экспрессии белка.

Получение телец включения. Для химерных полипептидов, которые обнаруживают во фракции телец включения, может оказаться полезной следующая ниже процедура. Клеточный осадок ресуспендируют как минимум в 100 мл лизирующего буфера для каждой 50 мл культуры. При добавлении 30 мл, можно использовать пипетки на 10 мл для ресуспендирования, затем пробирки можно промыть дополнительными 70 мл. Раствор ресуспендированных клеток может многократно проходить, например, 4 прогона, обработку в микрофлюидизаторе[®] при 100 фунт/дюйм² (мин), позаботившись о том, чтобы держать камеру в ледяной воде во время всего процесса. Псевдооживленную смесь можно центрифугировать при $14000 \times g$, 20 мин (например, JLA 10,5, 10000 об/мин, используя бутылки фирмы Nalgene[®] объемом 250 мл). Осадок с тельцами включения можно ресуспендировать на льду в охлажденном лизирующем буфере с магнитным элементом мешалки и пластиной для смешивания в течение 1 ч при 4°C после разрушения носиком пипетки. Осадок можно ресуспендировать второй раз в дистиллированной H_2O с магнитным элементом мешалки и пластиной для смешивания в течение 1 ч при 4°C после разрушения носиком пипетки, после чего следует центрифугирование при $14000 \times g$, 15 мин. Надосадочную жидкость можно удалить и выбросить. Полученный продукт можно хранить при -80°C .

Очистка белка. Как описано в настоящем документе, известно множество способов для выделения экспрессированных полипептидов. Ниже следует один пример. Осадки с тельцами включения можно растворить в подходящем объеме растворяющего буфера (8M мочевины или 8M гуанидин, 50 mM Tris, 10 mM DTT, pH 7,75) в течение 1 ч при RT. Растворенный осадок можно центрифугировать в течение 20 мин при 27000 g. Отфильтрованную (например, 0,4 мкм) надосадочную жидкость можно перенести капля за каплей в подходящий объем буфера для повторного сворачивания (50 mM Tris-HCl, 1M мочевины, 0,8 M аргинин, 4 mM цистеин, 1 mM цистамин; pH 8) при RT. Полученный в результате раствор можно затем поместить в окружающую среду при 4°C в течение ночи или дольше при осторожном перемешивании. Образцы можно сконцентрировать и прогнать на колонке для гель-фильтрации (Superdex75 26/60) при 1-2 мл/мин в окружающей среде 4°C , применяя AKTA FPLC GE Healthsciences. Фракции, содержащие соответствующий белок, можно идентифицировать при SDS-PAGE, объединить и прогнать на второй колонке для гель-фильтрации. Объединенный белок можно затем концентрировать на фильтре Amicon до соответствующей концентрации и анализировать в отношении уровней эндотоксина, применяя, например, Endosafe PTS Reader (Charles River), как известно в данной области. Если образец белка удовлетворяет критериям для эндотоксина, его можно стерильно отфильтровать, разделить на аликвоты и подвергнуть анализу контроля качества. Анализы контроля качества могут включать в себя аналитическую эксклюзионную ВЭЖХ, невосстанавливающий SDS PAGE и ОФ-ВЭЖХ -МС для получения соответствующей массы. Белки можно получать в 1xPBS (137 mM хлорида натрия, 2,7 mM хлорида калия, 4,3 mM дифосфата натрия, 1,4 mM дигидрофосфат калия, pH 7,2), разделять на аликвоты и быстро замораживать для хранения при от -70 до -80°C .

IV. Способы применения и лечения заболеваний.

Показания к применению. Множество заболеваний и нарушений, как предусмотрено, благоприятно лечится полипептидными соединениями и способами, описываемыми в настоящем документе.

Ожирение и избыточная масса тела. Ожирение и связанные с ним нарушения, включающие в себя избыточную массу тела, являются распространенными и серьезными проблемами здравоохранения в Со-

единенных Штатах и во всем мире. Ожирение верхней части тела является наиболее сильным известным фактором риска развития сахарного диабета 2 типа и сильным фактором риска для развития сердечно-сосудистого заболевания. Ожирение является признанным фактором риска для развития гипертонии, атеросклероза, застойной сердечной недостаточности, инсульта, заболевания желчного пузыря, остеоартрита, внезапной остановки дыхания во сне, репродуктивных нарушений, таких как синдром поликистозных яичников, раковые образования в груди, простате и толстой кишке, и повышенная частота возникновения осложнений при общем наркозе. См., например, Kopelman, 2000, *Nature* 404:635-43.

Ожирение снижает продолжительность жизни и влечет за собой серьезный риск возникновения упомянутых выше сопутствующих заболеваний, а также таких нарушений, как инфекции, варикозное расширение вен, акантокератодермия, экзема, непереносимость физической нагрузки, резистентность к инсулину, гиперхолестеринемия при гипертонии, желчнокаменная болезнь, повреждение опорно-двигательного аппарата и тромбоэмболическая болезнь. См., например, Rissanen et al., 1990, *Br. Med. J.*, 301:835-7. Ожирение также является фактором риска развития группы состояний, называемой синдромом резистентности к инсулину, или "синдром Х" и метаболический синдром. Во всем мире стоимость медицинского обслуживания больных ожирением и связанными нарушениями огромна.

Патогенез ожирения, как полагают, является многофакторным. Проблема состоит в том, что у пациентов с ожирением усваиваемость питательных элементов и потребление энергии не приходит к равновесию, пока имеет место избыток жировой ткани. Центральная нервная система (ЦНС) контролирует энергетический баланс и координирует множество поведенческих, автономных и эндокринных действий, соответствующих метаболическому статусу. Механизмы или системы, которые контролируют такие действия, во многом распределены по всему переднему мозгу (например, гипоталамус), заднему мозгу (например, ствол головного мозга) и спинного мозга. В конечном счете, метаболическая (т.е. усваиваемость калорий) и познавательная (т.е. приобретенные предпочтения) информация от таких систем объединяется и решение о вступлении в поведение, связанное со стремлением к пище (поиск пищи) и консуматорное поведение (прием пищи) либо принимается (приобретение и принятие пищи), либо не принимается (окончание приема пищи). Гипоталамус, как думают, принципиально ответственен за объединение данных сигналов и за передачу затем команды к стволу мозга. Ядра ствола мозга, которые управляют элементами консуматорной двигательной контролирующей системы (например, мышцы, ответственные за жевание и глотание). В силу этого такие ядра ЦНС дословно обозначали, как представляющие собой "конечный общий путь" для пищевого поведения.

Нервно-анатомические и фармакологические доказательства поддерживают идею, что сигналы об энергетическом и питательном гомеостазе объединяются в ядрах переднего мозга, и что консуматорные двигательные контролирующие системы расположены в ядрах ствола мозга, вероятно, в областях, окружающих тригеминальные двигательные ядра. Существует глубокая взаимообратная связь между гипоталамусом и стволом мозга. Множество терапевтических средств против ожирения, направленных на ЦНС (например, низкомолекулярные соединения и пептиды), преимущественно фокусируются на субстратах переднего мозга, располагающихся в гипоталамусе и/или на субстратах заднего мозга, располагающихся в стволе мозга.

Ожирение остается трудноизлечимым, хроническим, по существу, неискоренимым метаболическим нарушением. Таким образом, существует необходимость в новых способах лечения, применимых для снижения массы тела и/или поддержания массы тела у пациента. Такие способы лечения привели бы к сильному положительному воздействию на здоровье пациента. Способы и схемы лечения, применяющие химерные пептиды, описываемые в настоящем документе, или в отдельности, или в сочетании с другими средствами от ожирения (см., например, WO 2009064298 и US 20080207512) могут оказать такое положительное воздействие.

Лептиновая недостаточность. Лептиновая недостаточность, как было показано, является результатом ожирения. Одна форма лептиновой недостаточности представляет собой врожденную лептиновую недостаточность, редкое генетическое нарушение. См. Montague et al., 1997, *Nature* 387: 903-908. Тяжелая лептиновая недостаточность может быть результатом неконтролируемого сахарного диабета с недостаточностью инсулина, который появляется в результате разрушения секретирующих инсулин Р-клеток. Существует теория о том, что недостаток инсулина приводит к синтезу и накоплению триглицеридов в жировой ткани, которая предотвращает увеличение массы тела, и в свою очередь значительно снижает уровни лептина в плазме крови, поскольку лептин синтезируется в жировой ткани. Данную и другие лептиновые недостаточности и заболевания и нарушения, которые проистекают из таких недостаточностей, можно лечить заместительной лептиновой терапией, такой как посредством ежедневных инъекций лептина или агониста лептина. Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут обеспечить более удобное и эффективное терапевтическое лечение таких заболеваний и нарушений.

Сахарный диабет и сердечно-сосудистое заболевание. Сахарный диабет признан сложным, хроническим заболеванием, при котором от 60 до 70% всех случаев смертности среди страдающих сахарным диабетом пациентов являются результатом сердечно-сосудистых осложнений. Сахарный диабет не только считают равным по риску ишемической болезни сердца, но также идентифицируют в качестве независимого прогнозирующего параметра для неблагоприятных событий, включая рецидивирующий инфаркт

миокарда, застойную сердечную недостаточность и смерть после сердечнососудистого эпизода. Внедрение более строгого контроля за уровнем глюкозы и интенсивной терапии в отношении сердечно-сосудистых факторов риска, как ожидают, снизили бы риск возникновения осложнений при ишемической болезни сердца и улучшили общую выживаемость среди страдающих сахарным диабетом пациентов. Все же страдающие сахарным диабетом пациенты, в два - три раза более вероятно будут страдать острым инфарктом миокарда, чем не страдающие сахарным диабетом пациенты, и страдающие сахарным диабетом пациенты живут на восемь - тринадцать лет меньше, чем не страдающие сахарным диабетом пациенты.

Понимая природу высокого риска для пациентов, страдающих сахарным диабетом/острым инфарктом миокарда, в руководстве по клинической практике Американской кардиологической коллегии/Американской ассоциации кардиологов ("ACC/АНА") по уходу за госпитализированными пациентами с нестабильной стенокардией или инфарктом миокарда "без увеличения ST" (коллективно обозначаемый как "ACS") недавно признали, что госпитализированные страдающие сахарным диабетом пациенты представляют собой определенную популяцию, требующую энергичной лечебной тактики в отношении гипергликемии. Конкретнее, в рекомендациях заявляют, что снижающая уровень глюкозы терапия для госпитализированных страдающих сахарным диабетом/ACS пациентов должна быть направлена на достижение значений для глюкозы перед приемом пищи менее чем 10 мг/дл, максимального суточного количества 180 мг/дл и для гемоглобина A1c после госпитализации менее чем 7%.

Для общенациональной выборочной совокупности пожилых пациентов с ACS было продемонстрировано, что увеличение 30-дневной смертности страдающих сахарным диабетом пациентов соответствовало пациентам, характеризующимся более высокими значениями уровня глюкозы при стационарном лечении. См. "Diabetic Coronary Artery Disease & Intervention," *Coronary Therapeutics* 2002, Oak Brook, IL, 20 September 2002. Имеется все больше указаний на то, что длительная гипергликемия, а не временное увеличение глюкозы при стационарном лечении, связано с серьезными побочными действиями. Хотя идеальный показатель для гипергликемии и сосудистого риска для пациента не известен, кажется, что средняя величина уровня глюкозы во время госпитализации является наиболее предсказательной в отношении смертности. В отдельном исследовании пациентов с ACS, взятых из более чем сорока больниц в Соединенных Штатах, было обнаружено, что постоянная гипергликемия, в противоположность случайным значениям глюкозы при стационарном лечении, была более прогнозирующей в отношении смертности в больнице. См. *Acute Coronary Syndrome Summit: A State of the Art Approach*, Kansas City, MO, 21 September 2002. По сравнению с величинами уровня глюкозы при приеме в стационар, регрессионная логистическая модель уровня глюкозы, контролируемого за весь период госпитального лечения, была самой прогнозирующей в отношении смертности. Имел место почти в два раза больший риск смертности во время стационарного лечения для каждого увеличения глюкозы на 10 мг/дл свыше 120 мг/дл. В меньшей группе следующих пациентов с сахарным диабетом/ACS, имело место постепенное увеличение смертности за один год с увеличением уровней глюкозы при стационарном лечении. В больницыной обстановке в рекомендациях ACC/АНА предлагается интенсивная инсулиновая терапия для того, чтобы достичь меньших уровней глюкозы в крови во время стационарного лечения.

Сообщалось, что лептин может характеризоваться непосредственным благоприятным действием при лечении сахарного диабета, особенно, сахарного диабета I типа и сахарного диабета II типа, при наличии или без ожирения, и, более конкретно, при состояниях с низким уровнем лептина в сыворотке. Сообщалось, что восстановление уровня лептина снижало или предотвращало развитие гиперинсулинемии, резистентности к инсулину и гипергликемии в различных моделях сахарного диабета 1 и 2 типа с сопутствующим ожирением или без него на животных. Например, высокие уровни лептина в плазме, достигаемые либо при фармакологическом введении лептина, либо при генотерапии с использованием аденовирусов, снижали гипергликемию и ассоциированное повышение уровня глюкозагона в плазме при STZ-индуцируемом сахарном диабете, несмотря на постоянно низкие уровни инсулина.

Заболевания, связанные с регуляцией липидов. Как известно в данной области, липодистрофия характеризуется ненормальными или дегенеративными состояниями жировой ткани организма. Дислипидемия представляет собой нарушение нормального липидного состава в крови. Полагают, что продолжительное повышение уровней инсулина может приводить к дислипидемии. Гиперлипидемия представляет собой наличие повышенных или аномальных уровней липидов и/или липопротеинов в крови. Гипоталамическая аменорея представляет собой состояние, при котором менструация останавливается на несколько месяцев вследствие проблемы, влияющей на гипоталамус. Было обнаружено, что заместительная терапия лептина у женщин с гипоталамической аменореей улучшает состояние осей репродуктивного, тиреоидного гормона и гормона роста и маркеров костеобразования, не вызывая неблагоприятных воздействий. См., например, Oral et al., *N. Engl. J. Med.* 2004, 351: 959-962, 987-997. Жировая дистрофия печени, например, заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD), относится к широкому спектру заболеваний печени в диапазоне от простой жировой инфильтрации печени (стеатоз) до неалкогольного стеатогепатита (NASH), до цирроза (необратимое, прогрессирующее рубцевание печени). Для всех стадий NAFLD характерно, в общем, накопление жиров (жировая инфильтрация) в клетках печени (гепатоцитах). Полагают, что лептин является одним из ключевых регуляторов воспаления и прогрессирова-

ния фиброза при различных хронических заболеваниях печени, включая NASH. См., например, Ikejima et al., *Hepatology Res.* 33:151-154.

Дополнительно, не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что относительная недостаточность инсулина при сахарном диабете 2 типа, токсичность глюкозы и увеличение содержания печёночной свободной жирной кислоты из-за увеличенной доставки из внутрибрюшной жировой ткани через воротную вену, вовлечены в качестве возможных причин в развитие нарушений при жировой дистрофии печени. Действительно, предполагалось, что пищевое поведение является ключевым фактором, доводящим до метаболического синдрома ожирения с его множеством последствий, включая NASH. Соответственно, лечение, целью которого является снижение потребления пищи и увеличение числа приема небольшого количества пищи, как уже продемонстрировали при сахарном диабете 2 типа, может эффективно лечить и предотвращать NASH. Лекарственные средства, которые стимулируют секрецию инсулина и снижение массы тела и замедляют освобождение желудка, также эффективны в улучшении толерантности к глюкозе и, таким образом, могут улучшить состояние жировой дистрофии печени сопутствующей ей гиперинсулинемии. Таким образом, применение химерного полипептида лептина может хорошо подойти в качестве способа лечения для данного состояния. Таким образом, химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут быть применимы при лечении нарушений с жировой дистрофией печени.

Болезнь Альцгеймера. Болезнь Альцгеймера (AD), как известно в данной области, связана с бляшками и сплетениями в головном мозге, которые включают в себя дисрегуляцию белка А-бета. Полагают, что липиды мозга сложным образом вовлечены в А-бета-связанные пути патогенеза и что важным модулятором липидного гомеостаза является лептин. Таким образом, лептин может модулировать двунаправленную активность А-бета, снижая его уровни внеклеточно. На самом деле, было продемонстрировано, что хроническое введение лептина AD-трансгенным животным снижали избыток А-бета в мозге, обуславливая его терапевтический потенциал. См. Fewlass et al., 2004, *FASEB J.*, 18:1870-1878. Дополнительно, сахарный диабет 2 типа и AD характеризуются общими эпидемиологическими и биохимическими особенностями в том, оба характеризуются нерастворимыми белковыми агрегатами с фибриллярной конфигурацией - амилин в панкреатических островках при DM 2 типа и Аβ при AD в мозге. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что схожие токсичные механизмы могут характеризовать DM 2 типа и AD. См. Lim et al., *FEBS Lett.*, 582:2188-2194.

Метаболический синдром X. Метаболический синдром X характеризуется резистентностью к инсулину, дислипидемией, гипертензией и висцеральным распространением жировой ткани и играет ключевую роль в патофизиологии сахарного диабета 2 типа. Также было обнаружено, что он сильно коррелирует с NASH, фиброзом и циррозом печени. Таким образом, химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут быть применимы в лечении метаболического синдрома X.

Болезнь Хантингтона. Болезнь Хантингтона представляет собой аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание. Особенности заболевания включают в себя двигательные нарушения, слабость, психиатрические проблемы и непреднамеренную уменьшение массы тела. Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, могут быть применимы при лечении болезни Хантингтона.

Таким образом, в одном из аспектов предлагается способ лечения заболевания или нарушения у субъекта. Субъект нуждается в лечении заболевания или расстройства. Заболевание или нарушение может представлять собой липодистрофию, дислипидемию, гиперлипидемию, избыточную массу тела, ожирение, гипоталамическую аменорею, болезнь Альцгеймера, лептиновую недостаточность, жировую дистрофию печени или сахарный диабет (включая тип I и тип II). Дополнительные заболевания и нарушения, которые можно лечить соединениями и способами, описываемыми в настоящем документе, включают в себя неалкогольный стеатогепатит (NASH), заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD), метаболический синдром X и болезнь Хантингтона. Способ лечения включает в себя введение субъекту химерного полипептида, как описано в настоящем документе в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения.

V. Анализы.

Способы получения и анализа химерных полипептидов, описываемых в настоящем документе, как правило, доступны специалистам в данной области. Дополнительно, специальные способы описываются в настоящем документе, а также в патентных публикациях и других ссылках, цитируемых в настоящем документе, которые включены в качестве ссылки с такой дополнительной целью.

Потребление пищи. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что потребление пищи применимо для оценки пригодности соединения, как описано в настоящем документе. Например, известно, что множество метаболических патологий связаны с потреблением пищи (например, сахарный диабет, ожирение). Таким образом, можно провести первоначальный скрининг, чтобы определить степень, в которой модулируется потребление пищи при введении соединений, описываемых в настоящем документе, и положительный первоначальный скрининг может быть применим в последующей разработке соединения.

Анализы *in vitro*. Не желая быть связанными какой-либо теорией или механизмом действия, полагают, что существует корреляция между результатами анализов *in vitro* (например, рецепторный), и при-

годностью средств для лечения метаболических заболеваний и нарушений. Таким образом, анализы *in vitro* (например, клеточные анализы) применимы в качестве стратегии скрининга для возможных метаболических средств, таких как описано в настоящем документе. Множество анализов *in vitro* известны в данной области, включая анализы, описанные, как представлено ниже.

Анализ связывания лептина. Связывание лептина можно определить по эффективности тестируемого соединения при перемещении ^{125}I -рекомбинантного-лептина (мышинного) из поверхностной мембраны, экспрессирующей химерный лептиновый (Hu)-ЕРО (Mu) рецептор, присутствующий в клеточной линии 32D OBECA (J. Biol Chem 1998; 273(29):18365-18373). Очищенные клеточные мембраны можно приготовить гомогенизацией из собранных культур сливающихся клеток из клеток 32D OBECA. Мембраны можно инкубировать с ^{125}I -рек-мышинным-лептином и с увеличивающимися концентрациями тестируемого соединения в течение 3 ч при температуре окружающей среды в 96-луночном полистироловом планшете. Связавшиеся и несвязавшиеся фракции лиганда можно затем разделить быстрой фильтрацией на 96-луночных планшетах GF/B, предварительно заблокированные 0,5% PEI (полиэтиленимином) в течение по меньшей мере 60'. Планшеты со стекловолоконным фильтром можно затем высушить, добавить сцинтилляционную жидкость и определить СРМ при считывании на многолуночном сцинтилляционном счётчике, способном считывать радиомеченный йод.

Функциональный анализ лептина. Увеличенные уровни фосфорилированного STAT5 (переносчик сигнала и активатор транскрипции 5) можно измерить после обработки клеток 32D-Keptin, эктопически экспрессирующих химерный рецептор Hu-лептин/Mu-ЕРО, тестируемым соединением. Клетки 32D-Keptin (идентичные клеткам 32D-OBECA, но поддерживаемые в культуре с лептином) можно лишить лептина в течение ночи и затем обработать тестируемыми соединениями в 96-луночных планшетах в течение 30 минут при 37°C, после чего следует экстракция клеток. Уровни pSTAT5 в клеточном лизате можно определить, используя набор для анализа Perkin Elmer AlphaScreen® SureFire® pSTAT5 в 384-луночном формате (Proxiplate™ 384 Plus). Эффективность тестируемых соединений можно определить в отношении максимального сигнала в клеточных лизатах из клеток, обработанных лептином человека.

VI. Фармацевтические композиции.

В одном из аспектов предлагаются фармацевтические композиции, содержащие соединения, описываемые в настоящем документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым наполнителем (например, носителем). Термин "фармацевтически приемлемый носитель", как применяют в настоящем документе, относится к фармацевтическим наполнителям, например, фармацевтически, физиологически приемлемым органическим или неорганическим веществам-носителям, подходящим для энтерального или парентерального применения, которые не вступают неблагоприятным образом в реакцию с активным средством. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают в себя воду, растворы солей (например, раствор Рингера и т.п.), спирты, масла, желатины и углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметицеллюлозу и поливинилпирролидин. Такие препараты можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными средствами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, увлажнители, эмульгирующие вещества, соли для регуляции осмотического давления, буферы, красящие и/или ароматические вещества и т.п., которые не вступают неблагоприятным образом в реакцию с соединениями по изобретению.

Н. Способы.

Химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, можно вводить отдельно или можно совместно вводить субъекту. Совместное введение, как подразумевают, включает в себя одновременное или последовательное введение соединений, отдельно или в сочетании (более чем одно соединение). Например, было обнаружено, что ожирение можно благоприятным образом лечить при комбинированном лечении, включающем в себя лептин (например, метрелептин) и определенные другие соединения против ожирения. См., например, опубликованную заявку США № 2008/0207512. Таким образом, химерный полипептид, описываемые в настоящем документе, может быть применим для лечения ожирения.

В некоторых вариантах осуществления препараты и способы, описываемые в настоящем документе, дополнительно обеспечивают, что химерный полипептид вводится совместно с одним или несколькими противодиабетическими средствами, такими как гипогликемические средства, например инсулин, амилины, прамлинтид, метформин.

В некоторых вариантах осуществления препараты и способы, описываемые в настоящем документе, дополнительно обеспечивают, что химерный полипептид вводится совместно с одним или несколькими средствами, снижающими холестерин и/или триглицериды. Иллюстративные средства включают в себя ингибиторы HMG-CoA-редуктазы (например, аторвастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин, розувастатин, симвастатин); секвестранты желчных кислот (например, колесевелам, холестирамин, колестипол); фибраты (например, фенофибрат, клофибрат, гемфиброзил); эзетимиб, никотиновую кислоту, пробукол, комбинацию ловастатин/ниацин; комбинацию аторвастатин/амлодипин; и комбинацию симвастатин/эзетимиб.

Альтернативно, отдельные химерные полипептиды можно вводить совместно с другими средства-

ми против ожирения, такими как эксенатид или лираглутид.

В настоящем описании предлагается композиция для применения в качестве лекарственного препарата, т.е. для применения в терапии, поскольку соединение лептина является терапевтически активным соединением. Композиции, содержащие химерный полипептид, или в жидком, или в сухом виде, и необязательно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель также специально рассматриваются и приводятся в качестве примеров в настоящем документе.

Совместное введение можно осуществить при отдельном введении химерного полипептида со вторым средством или при введении одного фармацевтического препарата, содержащего химерный полипептид и второе средство. Подходящие режимы дозирования для вторых средств, как правило, известны в данной области.

Препараты можно также совместно вводить, при необходимости, с другими активными веществами (например, для снижения метаболического разрушения), как известно в данной области, или с другими терапевтически активными средствами.

Амилины. Амилин представляет собой пептидный гормон, синтезируемый β -клетками поджелудочной железы, который совместно секретируется с инсулином в ответ на поглощение питательных веществ. Последовательность амилина высоко консервативна среди видов млекопитающих с структурным сходством к генетически родственному кальцитонину пептиду (CGRP), кальцитонинам, к интермедиам и аденомедуллину, как известно в данной области. Глюкорегулирующие действия амилина дополняют действия инсулина при регуляции скорости появления глюкозы в кровотоке посредством подавления стимулируемой питательными веществами секреции глюкагона и замедления освобождения желудка. У страдающих сахарным диабетом пациентов, получающих лечение инсулином, прамлинтид, синтетический и равнозначный по эффективности аналог амилина человека, снижает изменения глюкозы после приема пищи, подавляя несоответствующим образом увеличивающуюся после приема пищи секрецию глюкагона и замедляя освобождение желудка. Последовательности амилина крысы, амилина человека и прамлинтида приведены ниже:

амилин крысы: KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (SEQ ID NO:86);

амилин человека: KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY (SEQ ID NO:87);

прамлинтид: KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPELPPTNVGSNTY (SEQ ID NO:88).

Давалинтид. Давалинтид, также известный как "AC-2307" представляет собой мощный агонист амилина, применимый в лечении множества симптомов заболевания. См. WO 2006/083254 и WO 2007/114838, каждая из которых в полном объеме и во всех отношениях включена в настоящий документ в качестве ссылки. Давалинтид представляет собой химерный пептид, содержащий участок N-концевой петли амилина или кальцитонина и их аналогов, альфа-спиральный участок, по меньшей мере, части альфа-спирального участка кальцитонина или его аналогов, или альфа-спиральный участок, содержащий часть альфа-спирального участка амилина и альфа-спирального участка кальцитонина или его аналога, и участок C-концевого хвоста амилина или кальцитонина. Последовательности кальцитонина человека, кальцитонина лосося и давалинтида приведены ниже:

кальцитонин человека: CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP (SEQ ID NO:89);

кальцитонин лосося: CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP (SEQ ID NO:90);

давалинтид: KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSGNTY (SEQ ID NO:91).

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что для амилинов и давалинтида, и их фрагментов и аналогов, может потребоваться C-концевое амидирование, чтобы вызвать полный биологический ответ. Понятно, что соединения амилина, такие как соединения, описываемые в настоящем документе, которые включают в себя амилины и/или давалинтид и их фрагмент и аналоги, могут быть амидированы на C-конце.

"Соединения агонистов амилина" включают в себя природные пептиды амилина, пептиды аналогов амилина и другие соединения (например, низкомолекулярные соединения), которые характеризуются активностью агониста амилина. "Соединения агонистов амилина" можно получить из природных источников, можно синтезировать или можно получить способами рекомбинантной ДНК. Соединения агонистов амилина характеризуются активностью связывания с рецептором агониста амилина и могут включать в себя аминокислоты (например, природные, неприродные или их сочетание), пептидомиметики, химические группы и т.п. Специалисты в данной области распознают соединения агонистов амилина, используя анализ связывания амилинового рецептора или измеряя активность агониста амилина в анализах на камбаловидной мышце. В одном из вариантов осуществления соединения агонистов амилина будут характеризоваться IC_{50} приблизительно 200 нМ или меньше, приблизительно, 100 нМ или меньше, или приблизительно 50 нМ или меньше в анализе связывания рецептора амилина, таком как анализ, описываемый в настоящем документе, в патенте США № 5686411 и в публикации США № 2008/0176804, описания которых полностью и во всех отношениях включены в настоящий документ в качестве ссылки. В одном из вариантов осуществления соединения агонистов амилина будут характеризоваться EC_{50} приблизительно 20 нМ или меньше, приблизительно 15 нМ или меньше, приблизительно 10 нМ или меньше, или приблизительно 5 нМ или меньше в анализе с применением камбаловидной мышцы, таком как анализ, описываемый в настоящем документе и в патенте США № 5686411. В одном из вариантов осуществ-

влияния соединения агониста амилина характеризуется по меньшей мере 90 или 100% идентичностью последовательности к ^{25,28,29}Pro-амилину человека. В одном из вариантов осуществления соединения агониста амилина является пептидной химерой амилина (например, амилина человека, амилина крысы и т.п.) и кальцитонина (например, кальцитонина человека, кальцитонина лосося и т.п.). Подходящие и иллюстративные соединения агонистов амилина описаны также в публикации США № 2008/0274952, описание которого в полном объеме и во всех отношениях включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Под "аналогом амилина", как применяют в настоящем документе, подразумевают агонист амилина, который характеризуется по меньшей мере 50% идентичностью последовательности, предпочтительно по меньшей мере 70% идентичностью последовательности к встречающейся в природе форме амилина, либо крысы, либо человека, либо из любых других видов, и который получают из них при модификации, включающей в себя вставки, замены, продления и/или делеции аминокислотной последовательности сравнения.

Последовательность аналога амилина может характеризоваться по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 или 95% идентичностью аминокислотных последовательностей с амилином сравнения. В одном из аспектов аналог содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или даже 16 замен аминокислот, вставок, продлений и/или делеций относительно соединения сравнения. В одном из вариантов осуществления аналог амилина может содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены (включающие в себя неприродные аминокислоты и L- и D-формы). Данные аналоги предпочтительно представляют собой пептиды, производные пептидов или имитаторы пептидов. Типичные аналоги амилина будут представлять собой пептиды, особенно, из 32-37 аминокислот, например, от 27 до 45, особенно от 28 до 38 и даже 31-36 аминокислот.

Аналоги амилина с идентичностью к амилину крысы и человека включают в себя ^{25,28,29}Pro-h-амилин (прамлинтид) (SEQ ID NO:88); дез-¹Lys-h-амилин (SEQ ID NO:111); ²⁵Pro,²⁶Val,^{28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:112); ¹⁸Arg,^{25,28}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:113); дез-¹Lys,¹⁸Arg,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:114); ¹⁸Arg,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:115); дез-¹Lys,¹⁸Arg,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:116); дез-¹Lys,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:117); ²⁵Pro,²⁶Val,^{28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:118); ²⁸Pro-h-амилин, 2,7-цикло-[²Asp,⁷Lys]-h-амилин (SEQ ID NO:119); ^{2,37}h-амилин (SEQ ID NO:120); ¹Ala-h-амилин (SEQ ID NO:121); ²Ala-h-амилин (SEQ ID NO:122); ^{2,7}Ala-h-амилин (SEQ ID NO:123); ¹Ser-h-амилин (SEQ ID NO:124); ²⁹Pro-h-амилин (SEQ ID NO:125); ^{25,28}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:126); дез-¹Lys,^{25,28}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:127); ²³Leu,²⁵Pro,²⁶Val,^{28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:128); ²³Leu,²⁵Pro,²⁶Val,²⁸Pro-h-амилин (SEQ ID NO:129); дез-¹Lys,²³Leu,²⁵Pro,²⁶Val,²⁸Pro-h-амилин (SEQ ID NO:130); ¹⁸Arg,²³Leu,²⁵Pro,²⁶Val,²⁸Pro-h-амилин (SEQ ID NO:131); ¹⁸Arg,²³Leu,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:132); ¹⁸Arg,²³Leu,^{25,28}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:133); ¹⁷Ile,²³Leu,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:134); ¹⁷Ile,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:135); дез-¹Lys,¹⁷Ile,²³Leu,^{25,28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:136); ¹⁷Ile,¹⁸Arg,²³Leu-h-амилин (SEQ ID NO:137); ¹⁷Ile,¹⁸Arg,²³Leu,²⁶Val,²⁹Pro-h-амилин (SEQ ID NO:138); ¹⁷Ile,¹⁸Arg,²³Leu,²⁵Pro,²⁶Val,^{28,29}Pro-h-амилин (SEQ ID NO:139); ¹³Thr,²¹His,²³Leu,²Ala,²⁸Leu,²⁹Pro,³¹Asp-h-амилин (SEQ ID NO:140); ¹³Thr,²¹His,²³Leu,²⁶Ala,²⁹Pro,³¹Asp-h-амилин (SEQ ID NO:141); дез-¹Lys,¹³Thr,²¹His,²³Leu,²⁶Ala,²⁸Pro,³¹Asp-h-амилин (SEQ ID NO:142); ¹³Thr,¹⁸Arg,²¹His,²³Leu,²⁶Ala,²⁹Pro,³¹Asp-h-амилин (SEQ ID NO:143); ¹³Thr,¹⁸Arg,²¹His,²³Leu,^{28,29}Pro,³¹Asp-h-амилин (SEQ ID NO:144); и ¹³Thr,¹⁸Arg,²¹His,²³Leu,²⁵Pro,²⁶Ala,^{28,29}Pro,³¹Asp-h-амилин (SEQ ID NO:145).

Аналоги амилина включают в себя аминокислотные последовательности из остатков 1-37 формулы (I), следующей ниже, где вплоть до 25% аминокислот, указанных в формуле (I), могут быть удалены или замещены другой аминокислотой:

X'-Xaa¹-Cys²-Asn³-Thr⁴-Ala⁵-Thr⁶-Cys⁷-Ala⁸-Thr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-Asn¹⁴-Phe¹⁵-Leu¹⁶-Val¹⁷-His¹⁸-Ser¹⁹-Ser²⁰-Xaa²¹-Asn²²-Phe²³-Xaa²⁴-Xaa²⁵-Xaa²⁶-Xaa²⁷-Xaa²⁸-Xaa²⁹-Thr³⁰-Xaa³¹-Val³²-Gly³³-Ser³⁴-Asn³⁵-Thr³⁶-Tyr³⁷-X (SEQ ID NO:92) (I).

В формуле (I) X' представляет собой водород, N-концевую экзпирующую группу или линкер к группе увеличения продолжительности действия. Xaa¹ представляет собой Lys или связь, Xaa²¹ представляет собой Lys, Cys или Asn, Xaa²⁴ представляет собой Lys, Cys или Gly, Xaa²⁵ представляет собой Lys, Cys или Pro, Xaa²⁶ представляет собой Lys, Cys или Ile, Xaa²⁹ представляет собой Lys, Cys или Leu, Xaa³¹ представляет собой Lys, Cys, или Pro, Xaa³¹ представляет собой Lys, Cys или Pro и Xaa³¹ представляет собой Lys, Cys или Asn. Далее говоря о формуле (I), переменная X представляет собой C-концевую функциональную группу (например, C-концевую экзпирующую группу). X представляет собой замещенную или незамещенную амино-, замещенную или незамещенную алкиламино-, замещенную или незамещенную диалкиламино-, замещенную или незамещенную циклоалкиламино-, замещенную или незамещенную ариламино-, замещенную или незамещенную аралкиламино-, замещенную или незамещенную алкилокси-, замещенную или незамещенную арилокси-, замещенную или незамещенную аралкилокси-группу или гидроксил. Если C-конец полипептидного компонента с последовательностью из остатков 1-37 формулы (I) экзпирирован функциональной группой X, то X предпочтительно представляет собой амин, тем самым образуя C-концевой амид. В некоторых вариантах осуществления вплоть до 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или даже 50% аминокислот из остатков 1-37 формулы (I) удалены или заменены в полипеп-

тидном компоненте согласно формуле (I). В некоторых вариантах осуществления компонент аналога амилина содержит 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или даже 16 замен аминокислот относительно аминокислотной последовательности, указанной в формуле (I). В некоторых вариантах осуществления аналог амилина содержит последовательность, которая характеризуется определенной идентичностью последовательности в отношении остатков 1-37 из аминокислотной последовательности согласно формуле (I). В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности между аналогом амилина, описываемым в настоящем документе, и остатками 1-37 формулы (I) составляет 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или даже больше. В некоторых вариантах осуществления вплоть до 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5% или даже меньше аминокислот, указанных в остатках 1-37 формулы (I) могут быть удалены или заменены на другую аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности находится в диапазоне 75-100%. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности находится в диапазоне 75-90%. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности находится в диапазоне 80-90%. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности составляет по меньшей мере 75%. В некоторых вариантах осуществления аналог амилина содержит последовательность остатков 1-37 формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления аналогии амилина, включающие в себя аналогии формулы (I), образуют основу полипептидного компонента, к которому присоединена одна или несколько групп, увеличивающих продолжительность действия, чтобы получить конъюгат полипептида амилина. Таким образом, полипептидный компонент служит в качестве шаблона ("полипептидного шаблона"), к которому присоединяют, предпочтительно ковалентным связыванием, одну или несколько групп, увеличивающих продолжительность действия. Связывание увеличивающей продолжительность действия группы с полипептидным компонентом может происходить через линкер, как описано в настоящем документе. Альтернативно, связывание увеличивающей продолжительность действия группы с полипептидным компонентом может происходить посредством прямой ковалентной связи. Группа, увеличивающая продолжительность действия может представлять собой водорастворимый полимер, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления множество групп, увеличивающих продолжительность действия, присоединяют к полипептидному компоненту, при этом каждый линкер к каждой группе, увеличивающей продолжительность действия независимо выбран из линкеров, описываемых в настоящем документе.

Аналоги амилина, применимые в качестве полипептидных компонентов, описываемых в настоящем документе, включают в себя в качестве неограничивающих примеров, соединения, указанные в остатках 1-37 формулы (I), приведенные ниже в табл. 1. Если не указано иначе, все пептиды, описываемые в настоящем документе, включая пептиды, содержащие явным образом предлагаемую последовательность, рассматриваются в свободных и карбоксилированной и амидированной форме.

Таблица 1

Полипептиды компонентов, применимых в соединениях, описываемых в настоящем документе

Соединение	Описание (последовательность)
	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO: 110)
	CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:93) ([дезLys ¹]-Соединение 1)
	KCNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:94)
	CNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:95) ([дезLys ¹]-Соединение 3)
	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:96)
	CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPKLPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:97)

	([дезLys ¹]-Соединение 5)
	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:98)
	CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTKVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:99)
	([дезLys ¹]-Соединение 7)
	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:100)
0	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:101)
	([дезLys ¹]-Соединение 9)
1	CNTATCATQRLANFLVHSSKNFGPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:102)
2	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPKLPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:103)
3	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTKVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:104)
4	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFKPILPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:105)
5	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGKILPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:106)
6	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPIKPPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:107)
7	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILKPTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:108)
8	CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPKTNVGSNTY-NH ₂ (SEQ ID NO:109)

Термины "линкер" и т.п. в контексте присоединения групп, увеличивающих продолжительность действия, к полипептидному компоненту в конъюгате амилинового полипептида, описываемом в настоящем документе, означает двухвалентную группу (-L-), ковалентно связанный в свою очередь с полипептидным компонентом, характеризующимся валентностью, доступной для образования связи, и с группой, увеличивающей продолжительность действия, характеризующейся валентностью, доступной для образования связи. Доступный сайт для образования связи в полипептидном компоненте в целях удобства представляет собой боковую цепь остатка (например, лизин, цистеин, аспарагиновая кислота и их гомологи). В некоторых вариантах осуществления доступный сайт для образования связи в полипептидном компоненте представляет собой боковую цепь остатка лизина или цистеина. В некоторых вариантах осуществления доступный сайт для образования связи в полипептидном компоненте представляет собой N-концевой амин. В некоторых вариантах осуществления доступный сайт для образования связи в полипептидном компоненте представляет собой C-концевой карбоксил. В некоторых вариантах осуществления доступный сайт для образования связи в полипептидном компоненте представляет собой атом его основной цепи. Как применяют в настоящем документе, термин "связывающий аминокислотный остаток" обозначает аминокислоту среди остатков 1-37 формулы (I), к которой присоединена группа, увеличивающая продолжительность действия.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются соединения, содержащие линкер, ковалентно связывающий полипептидный компонент с группой, увеличивающей продолжительность действия. Линкер является необязательным, т.е. любой линкер может представлять собой просто связь. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен к боковой цепи полипептидного компонента. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен к атому основной цепи полипептидного компонента.

В другом аспекте предлагается конъюгат полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и аминокислотный остаток в положении от 2 до 37 был заменен на остаток лизина или остаток цистеина, и где указанный остаток лизина или остаток цистеина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер, где нумерация аминокислоты соответствует номеру аминокислоты в SEQ ID NO:88.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в любом положении 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 31, 32, 33, 34, 35, 36 или 37 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в любом положении 21, 24-29 или 31 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 21 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 24 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 25 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 26 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 27 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 28 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 29 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В другом аспекте изобретение относится к конъюгату полипептида амилина, который представляет собой производное прамлинтида с последовательностью SEQ ID NO:88 или его аналог, где аминокислотный остаток в положении 1 отсутствует (т.е. дез-Lys¹) и где аминокислотный остаток в положении 31 заменен на остаток лизина, и где указанный остаток лизина связан с полиэтиленгликолевым полимером, необязательно через линкер.

В некоторых вариантах осуществления группа, увеличивающая продолжительность действия представляет собой водорастворимый полимер. "Водорастворимый полимер" обозначает полимер, который в достаточной степени растворим в воде при физиологических условиях, например, температуре, ионной концентрации и тому подобном, как известно в данной области, чтобы быть применимым в способах, описываемых в настоящем документе. Водорастворимый полимер может увеличить растворимость пептида или другой биомолекулы, к которой такой присоединен такой водорастворимый полимер. Действительно, такое присоединение было предложено как средство для того, чтобы улучшить период циркуляции в крови, растворимость в воде и/или антигенность вводимых белков *in vivo*. См., например, патент США № 4179337; опубликованную заявку США № 2008/0032408. Множество различных водорастворимых полимеров и химий присоединения использовались для данной цели, такие как полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый

спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и т.п.

В некоторых вариантах осуществления присоединяемая группа, увеличивающая продолжительность действия включает в себя полиэтиленгликоль. Полиэтиленгликоль ("ПЭГ") использовали в попытке получить терапевтически применимые полипептиды. См., например, Zalipsky, S., 1995, *Bioconjugate Chemistry*, 6:150-165; Mehvar, R., 2000, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 3:125-136. Как признается специалистом в данной области, основная цепь ПЭГ $[(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n]$, n - количество повторяющихся мономеров] является гибкой и амфифильной. Не желая быть связанными какой-либо теорией или механизмом действия, длинная, подобная цепи молекула или группа ПЭГ, как полагают, в большой степени гидратируется и находится в быстром движении, когда присутствует в водной среде. Такое быстрое движение, как полагают, заставляет ПЭГ проносить большой объем и предотвращает приближение и вмешательство других молекул. В результате, при присоединении к другому химическому соединению (такому как пептид), цепи полимера ПЭГ могут защитить такое химическое соединение от иммунного ответа и других механизмов выведения. В результате, ПЭГилирование может приводить к улучшенной эффективности лекарственного средства и безопасности, оптимизируя фармакокинетику, увеличивая биодоступность и снижая иммуногенность и частоту дозирования. "ПЭГилирование" обозначает в обычном смысле конъюгацию группы ПЭГ с другим соединением. Например, присоединение ПЭГ, как было показано, защищает от протеолиза. См., например, Blomhoff, H.K. et al., 1983, *Biochim Biophys Acta*, 757:202-208. Если явным образом не указано иначе, термины "ПЭГ", "полиэтиленгликолевый полимер" и т.п. относятся к полимеру полиэтиленгликоля и его производным, включающим в себя метокси-ПЭГ (мПЭГ).

Известно множество способов для присоединения групп полимеров, таких как ПЭГ и родственные полимеров, к реакционноспособным группам, обнаруженным в белке. См., например, патент США № 4179337; патент США № 4002531; Abuchowski et al., 1981, in "Enzymes as Drugs," J.S. Holcberg and J. Roberts, (Eds.), p. 367-383; Zalipsky, S., 1995, *Bioconjugate Chemistry*, 6:150-165. Обсуждается применение ПЭГ и других полимеров для модификации белков. См., например, Cheng, T.-L. et al., 1999m, *Bioconjugate Chem.*, 10:520-528; Belcheva, N. et al., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10:932-937; Bettinger, T. et al., 1998, *Bioconjugate Chem.*, 9:842-846; Huang, S.-Y. et al., 1998, *Bioconjugate Chem.*, 9:612-617; Xu, B. et al. 1998, *Langmuir*, 13:2447-2456; Schwarz, J.B. et al., 1999, *J. Amer. Chem. Soc.*, 121:2662-2673; Reuter, J.D. et al., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10:271-278; Chan, T.-H. et al., 1997, *J. Org. Chem.*, 62:3500-3504. Типичные сайты присоединения в белках включают в себя первичную аминогруппу, такую как аминогруппы остатков лизина или на N-конце, тиоловые группы, такие как группы боковой цепи цистеина, и карбоксильные группы, такие как карбоксильные группы остатков глутамата или аспартата или на C-конце. Общеизвестными сайтами для присоединения являются остатки сахаров гликопротеинов, цистеины или N-конец и лизины целевого полипептида. Термины "ПЭГилированный" и т.п. относятся к ковалентному присоединению полиэтиленгликоля к полипептиду или другой биомолекуле, необязательно через линкер, как описано в настоящем документе и/или как известно в данной области.

В некоторых вариантах осуществления группа ПЭГ в конъюгате полипептида амилина, описываемом в настоящем документе, имеет номинальную молекулярную массу в пределах определенного диапазона. Как обычно в данной области, размер группы ПЭГ указывают ссылкой на номинальную молекулярную массу, обычно приводимую в кДа. Молекулярная масса рассчитывается множеством способов, известных в данной области, включая количество, массу, вязкость и среднее значение молекулярной массы "Z". Известно, что полимеры, такие как ПЭГ и т.п., существует в виде распределения масс молекул около номинального среднего значения.

Иллюстративный из терминологии молекулярных масс для ПЭГ термин "мПЭГ40 кДа" относится к полимеру метоксиполиэтиленгликоля, имеющего номинальную молекулярную массу 40 кДа. Обозначения ПЭГ других молекулярных масс следуют данному правилу. В некоторых вариантах осуществления группа ПЭГ характеризуется номинальной молекулярной массой в диапазоне 10-100, 20-80, 20-60 или 20-40 кДа. В некоторых вариантах осуществления группа ПЭГ характеризуется номинальной молекулярной массой 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или даже 100 кДа. Предпочтительно группа ПЭГ характеризуется молекулярной массой 20, 25, 30, 40, 60 или 80 кДа.

Молекулы ПЭГ, применимые для получения производных полипептидов типично классифицируют на классы линейных, разветвленных и Warwick (т.е. полиПЭГ®) ПЭГ, как известно в данной области. Если явным образом не указано иначе, группы ПЭГ, описываемые в настоящем документе, представляют собой линейные ПЭГ. Кроме того, термины "разветвленный на две части", "Y-образный" и т.п. относятся к разветвленным группам ПЭГ, как известно в данной области. Термин "Warwick" в контексте ПЭГ, также известный как "гребенчатый" или "гребенчатого типа" ПЭГ, относится к ряду разветвленных на множество частей ПЭГ, присоединенных к основе, типично поли(метакрилату), как известно в данной области. Относительно номенклатуры, включающей в себя правила, применяемые в представленной ниже таблице в настоящем документе, при отсутствии указания на иное, группа ПЭГ присоединена к основной цепи пептида. Например, соединение 19 является результатом конъюгации мПЭГ40кДа к N-концевому азоту соединение 1. Схожим образом, соединение 20 является результатом конъюгации мПЭГ40кДа к N-концевому азоту соединение 2. Можно использовать стандартные однобуквенные сокращения для ами-

нокислот, как могут быть и стандартные трехбуквенные сокращения. Например, соединение 24 является аналогом соединения 10, где остаток в положении 26 из соединения 9 заменен на лизин, и функциональная группа амин боковой цепи лизина 26 (т.е. K²⁶) конъюгирует с группой ПЭГ40кДа. Иллюстративные соединения приведены ниже в табл. 2.

Таблица 2

ПЭГилированные соединения

Соединение	Описание
19	мПЭГ40 кДа-Соединение 1 (SEQ ID NO: 146)
20	мПЭГ40 кДа-Соединение 2 (SEQ ID NO: 147)
21	[K ²¹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 3 (SEQ ID NO: 148)
22	[K ²¹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 4 (SEQ ID NO: 149)
23	[K ²⁸ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 5 (SEQ ID NO: 150)
24	[K ²⁶ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 6 (SEQ ID NO: 151)
25	[K ³¹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 7 (SEQ ID NO: 152)
26	[K ³¹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 8 (SEQ ID NO: 153)
27	[K ²⁶ (Y-shaped-мПЭГ40 кДа)]-Соединение 5 (SEQ ID NO: 154)
28	[K ²¹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 11 (SEQ ID NO: 155)
29	[K ²⁶ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 12 (SEQ ID NO: 156)
30	[K ³¹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 13 (SEQ ID NO: 157)
31	[K ²⁶ (Y-shaped-мПЭГ40 кДа)]-Соединение 12 (SEQ ID NO: 158)
32	[K ²⁴ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 14 (SEQ ID NO: 159)
33	[K ²⁵ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 15 (SEQ ID NO: 160)
34	[K ²⁷ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 16 (SEQ ID NO: 161)
35	[K ²⁸ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 17 (SEQ ID NO: 162)
36	[K ²⁹ (мПЭГ40 кДа)]-Соединение 18 (SEQ ID NO: 163)

I. Препараты.

Фармацевтические соединения по изобретению можно приготовить с фармацевтически приемлемыми носителями или растворителями, а также любыми другими известными вспомогательными веществами и наполнителями согласно общепринятым способам, таким как способы, описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin. См. также Wang et al. (1988), J. of Parenteral Sci. и Tech., Technical Report No. 10, Sup. 42:2 S.

В основном, химерные полипептиды можно приготовить в стабильную безопасную фармацевтическую композицию для введения. Фармацевтические препараты, рассматриваемые для применения в способах по изобретению, могут включать в себя приблизительно от 0,01 до 1,0% (мас./об.), в определенных случаях от 0,05 до 1,0% химерного полипептида, приблизительно от 0,02 до 0,5% (мас./об.) ацетатного, фосфатного, цитратного или глутаматного буфера, позволяющего доводить pH готовой композиции до величины приблизительно от 3,0 до приблизительно 7,0; приблизительно от 1,0 до 10% (мас./об.) вспомогательного вещества из углевода или многоатомного спирта и, необязательно, приблизительно от 0,005 до 1,0% (мас./об.) консерванта, выбранного из группы m-крезола, бензилового спирта, метил-, этил-, пропил- и бутилпарабенов и фенола. Такой консервант, как правило, включают, если приготовленный пептид необходимо включить в продукт для многократного применения.

В конкретных вариантах осуществления фармацевтический препарат настоящих химерных полипептидов может содержать диапазон концентраций соединения(ий), например, приблизительно от 0,01 до приблизительно 98% (мас./мас.), или приблизительно от 1 до приблизительно 98% (мас./мас.), или предпочтительно, от 80 до 90% (мас./мас.), или предпочтительно приблизительно от 0,01% до приблизительно 50% (мас./мас.), или более предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 25% (мас./мас.) в данных вариантах осуществления. Достаточное количество воды для инъекций можно использовать, чтобы получить необходимую концентрацию раствора.

Дополнительные вспомогательные вещества, такие как хлорид натрия, а также другие известные наполнители, могут также присутствовать, при желании. В некоторых случаях, такие наполнители применимы для поддержания общей тоничности соединения. Наполнители можно включать в состав описываемых

ваемых в настоящем документе препаратов в различных концентрациях. Например, наполнитель можно включать в диапазоне концентрации приблизительно от 0,02 до приблизительно 20% (мас./мас.), предпочтительно, приблизительно от 0,02 и 0,5% (мас./мас.), приблизительно от 0,02 до приблизительно 10% мас./об., или приблизительно от 1 до приблизительно 20% (мас./мас.). Кроме того, похожие на сами настоящие препараты, наполнители можно включать в твердом (включая порошковый), жидком, полутвердом или гелевом виде.

Фармацевтические препараты можно составить в различных формах, например твердой, жидкой, полутвердой или жидкой. Термин "твердый", как применяют в настоящем документе, предназначен для того, чтобы охватывать все нормальные применения данного термина, включая, например, порошки и лиофилизированные препараты. Описываемые в настоящем документе препараты могут быть лиофилизированными.

Термины буфер, буферный раствор и забуференный раствор, когда применяются в отношении концентрации иона водорода или величины pH, относятся к способности системы, особенно, водного раствора, проявлять устойчивость к изменению величины pH при добавлении кислоты или щелочи, или при растворении с растворителем. Особенностью забуференных растворов, которые подвергаются небольшим изменениям величины pH при добавлении кислоты или основы, является присутствие или слабой кислоты и соли слабой кислоты, или слабого основания и соли слабого основания. Примером последней системы является уксусная кислота и ацетат натрия. Изменение величины pH фактора является небольшим, пока количество добавленного иона гидрония, или гидроксильного иона, не превышает способность буферной системы его нейтрализовать.

Как описано в настоящем документе, множество жидких носителей пригодно для использования в препаратах химерных полипептидов, например, вода или смесь водного/органического растворителя или суспензии.

Стабильность препарата химерный полипептид для применения, как описано в настоящем документе, увеличивают, поддерживая величину pH препарата в диапазоне, определяемом известными в данной области способами. В определенных вариантах осуществления величину pH препарата поддерживают в диапазоне приблизительно от 3,5 до 5,0, или приблизительно от 3,5 до 6,5, в некоторых вариантах осуществления приблизительно от 3,7 до 4,3, или приблизительно от 3,8 до 4,2. В некоторых вариантах осуществления величина pH может составлять приблизительно 4,0, приблизительно 5,0, приблизительно 6,0, приблизительно 7,0, приблизительно 8,0, приблизительно 9,0 или даже выше. В некоторых вариантах осуществления pH может находиться в физиологическом диапазоне, pH 6-8, предпочтительно pH 7-7,6.

В определенных вариантах осуществления буфер с химерным полипептидом представляет собой ацетатный буфер (предпочтительно при конечной концентрации препарата приблизительно от 1-5 до приблизительно 60 мМ), фосфатный буфер (предпочтительно при конечной концентрации препарата приблизительно от 1-5 до приблизительно 30 мМ) или глутаматный буфер (предпочтительно при конечной концентрации препарата приблизительно от 1-5 до приблизительно 60 мМ). В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетат (предпочтительно при конечной концентрации препарата приблизительно от 5 до приблизительно 30 мМ).

Стабилизатор можно включать в состав препаратов, но он не является обязательно необходимым. Если включен, тем не менее, стабилизатор, применимый в практике по настоящему изобретению, представляет собой углевод или многоатомный спирт. Походящий стабилизатор, применимый в практике по настоящему изобретению, составляет приблизительно от 1,0 до 10% (мас./об.) углевода или многоатомного спирта. Многоатомные спирты и углеводы характеризуются одними и теми же характеристиками своих основных цепей, т.е. --CHОН--CHОН--, которые ответственны за стабилизацию белков. Многоатомные спирты включают в себя такие соединения, как сорбит, маннит, глицерин и полиэтиленгликоли (PEG). Данные соединения представляют собой молекулы с неразветвленной цепью. Углеводы, такие как манноза, рибоза, сахароза, фруктоза, трегалоза, мальтоза, инозитол и лактоза, с другой стороны, являются циклическими молекулами, которые могут содержать кето- или альдегидную группу. Данные два класса соединений, как продемонстрировали, являются эффективными при стабилизации белка от денатурации, вызванной повышенной температурой и в результате процессов замораживания-оттаивания или замораживания-высушивания. Подходящие углеводы включают в себя галактозу, арабинозу, лактозу или любой другой углевод, который не характеризуется побочным действием на страдающего сахарным диабетом пациента, т.е. углевод не метаболизируется до формы образования неприемлемо больших концентраций глюкозы в крови. Такие углеводы хорошо известны в данной области, как подходящие для диабетиков. Сахароза и фруктоза пригодны для использования с соединением в применениях, не относящихся к сахарному диабету (например, лечение ожирения).

В определенных вариантах осуществления, если включают в состав стабилизатор, соединение стабилизируется многоатомным спиртом, таким как сорбит, маннит, инозитол, глицерин, ксилит и сополимер полипропилен/этиленгликоль, а также различными полиэтиленгликолями (PEG) молекулярной массы 200, 400, 1450, 3350, 4000, 6000, 8000 и даже больше. Маннит является предпочтительным многоатомным спиртом в некоторых вариантах осуществления. Другой применимой особенностью лиофилизированных препаратов по настоящему изобретению является поддержание тоничности лиофилизиро-

ванных препаратов, описываемых в настоящем документе, с тем же самым компонентом препарата, который служит для поддержания его стабильности. В некоторых вариантах осуществления маннит является предпочтительным многоатомным спиртом, применимым для данной цели.

Фармакопея Соединённых Штатов (USP) утверждает, что противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях следует добавлять к препаратам, содержащимся в контейнерах для многократных доз. Они должны присутствовать в соответствующей концентрации во время использования, чтобы предотвратить размножение микроорганизмов, неосторожно введенных в препарат при заборе части содержимого шприцем с иглой для подкожных инъекций, или применяя другие инвазивные способы доставки, такие как шприцы-ручки. Противомикробные средства следует оценить, чтобы гарантировать совместимость со всеми другими компонентами препарата, и их активность следует оценить в полном препарате, чтобы гарантировать, что определенное средство, которое эффективно в одном препарате, не оказалось неэффективно в другом. Нередко случается обнаружить, что определенное противомикробное средство будет эффективно в одном препарате, но не эффективно в другом препарате.

Консервант, в общем фармацевтическом смысле, представляет собой вещество, которое предотвращает или ингибирует рост микроорганизмов и которое можно добавлять в фармацевтические препараты с данной целью, чтобы избежать последующей порчи препарат микроорганизмами. В то время как количество консерванта не велико, он, все-таки, может влиять на общую стабильность пептида.

При этом консервант для применения в фармацевтических композициях может находиться в диапазоне от 0,005 до 1,0% (мас./об.), в некоторых вариантах осуществления диапазон для каждого консерванта, одного или в сочетании с другими, составляет бензиловый спирт (0,1-1,0%), или т-крезол (0,1-0,6%), или фенол (0,1-0,8%), или комбинация метил- (0,05-0,25%) и этил- или пропил- или бутилпарабенов (0,005-0,03%). Парабены представляют собой сложные эфиры низших алкилов парагидроксibenзойной кислоты. Подробное описание каждого консерванта приведено в Remington's Pharmaceutical Sciences (Id.)

Химерные полипептиды могут не характеризоваться тенденцией адсорбироваться на стекле в стеклянных контейнерах, когда находятся в жидкой форме, поэтому поверхностно-активное вещество не требуется для дополнительной стабилизации фармацевтического препарата. Однако в отношении соединений, которые имеют такую тенденцию, когда находятся в жидкой форме, в их препарате следует использовать поверхностно-активное вещество. Данные препараты можно затем лиофилизировать. Поверхностно-активные вещества часто вызывают денатурацию белка как вследствие гидрофобного разрушения, так и путем разделения солевых мостиковых связей. Относительно низкие концентрации поверхностно-активного вещества могут характеризоваться сильной денатурирующей активностью ввиду сильных взаимодействий между частями поверхностно-активного вещества и реакционноспособными участками белков. Однако целесообразное использование данного взаимодействия может стабилизировать белки в отношении межповерхностной или поверхностной денатурации. Поверхностно-активные вещества, которые могут дополнительно стабилизировать полипептид, могут необязательно присутствовать в диапазоне приблизительно от 0,001 до 0,3% (мас./об.) всего препарата и включают полисорбат 80 (т.е. полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеат), CHAPS® (т.е. 3-[(холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат), Brij® (например, Brij 35, который представляет собой (простой лауриловый эфир полиоксиэтилена (23)), полочсамер или другое неионогенное поверхностно-активное вещество.

Также может быть желательным добавление хлорида натрия или другой соли для регулирования тоничности фармацевтического препарата в зависимости от выбранного регулятора тоничности. Однако это необязательно и зависит от конкретного выбранного препарата. Парентеральные препараты обычно могут быть изотоничными или по существу изотоничными.

Предпочтительным носителем для парентеральных продуктов является вода. Воду подходящего качества для парентерального введения можно приготовить или дистилляцией, или обратным осмосом. Вода для инъекций представляет собой предпочтительный водный носитель для применения в фармацевтических препаратах.

Возможно, что другие ингредиенты могут присутствовать в фармацевтических препаратах. Такие дополнительные ингредиенты могут включать в себя, например, увлажнители, эмульгаторы, масла, антиоксиданты, наполнители, модификаторы тоничности, хелатообразующие средства, ионы металлов, маслянистые носители, белки (например, человеческий сывороточный альбумин, желатин или белки) и цвиттерион (например, аминокислота, такая как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Дополнительно, растворы полимеров или смеси с полимерами обеспечивают возможность контролируемого высвобождения пептида. Такие дополнительные ингредиенты, конечно же, не должны неблагоприятно воздействовать на общую стабильность фармацевтического препарата по настоящему изобретению.

Контейнеры также представляют собой неотъемлемую часть препарат для инъекций и могут считаться компонентом, потому что нет контейнера, который является полностью инертным или каким-либо образом не воздействует на содержащуюся в нем жидкость, особенно, если жидкость является водной. Следовательно, выбор контейнера для определенной инъекции должен исходить из оценки состава материала контейнера, а также раствора и обработки, которой она будет подвергнута. Адсорбцию пептида на

стеклянную поверхность флакона также можно, при необходимости, минимизировать, применяя борсиликатное стекло, например, борсиликатное стекло Wheaton Type I #33 (Wheaton Type I-33) или его эквивалента (Wheaton Glass Co.). Другие продавцы флаконов и кассет из похожего борсиликатного стекла, приемлемых для промышленного производства, включают в себя Kimbel Glass Co., West Co., Bunder Glass GmbH и Form a Vitrum. Биологические и химические свойства соединения можно стабилизировать приготовлением и лиофилизацией в сывороточном флаконе из борсилката Wheaton Type I-33 до конечной концентрации 0,1 и 10 мг/мл соединения в присутствии 5% маннита и 0,02% Tween 80.

Для препаратов, которые необходимо доставить инъекцией, для того чтобы позволить осуществить введение иглы от шприца для подкожных инъекций во флакон с многократными дозами и обеспечить его повторную герметизацию, как только удаляется игла, открытый конец каждого флакона обычно закупоривают крышкой в виде резиновой пробки, удерживаемой на месте алюминиевой лентой.

Пробки для стеклянных флаконов, такие как West 4416/50, 4416/50 (с тефлоновым покрытием) и 4406/40, Abbott 5139, или любую эквивалентную пробку можно использовать в качестве крышки для фармацевтического препарата для инъекций. Для препаратов, включающих в себя пептидные средства против ожирения, данные пробки совместимы с пептидом, а также другими компонентами препарата. Альтернативно, пептид можно лиофилизировать во флаконах, шприцах или кассетах для последующего растворения. Жидкими препаратами по настоящему изобретению можно заполнить одно- или двухкамерные кассеты, или одно- или двухкамерные шприцы.

Каждый из компонентов фармацевтического препарата, описанных выше, известен в данной области и описан в *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol. 1, 2nd ed., Avis et al. Ed., Mercel Dekker, New York, N.Y. 1992, который в полном объеме включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Способ промышленного производства указанных выше жидких препаратов, как правило, включает в себя стадии приготовления смеси, стерилизационной фильтрации и заполнения. Процедура приготовления смеси включает в себя растворение ингредиентов в определенном порядке (консервант, после чего следуют стабилизирующие средства/средства, регулирующие тоничность, буферы и пептид) или растворение в одно и то же время.

Альтернативные препараты, например, непарентеральные, могут не требовать стерилизации. Однако, если стерилизация желательна или необходима, то можно использовать любой подходящий способ стерилизации при разработке пептидного фармацевтического препарата по настоящему изобретению. Типичные способы стерилизации включают в себя фильтрацию, обработку паром (влажным жаром), обработку сухим жаром, газами (например, этиленоксидом, формальдегидом, диоксидом хлора, пропиленоксидом, бета-пропиолактоном, озоном, хлорпикрином, перуксусной кислотой, метилбромидом и тому подобным), воздействием источником излучения и асептической обработкой. Фильтрация представляет собой предпочтительный способ стерилизации для жидких препаратов по настоящему изобретению. Стерилизационная фильтрация включает в себя фильтрацию через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм (1 или 2), которые могут быть соединены в серию. После фильтрации раствором заполняют соответствующие флаконы или контейнеры.

В определенных вариантах осуществления химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, периферически вводятся субъектам. В некоторых вариантах осуществления жидкие фармацевтические препараты по настоящему изобретению предназначены для парентерального введения. Подходящие способы введения включают в себя внутримышечное, внутривенное, подкожное, внутрикожное, внутрисуставное, подбололочное введение и т.п. В некоторых вариантах осуществления подкожный способ введения является предпочтительным. В определенных вариантах осуществления доставка через слизистые оболочки также является предпочтительной. Данные способы включают в качестве неограничивающих примеров, пероральный, интраназальный, сублингвальный, легочный и буккальный способы, которые могут включать в себя введение пептида в жидкой, полутвердой или твердой форме. Для препаратов, содержащих химерные полипептиды, введение такими путями может потребовать существенно больше соединения, чтобы получить требуемые биологические эффекты вследствие сниженной биодоступности по сравнению с парентеральной доставкой. Кроме того, можно осуществить парентеральную доставку с контролируемым высвобождением посредством образования полимерных микрокапсул, матриц, растворов, имплантатов и устройств и введением их парентерально или хирургическими способами. Примеры препаратов с контролируемым высвобождением описаны в патентах США № 6368630, 6379704 и 5766627, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Данные лекарственные формы могут характеризоваться более низкой биодоступностью вследствие захвата некоторой части пептида в полимерной матрице или устройстве. См., например, патенты США № 6379704, 6379703 и 6296842, каждый из которых включен в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме и во всех отношениях.

Соединения могут предлагаться в стандартной лекарственной форме, содержащей количество химерного полипептида, которое будет эффективно в одно- или многократных дозах.

Как будет хорошо понятно специалистам в данной области, эффективное количество химерного полипептида будет меняться в зависимости от многих факторов, включающих в себя возраст и массу

тела пациента, физического состояния пациента, подлежащего лечению состояния и других факторов, известных в данной области. Эффективное количество химерных полипептидов будет также меняться в зависимости от определенной вводимой комбинации. Как описано в настоящем документе, введение химерных полипептидов в комбинации может позволить снизить количество любого из вводимых химерных полипептидов до эффективного количества.

J. Эффективные дозировки.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем документе, включают в себя композиции, где активный ингредиент содержится в терапевтически эффективном количестве, т.е. в количестве, эффективном для достижения его предусмотренной цели. Фактическое количество, эффективное для определенного применения, будет зависеть, *inter alia*, от состояния, требующего лечения. Например, при введении в способах для лечения сахарного диабета такие композиции будут содержать количество активного ингредиента, эффективное, чтобы достичь требуемого результата (например, снижение у субъекта уровня глюкозы в крови натощак). При введении в способах для лечения ожирения, такие композиции будут содержать количество активного ингредиента, эффективное, чтобы достичь требуемого результата (например, снижение массы тела).

Дозировка и частота приема (однократная или многократные дозы) вводимого соединения может изменяться в зависимости от различных факторов, включающих в себя способ введения; размер, возраст, пол, состояние здоровья, массу тела, индекс массы тела и диету пациента; природу и степень выраженности симптомов заболевания, требующего лечения (например, заболевание, поддающееся лечению соединениями, описываемым в настоящем документе; уровень глюкозы в крови натощак); наличие других заболеваний или других связанных со здоровьем проблем; тип параллельного лечения; и осложнений от любого заболевания или схемы лечения. Другие схемы лечения или средства можно использовать в сочетании со способами и соединениями по изобретению.

Терапевтически эффективные количества для применения у людей можно определить в моделях на животных. Например, дозу для человека можно приготовить, чтобы получить концентрацию, которая, как было обнаружено, является эффективной для животных. Дозировку у людей можно подгонять при помощи мониторинга одного или нескольких физиологических параметров, включая в качестве неограничивающих примеров уровень сахара в крови и массу тела, и меняя дозировку в большую или в меньшую сторону, как описано выше и известно в данной области.

Дозировки могут меняться в зависимости от потребностей пациента и от применяемого соединения. Доза, вводимая пациенту в контексте настоящего изобретения, должна быть достаточной, чтобы вызвать с течением времени благоприятный терапевтический ответ у пациента. Величину дозы также будут определять наличием, природой и степенью любых неблагоприятных побочных эффектов. Как правило, лечение начинают с меньших дозировок, которые меньше, чем оптимальная доза соединения. После этого дозировку увеличивают небольшими приращениями, пока не достигнут оптимального эффекта при данных обстоятельствах. В одном из вариантов осуществления изобретения диапазон дозировки составляет от 0,001 до 10% (мас./об.). В другом варианте осуществления диапазон дозировки составляет от 0,1 до 5% (мас./об.).

Однако, типичные дозы могут составлять величину от нижнего предела приблизительно 0,1 до верхнего предела приблизительно 200 мг фармацевтического соединения в день. Также рассматриваются другие диапазоны доз, такие как от 1 до 100 мг соединения на дозу, и от 3 до 70 мг на дозу. Дозы в день можно доставлять дискретными стандартными дозами или обеспечивать постоянно в период времени 24 ч или в любую часть из периода 24 ч.

Величины дозы и интервалы можно подобрать индивидуально, чтобы обеспечить уровни вводимого соединения, эффективные для определенного клинического признака, подвергаемого лечению. Это обеспечит схема лечения, которая соразмерна с серьезностью течения заболевания у человека.

Применяя идеи, описанные в настоящем документе, можно запланировать эффективную профилактическую или терапевтическую схему лечения, которая не вызывает существенную токсичность и, все же, полностью эффективна для лечения клинических симптомов, проявляющихся у конкретного пациента. Такое планирование должно включать тщательный выбор активного соединения с учетом факторов, таких как эффективность соединения, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и серьезность неблагоприятных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного средства.

K. Токсичность.

Соотношение между токсичностью и терапевтическим эффектом определенного соединения является его терапевтическим индексом и его можно выразить в качестве соотношения между LD₅₀ (количество соединения, летального для 50% популяции) и ED₅₀ (количество соединения, эффективное для 50% популяции). Соединения, которые проявляют высокий терапевтический индекс, являются предпочтительными. Данные о терапевтическом индексе, получаемые из анализов на клеточных культурах и/или исследований на животных, можно использовать в определении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в пределах диапазона концентраций в плазме, который включает ED₅₀ с невысокой токсичностью или с ее отсутствием. Дозировка может ме-

няться в пределах данного диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого способа введения. См., например Fingl et al., In: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch.1, p.1, 1975. Правильный препарат, способ введения и дозировку может выбрать лечащий врач, принимая во внимание состояние пациента и конкретный способ, в котором применяют соединение.

VII. Примеры.

Пример 1. Получение химерного полипептида.

Последовательность белка конструировали и, используя коммерческое программное обеспечение, обратно транслировали в последовательность ДНК для клонирования в экспрессирующий вектор *E.coli*. Последовательности получали либо как олигонуклеотиды и сшивали, применяя стандартные методики амплификации ПЦР, либо их расщепляли из существующих экспрессирующих конструкций, используя стандартные рестрикционные ферменты, и затем лигировали друг с другом. Последовательности, экспрессирующие интересующий белок, вводили в плазмиду pET45 под промотором T7 для индуцируемой экспрессии. После того как конструкции подтверждали секвенированием, вектор ДНК очищали и переносили в клетку-хозяина для экспрессии, типично BL21(DE3). Единичную колонию выделяли для роста стартовой культуры в 4 мл среды LB в течение ~6 ч. Глицериновые маточные растворы приготавливали, добавляя 100 мкл 80% глицерина к 900 мкл маточного раствора, и хранили при -80°C. Необязательно, 500 мкл неиндуцированного образца сохраняли для анализа в геле. 60 мл культуры (magic media) инокулировали, используя 60 мкл стартовой культуры в колбе Томпсона объемом 125 мл и инкубировали при 30°C в течение ночи. Удаляли 250 мкл образца для анализа. Клеточный осадок осаждали центрифугированием и замораживали для дальнейшей обработки.

Бактериальные клетки собирали и впоследствии лизировали для выделения телец включения. Поскольку белок находился в тельцах включения, их растворяли и белок повторно сворачивали при 4°C. Белки затем отделяли, применяя эксклюзионную хроматографию, пока не оставалась только одна полоска, и уровни эндотоксинов были приемлемыми для тестирования *in vivo*. Аналитическую ВЭЖХ, ОФ-ЖХ-МС и гель SDS-PAGE прогоняли как показатели контроля качества для конечного белка. Белок разделяли на предварительно определенные аликваты и хранили при -80°C.

Пример 2. Биологические и фармацевтические свойства.

Как указано ниже в табл. 3, химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, характеризуются сопоставимыми, и некоторые даже превосходящими, свойствами по сравнению с A100 (соединение 37, SEQ ID NO:24). Данные свойства включают в себя биологические свойства, такие как связывающая активность лептина, функциональная активность лептина и потребление пищи у мышей, и фармацевтические свойства, такие как растворимость при нейтральных величинах pH.

Иллюстративные анализы в отношении связывающей активности лептина, и функциональной активности лептина были описаны ранее.

Активность потребления пищи у мышей проверяли в следующем ниже анализе: самок мышей C57BL6 и их корм взвешивали ежедневно за 3 ч до выключения света. Сразу же после взвешивания в дни 0, 1, 2 и 3 мышам п/к вводили соединение лептина или мутант в 1xPBS. Точки представляют собой среднее значение \pm sd для n=9 клеток (3 мыши/клетка). Результаты, приведенные в колонке "Потребление пищи мышью" в табл. 3, соответствуют с поправкой на носитель изменению массы тела в %, измеренной через 4 дня.

Растворимость измеряли при помощи следующего ниже анализа: белки концентрировали при 4°C, центрифугировали, чтобы удалить выпавшие фазы, затем позволяли уравновеситься при комнатной температуре в течение ночи. Белки фильтровали, чтобы удалить выпавшие фазы и затем определяли концентрацию, измеряя поглощение при OD280 и используя теоретический молярный коэффициент экстинкции.

Таблица 3

Биологические и фармацевтические свойства химерных полипептидов

Соединение	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (связывание в клетках Obesa) нМ	EC ₅₀ (функциональный анализ Stat5 в Obesa) нМ	Потребление пищи мышью	Растворимость в PBS при нейтральной величине pH мг/мл*
37	4	0,2 нМ-0,8 нМ	0,02	4,053	5
38	8	1,996	0,019	6,7	35
39	3	N	0,095	3,1	ND
40	9	2,412	0,588	0	17
41	2	0,555	0,028	10,8	21
42	6	2,017	0,043	8,4	17
43	5	3,082	0,054	6,5	17
44	7	3,542	0,032	6,4	20
45	6	0,527	0,029	10,3	18
46	5	0,479	0,042	10-20%	20
47	7	0,788	0,062	14%	15
48	3	0,036	0,039	4,9	14
49	8	0,105	0,034	4	13
50	6	0,214	0,022	8,3	5
51	6	0,119	0,038	3,8	25
52	7	N	0,044	ND	19

ND = не определено.

* Данные числа не обязательно представляют максимальную растворимость каждого соединения.

Пример 3. Стабильность химерных пептидов.

Как указано в следующей ниже табл. 4, химерные полипептиды, описываемые в настоящем документе, характеризуются сопоставимой, и некоторые даже превосходящей, физической стабильностью по сравнению с A100 (соединение 37, SEQ ID NO:24). Соединения приготавливали в следующем ниже буфере: 10 мМ глутаминовой кислоты, 2% глицин, 1% сахара, 0,01% Tween 20, pH 4,25 и хранили при 37°C. Образцы извлекали во время T = 0, 2, 5, 7 и 14 дней и проверяли при визуальном анализе, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), УФ-спектрометрии и динамическом рассеянии света (DLS). Как показано в табл. 4, химерные полипептиды характеризуются сопоста-

вимою или преобладающей чистотой и эффективностью по сравнению с соединением 37.

Таблица 4

Стабильность химерных полипептидов

соединение		Остающаяся эффективность*	Потеря чистоты**	Скорректированная эффективность***	Визуальный анализ	Изменение размера (DLS)
8	мг/мл	96,3%	1,8%	94,6%	чистый	1,0
		92,2%	1,9%	90,4%	чистый	2,0
1	мг/мл		%	%	чистый	
8	мг/мл	88,8%	2,7%	86,1%	чистый	1,7
2	мг/мл	96,3%	14,9%	81,4%	чистый	1,9
9	мг/мл	94,5%	13,0%	81,5%	чистый	1,0
7	мг/мл	98,5%	10,7%	87,8%	чистый	1,0

* Нормализованная эффективность при анализе с УФ относительно T=0;

** Нормализованная чистота при ОФ-ВЭЖХ относительно T=0;

*** Эффективность при анализе с УФ - чистота при ЖХ (полностью растворимое-степени растворимости).

Пример 4. Изменение массы тела после ежедневного введения химерного полипептида.

Способ. Самок мышей C57BL/6 и их корм взвешивали ежедневно за 3 ч до выключения света. Сразу же после взвешивания в дни 0, 1, 2 и 3 мышам п/к вводили соединение лептина или мутант в 1×PBS. Точки представляют собой среднее значение \pm sd для n=4 клетки (3 мыши/клетка). Каждой группе (n=12/группа) назначали введение одного из следующего ниже: носитель; соединение 41 в количестве 0,1 мг/кг; соединение 41 в количестве 0,3 мг/кг; соединение 41 в количестве 1 мг/кг; соединение 41 в количестве 3 мг/кг; соединение 41 в количестве 5 мг/кг; соединение 41 в количестве 10 мг/кг. Потребление пищи и изменение массы тела (% с поправкой на носитель) отслеживали в течение 4 дней, и результаты записывали, как показано (фиг. 1A и 1B). Точки представляют собой среднее значение \pm sd для n=4 клетки (3 мыши/клетка). Вводимые соединения: носитель (закрашенный круг); соединение 41 в количестве 0,1 мг/кг (треугольник вершиной вниз); соединение 41 в количестве 0,3 мг/кг (незакрашенный ромб); соединение 41 в количестве 1 мг/кг (незакрашенный круг); соединение 41 в количестве 3 мг/кг (треугольник вершиной вверх); соединение 41 в количестве 5 мг/кг (звездочка); соединение 41 в количестве 10 мг/кг (закрашенный ромб).

Результаты. Как изображено на фиг. 1A и 1B, введение различных доз химерного полипептида приводило к снижению потребления пищи и массы тела, относительно группы, которая получала только носитель. Дозозависимый эффект наблюдается на фиг. 1C.

Пример 5. Изменение массы тела после ежедневного введения химерного полипептида.

Способ. Самок мышей C57BL/6 и их корм взвешивали ежедневно за 3 ч до выключения света. Сразу же после взвешивания в дни 0, 1, 2 и 3 мышам п/к вводили соединение лептина или мутант в 1×PBS. Точки представляют собой среднее значение \pm sd для n=4 клетки (3 мыши/клетка). Каждой группе (n=12/группа) назначали введение одного из следующего ниже: носитель; соединение 42 в количестве 0,1 мг/кг; соединение 42 в количестве 0,3 мг/кг; соединение 42 в количестве 1 мг/кг; соединение 42 в количестве 3 мг/кг; соединение 42 в количестве 5 мг/кг; соединение 42 в количестве 10 мг/кг. Потребление пищи и изменение массы тела (% с поправкой на носитель) отслеживали в течение 4 дней, и результаты записывали, как показано (фиг. 2A и 2B). Точки представляют собой среднее значение \pm sd для n=4 клетки (3 мыши/клетка). Вводимые соединения: носитель (закрашенный круг) Соединение 42 в количестве 0,1 мг/кг (треугольник вершиной вниз); соединение 42 в количестве 0,3 мг/кг (треугольник вершиной вверх); соединение 42 в количестве 1 мг/кг (закрашенный квадрат); соединение 42 в количестве 3 мг/кг (вертикальная полоска выше и ниже точки); соединение 42 в количестве 5 мг/кг (звездочка); соединение 42 в количестве 10 мг/кг (вертикальная полоска выше точки).

Результаты. Как изображено на фиг. 2A и 2B, введение различных доз химерного полипептида приводило к снижению потребления пищи и массы тела, относительно группы, которая получала только носитель. Дозозависимый эффект наблюдается на фиг. 2C.

Как показано ниже в табл. 5, дозозависимые эффекты, измеренные для химерных полипептидов по изобретению, сопоставимы с дозозависимыми эффектами, измеренными для лептина нерпы (соединение 38) и лептина человека (соединение 37), их которых получены химерные полипептиды.

Таблица 5

Дозозависимые эффекты химерных полипептидов

Соединение	ED50
37	0,44-0,6 мг/кг
38	0,8 мг/кг
41	0,5 мг/кг
42	1,1 мг/кг

VIII. Варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Химерный полипептид, содержащий полипептид лептина нерпы дикого типа, где по меньшей мере один непрерывный участок из 1-30 аминокислоты последовательности лептина нерпы дикого типа был заменен на непрерывный участок из 1-30 аминокислоты последовательности зрелого лептина человека.

Вариант осуществления 2. Химерный полипептид согласно варианту осуществления 1, где два или более непрерывных участка из 1-30 аминокислот последовательности лептина нерпы дикого типа были заменены в каждом участке на непрерывный участок из 1-30 аминокислот последовательности зрелого лептина человека.

Вариант осуществления 3. Химерный полипептид согласно варианту осуществления 1 или 2, где последовательность лептина нерпы дикого типа содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28 или SEQ ID NO:31.

Вариант осуществления 4. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51.

Вариант осуществления 5. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, где последовательность зрелого лептина человека содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты в положении, где наблюдают отличие в соответствующем положении лептина из другого вида.

Вариант осуществления 6. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, где последовательность зрелого лептина человека содержит по меньшей мере две замены аминокислот в положениях, где наблюдают отличие в соответствующих положениях лептина из другого вида.

Вариант осуществления 7. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, где последовательность зрелого лептина человека содержит по меньшей мере три замены аминокислот в положениях, где наблюдают отличие в соответствующих положениях лептина из другого вида.

Вариант осуществления 8. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-

Вариант осуществления 10. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, где последовательность зрелого лептина человека содержит по меньшей мере шесть замен аминокислот в положениях, где наблюдают отличие в соответствующих положениях лептина из другого вида.

Вариант осуществления 12. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, где последовательность зрелого лептина человека содержит по меньшей мере восемь замен аминокислот в положениях, где наблюдают отличие в соответствующих положениях лептина из другого вида.

Вариант осуществления 14. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, где последовательность зрелого лептина человека содержит по меньшей мере десять замен аминокислот в положениях, где наблюдают отличие в соответствующих положениях лептина из другого вида.

Вариант осуществления 15. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-14, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

Вариант осуществления 16. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-15, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85.

Вариант осуществления 17. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-16, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33.

Вариант осуществления 18. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-17, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:33.

Вариант осуществления 19. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-18, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере с 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:33.

Вариант осуществления 20. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-19, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85.

Вариант осуществления 21. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-20, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33.

Вариант осуществления 22. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

Вариант осуществления 23. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30.

Вариант осуществления 24. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

Вариант осуществления 25. Химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где химерный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

Вариант осуществления 26. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, охватывающий введение химерного полипептида согласно любому из вариантов осуществления с 1 до 25 нуждающемуся в этом субъекту в количестве, эффективном для лечения указанного заболевания или нарушения.

Вариант осуществления 27. Способ согласно варианту осуществления 26, где заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из липодистрофии, дислипидемии, гиперлипидемии, избыточной массы тела, ожирения, гипоталамической аменореи, болезни Альцгеймера, лептиновой недостаточности, жировой дистрофии печени, сахарного диабета (включая I тип и II тип), неалкогольного стеатогепатита (NASH), заболевания неалкогольного ожирения печени (NAFLD), метаболического синдрома X и болезни Хантингтона.

Вариант осуществления 28. Способ согласно варианту осуществления 26 или 27, где заболевание или нарушение представляет собой липодистрофию, дислипидемию, гиперлипидемию, избыточную массу тела, ожирение, гипоталамическую аменорею, болезнь Альцгеймера, лептиновую недостаточность, жировую дистрофию печени или сахарный диабет.

Вариант осуществления 29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 26-28, где заболевание или нарушение представляет собой сахарный диабет I типа или сахарный диабет II типа.

Вариант осуществления 30. Способ согласно любому из вариантов осуществления 26-28, где заболевание или нарушение представляет собой ожирение.

Вариант осуществления 31. Способ согласно любому из вариантов осуществления 26-28, где заболевание или нарушение представляет собой липодистрофию или лептиновую недостаточность.

Вариант осуществления 32. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-25 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

IX. Перечень последовательностей без соблюдения формальных требований.

Перечень раскрытых в настоящем документе последовательностей без соблюдения формальных требований таков:

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMD
QTLAVYQQILTSMP SRNV IQISNDLENLRDLLHVLA FSKSCHLPQASGLETLES LGGVLEA
SGYSTEVVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC, где Xaa в положении 28 представляет собой
Q или отсутствует (SEQ ID NO:1).

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQT
LAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGSLQDILQQDLVSPEC (SEQ ID NO:2).

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQT
AVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEASL
YSTEVVALSRLQGSLQDILQQDLVSPEC (SEQ ID NO:3).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SK
MDQTLAVYQQILTSMP SRNV IQISNDLENLRDLLHVLA FSKSCHLPQASGLETLES LGGV
LEASGYSTEVVALSRLQGSLQDMLQQDLSPGC, где Xaa в положении 29 представляет
собой Q или отсутствует (SEQ ID NO:4).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQ
TLAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEA
SLYSTEVVALSRLQGSLQDILQQDLVSPEC (SEQ ID NO:5).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSAKQRTGLDFIPGLHPILSL SKMDQT
LAVYQQVLTSLPSQNVLQIANDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTSGLQKPESLDGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGSLQDILQQDLVSPEC (SEQ ID NO:6).

VPIWRVQDDTKTIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSLSKMDQ
TLAIYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGGVLEASL
YSTEVVALSRLQGALQDMLRQLDLSPGC (SEQ ID NO:7).

MVPIWRVQDDTKTIKTIVTRISDISHMQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLSLSKMD
QTLAIYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHLLASSKSCPLPQARALETLES LGGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGALQDMLRQLDLSPGC (SEQ ID NO:8).

VPICKVQDDTKTIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQRTGLDFIPGLHPLL SLSKMD
QTLAIYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGGVLEA
SLYSTEVVALSRLQGSLQDMLRQLDLSPGC, где Xaa в положении 28 представляет собой
Q или отсутствует (SEQ ID NO:9).

MVPICKVQDDTKTIKTIVTRINDISHT-Xaa-SVSSKQRTGLDFIPGLHPLL SLSK
MDQTLAIYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLES LGGVLE
EASLYSTEVVALSRLQGSLQDMLRQLDLSPGC, где Xaa в положении 29 представляет
собой Q или отсутствует (SEQ ID NO:10).

MHWGILCGFLWLPYLFYVQAVPIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISHTQSVSSKQ
KVTGLDFIPGLHPILTSLKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKS
CHLPWASGLETDSLGGVLEASGY STEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID
NO: 11)

VPIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISH-Xaa-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTSLK
MDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETDSLGGV
LEASGYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC, где Xaa в положении 27 представляет
собой T или A ; а Xaa в положении 28 представляет собой Q или отсутствует (SEQ ID
NO:12).

MVPIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISH-Xaa-Xaa-SVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTSL
KMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSK SCHLPWASGLETDSLGG
VLEASGYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC, где Xaa в положении 28
представляет собой T или A ; а Xaa в положении 29 представляет собой Q или отсутствует
(SEQ ID NO:13).

VPIQKVQSDTKTIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLTLSQMDQT
LAIYQQILINLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAFSKSCHLPLASGLETLES LGDVLEASLY
STEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:14).

MVPIQKVQSDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQRTGLDFIPGLHPVLTLSQMD
QTLAIYQQILINLPSRNVIQISNDLENLRDLLHLLAFSKSCHLPLASGLETLES LGDVLEAS
LYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:15).

VPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQRTGLDFIPGLHPILSLSKMDQT
LAVYQQILTSLPSQNVLQIAHDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTRGLQKPESLDGVLEASL
YSTEVVALSRLQGSLQDILQQDLDSPEC (SEQ ID NO:16).

MVPIHKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSARQRTGLDFIPGLHPILSLSKMDQ
TLAVYQQILTSLPSQNVLQIAHDLENLRDLLHLLAFSKSCSLPQTRGLQKPESLDGVLEAS
LYSTEVVALSRLQGSLQDILQQDLDSPEC (SEQ ID NO:17).

ISIEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQNGVSTDQRVSGLDFIPGNQQFQNLADMDQT
LAVYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATLKNCPFTRSDGLDMEIWGGIVEESL
YSTEVTLDRLRKSLSKNIEKQLDHIQG (SEQ ID NO:18).

MRCILLYGFLCVWQHLYYSHPISEKIQADTKTLTKTIITRIIQLSTQNGVSTDQRV
SGLDFIPGNQQFQNLADMDQTLAVYQQILSSLPMPDRTQISNDLENLRSLFALLATLKN
PFTRSDGLDMEIWGGIVEESLYSTEVTLDRLRKSLSKNIEKQLDHIQG (SEQ ID NO:19).

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLD SLGGVLEAS
GYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:20).

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLD SLGGVLEAS
GYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:21).

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTL
AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLD SLGGVLEASG
YSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:22).

VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQTL
AVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLD SLGGVLEASG
YSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:23).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SKMDQ
TLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLD SLGGVLEA
SGYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:24).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHAQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMD
QTLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPLPWASGLETLDSLGGVLE
ASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:25).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPLPWASGLETLDSLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:26).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHASVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLKMDQT
LAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPLPWASGLETLDSLGGVLEAS
GYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:27).

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:28).

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASVHS
TEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:29).

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
TYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASVHS
TEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:30).

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
LATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRAS
VHSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:31).

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
LATYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASV
HSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:32).

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
ATYQQILTSLQSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:33).

MDKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKVPI

QKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQIL
 TSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGGVLEASGYSTEVA
 LSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:34)

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGGVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:35).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGGVLEA
 SGYSTEVAALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO: 36).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLESLLGGVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC (SEQ ID NO:37).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLEFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLESLLGEVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 38).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGGVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 39).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGEVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 40).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGEVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 41).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGGVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 42).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPWASGLETLDLGEVLEAS
 GYSTEVAALSRLQGSQDILQQLDVSPEC (SEQ ID NO: 43).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLTDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 44).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETLESLGEVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPEC (SEQ ID NO: 45).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDILQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 46).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDILQQLDVSPEC (SEQ ID NO: 47).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLTDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDILQQLDVSPEC (SEQ ID NO: 48).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQTSGLTDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPEC (SEQ ID NO: 49).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 50).

MVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQ
 TLAVYQQILTSMPSRNVQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCSLPQASGLETDLGGLVLEAS
 GYSTEVVALSRLQGSLQDMLQQLDLSPEC (SEQ ID NO: 51).

PIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO: 52).

MPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 LATYQQILTSLQSRVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVRARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO: 53).

PIQRVQDDTKTIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SKMDQTL
AVYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:54).

MPIQRVQDDTKTIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SKMDQT
LAVYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:55).

PIQRVQDDTKTIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQILA
TYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:56).

MPIQRVQDDTKTIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQI
LATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
VHSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:57).

PIQRVQDDTKTIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SGMDQILA
TYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:58).

MPIQRVQDDTKTIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTL SGMDQIL
ATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:59).

PIQRVQDDTKTIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQILA
TYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGY
STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:60).

MPIQRVQDDTKTIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQI
LATYQQILTSLQSRVSVQIANDLANLRALLRLLASAKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEAS
GYSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:61).

PIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQIL
ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:62)

MPIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQI
LATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:63)

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVHS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:64)

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:65)

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSchLPWASGLETLDSLGGVLEASGYS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:66)

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVCSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSchLPWASGLETLDSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:67)

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRSVVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:68)

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRSVVQIANDLANLRALLRLLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLQGSQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:69)

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRSVVQIANDLANLRALLRLLASAKSchLPWASGLETLDSLGGVLEASGY
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:70)

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRSVVQIANDLANLRALLRLLASAKSchLPWASGLETLDSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:71)

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQILA
 TYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSchLPWASGLETLDSLGGVLEASGYS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:72)

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLQSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSchLPWASGLETLDSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:73).

PIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:74).

MPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQI
 LATYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:75).

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SKMDQTL
 AVYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:76).

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SKMDQT
 LAVYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRAS
 VHSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:77).

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQILA
 TYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:78).

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQIL
 ATYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLNPGC (SEQ ID NO:79).

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQILA
 TYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASGY
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:80).

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQIL
 ATYQQILTSLSRSVVQIANDLANLRALLRLASAKSCHLPWASGLETDSLGGVLEASG
 YSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:81).

PIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQIL
 ATYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASVH
 STEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:82)

MPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISPPQGVSSRPRVAGLDFIPRVQSVRTL SGMDQI
 LATYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSCPVPARGSDTIKGLGNVLRASV
 HSTEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:83)

PIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQILA
 TYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASGYS
 TEVVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:84)

MPIQRVQDDTKTLIKTIITRINDISPPQGVSSRPVAGLDFIPRVQSVRTLSGMDQIL
 ATYQQILTSLSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSKCHLPWASGLETLDLGGVLEASG
 YSTEVALSRLKAALQDMLRQLDRNPGC (SEQ ID NO:85)

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY (SEQ ID NO:86);

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSSTNVGSNTY (SEQ ID NO:87);

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY (SEQ ID NO:88).

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFTFPQTAIGVGAP (SEQ ID NO:89);

CNSLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP (SEQ ID NO:90);

KCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSGNTY (SEQ ID NO:91).

X'-Xaa¹-Cys²-Asn³-Thr⁴-Ala⁵-Thr⁶-Cys⁷-Ala⁸-Thr⁹-Gln¹⁰-Arg¹¹-Leu¹²-Ala¹³-Asn¹⁴-
 Phe¹⁵-Leu¹⁶-Val¹⁷-His¹⁸-Ser¹⁹-Ser²⁰- Xaa²¹-Asn²²-Phe²³- Xaa²⁴- Xaa²⁵- Xaa²⁶- Xaa²⁷- Xaa²⁸-
 Xaa²⁹-Thr³⁰- Xaa³¹-Val³²-Gly³³-Ser³⁴-Asn³⁵-Thr³⁶-Tyr³⁷-X (SEQ ID NO:92)

CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:93)

KCNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:94)

CNTATCATQRLANFLVRSSKNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:95)

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:96)

CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:97)

KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:98)

CNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:99)

KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:100)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:101)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:102)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:103)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:104)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:105)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:106)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:107)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:108)

CNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂ (SEQ ID NO:109)

Список последовательностей

<110> AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.
 <120> HIGHLY SOLUBLE LEPTINS
 <130> 1317w01
 <140> PCT/US2011/053774
 <141> 2011-09-28
 <150> 61/422,091
 <151> 2010-12-10
 <150> 61/387,402
 <151> 2010-09-28
 <160> 164
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> May or may not be present
 <400> 1
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser Pro
 130 135 140

Gly Cys
 145

<210> 2
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 2
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala
 20 25 30

Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45

Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val
 50 55 60

Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu
 65 70 75 80

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

Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly
 100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro
 130 135 140

Glu Cys
 145

<210> 3
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 3
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr

1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Ser Val Ser Ala Lys
 20 25 30
 Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
 35 40 45
 Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Ser
 85 90 95
 Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly Val
 100 105 110
 Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro Glu
 130 135 140
 Cys
 145

 <210> 4
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> May or may not be present

 <400> 4
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Cys
 145
 <210> 5
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 5
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ala Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Val Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser

115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
 130 135 140

 Pro Glu Cys
 145

 <210> 6
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

 <400> 6
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15

 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Ser Val Ser Ala
 20 25 30

 Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45

 Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Val
 50 55 60

 Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala Asn Asp Leu
 65 70 75 80

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

 Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly
 100 105 110

 Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125

 Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser Pro
 130 135 140

 Glu Cys
 145

 <210> 7
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Sus sp.

 <400> 7

Val Pro Ile Trp Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Ser Asp Ile Ser His Met Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Val
 35 40 45
 Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Leu Pro Gln Ala Arg Ala Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Gln Gly Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 8
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Sus sp.

<400> 8
 Met Val Pro Ile Trp Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Ser Asp Ile Ser His Met Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Val Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Leu Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp

65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Ser Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys Pro Leu Pro Gln Ala Arg Ala Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Cys
 145
 <210> 9
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Bos sp.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> May or may not be present
 <400> 9
 Val Pro Ile Cys Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Leu
 35 40 45
 Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Pro Ser Arg Asn Val Val Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Ala Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Leu Pro Gln Val Arg Ala Leu Glu Ser Leu Glu Ser Leu Gly Val
 100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 10
<211> 147
<212> PRT
<213> Bos sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> May or may not be present

<400> 10
Met Val Pro Ile Cys Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Leu Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Leu Pro Ser Arg Asn Val Val Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Ala Ser Lys Ser
85 90 95

Cys Pro Leu Pro Gln Val Arg Ala Leu Glu Ser Leu Glu Ser Leu Gly
100 105 110

Val Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

```

<210> 11
<211> 167
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Met His Trp Gly Thr Leu Cys Gly Phe Leu Trp Leu Trp Pro Tyr Leu
1      5      10      15

Phe Tyr Val Gln Ala Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys
20      25      30

Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr
35      40      45

Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro
50      55      60

Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala
65      70      75      80

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

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala
100     105     110

Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu
115     120     125

Asp Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val
130     135     140

Val Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln
145     150     155     160

Leu Asp Leu Ser Pro Gly Cys
165

<210> 12
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Thr or Ala

<220>

```

<221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> May or may not be present

 <400> 12
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15

 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Xaa Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30

 Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45

 Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60

 Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80

 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95

 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
 100 105 110

 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125

 Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
 130 135 140

 Gly Cys
 145

 <210> 13
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Thr or Ala

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> May or may not be present

 <400> 13
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys

1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Xaa Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Cys
 145
 <210> 14
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Macaca mulatta
 <400> 14
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Ser Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Val
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Gln Met Asp Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Ile Asn Leu Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80

024507

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

His Leu Pro Leu Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly Asp
100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 15
<211> 147
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 15
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Ser Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Val Leu Thr Leu Ser Gln Met Asp Gln Thr Leu Ala Ile Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Ile Asn Leu Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Leu Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly
100 105 110

Asp Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

<210> 16
<211> 146
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 16
Val Pro Ile His Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ala
20 25 30
Arg Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35 40 45
Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
50 55 60
Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala His Asp Leu
65 70 75 80
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95
Ser Leu Pro Gln Thr Arg Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp Gly
100 105 110
Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Glu Cys
145

<210> 17
<211> 147
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 17
Met Val Pro Ile His Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ala Arg Gln Arg Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Ser Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Leu Pro Ser Gln Asn Val Leu Gln Ile Ala His Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Leu Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys Ser Leu Pro Gln Thr Arg Gly Leu Gln Lys Pro Glu Ser Leu Asp
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Glu Cys
 145
 <210> 18
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Ornithorhynchus anatinus
 <400> 18
 Ile Ser Ile Glu Lys Ile Gln Ala Asp Thr Lys Thr Leu Thr Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Ile Gln Leu Ser Thr Gln Asn Gly Val Ser Thr
 20 25 30
 Asp Gln Arg Val Ser Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Asn Gln Gln Phe
 35 40 45
 Gln Asn Leu Ala Asp Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Ser Ser Leu Pro Met Pro Asp Arg Thr Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Ser Leu Phe Ala Leu Leu Ala Thr Leu Lys Asn Cys
 85 90 95

Pro Phe Thr Arg Ser Asp Gly Leu Asp Thr Met Glu Ile Trp Gly Gly
 100 105 110

Ile Val Glu Glu Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val Val Thr Leu Asp Arg
 115 120 125

Leu Arg Lys Ser Leu Lys Asn Ile Glu Lys Gln Leu Asp His Ile Gln
 130 135 140

Gly
 145

<210> 19

<211> 166

<212> PRT

<213> Ornithorhynchus anatinus

<400> 19

Met Arg Cys Ile Leu Leu Tyr Gly Phe Leu Cys Val Trp Gln His Leu
 1 5 10 15

Tyr Tyr Ser His Pro Ile Ser Ile Glu Lys Ile Gln Ala Asp Thr Lys
 20 25 30

Thr Leu Thr Lys Thr Ile Ile Thr Arg Ile Ile Gln Leu Ser Thr Gln
 35 40 45

Asn Gly Val Ser Thr Asp Gln Arg Val Ser Gly Leu Asp Phe Ile Pro
 50 55 60

Gly Asn Gln Gln Phe Gln Asn Leu Ala Asp Met Asp Gln Thr Leu Ala
 65 70 75 80

Val Tyr Gln Gln Ile Leu Ser Ser Leu Pro Met Pro Asp Arg Thr Gln
 85 90 95

Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Ser Leu Phe Ala Leu Leu Ala
 100 105 110

Thr Leu Lys Asn Cys Pro Phe Thr Arg Ser Asp Gly Leu Asp Thr Met
 115 120 125

Glu Ile Trp Gly Gly Ile Val Glu Glu Ser Leu Tyr Ser Thr Glu Val
 130 135 140

Val Thr Leu Asp Arg Leu Arg Lys Ser Leu Lys Asn Ile Glu Lys Gln
 145 150 155 160

Leu Asp His Ile Gln Gly
165

<210> 20
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95

His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 21
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Ala Gln Ser Val Ser Ser
20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 22
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Ser Val Ser Ser Lys
 20 25 30
 Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
 35 40 45
 Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His
 85 90 95

Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
100 105 110

Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 23
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Ala Ser Val Ser Ser Lys
20 25 30

Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
35 40 45

Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60

Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
65 70 75 80

Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His
85 90 95

Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
100 105 110

Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 24

<211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Cys
 145

<210> 25
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Gly Cys
 145
 <210> 26
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg

115	120	125
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro		
130	135	140
Gly Cys		
145		
<210> 27		
<211> 146		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 27		
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys		
1	5	10
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Ala Ser Val Ser Ser		
	20	25
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile		
	35	40
Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile		
	50	55
Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu		
	65	70
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys		
	85	90
His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly		
	100	105
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg		
	115	120
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro		
130	135	140
Gly Cys		
145		
<210> 28		
<211> 145		
<212> PRT		
<213> Unknown		
<220>		

<223> Description of Unknown: Seal leptin polypeptide

<400> 28

Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
 20 25 30
 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
 85 90 95
 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
 100 105 110
 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140
 Cys
 145

<210> 29

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 29

Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
 20 25 30
 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45

Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Pro
 85 90 95
 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
 100 105 110
 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140

Cys
 145

<210> 30
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

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

Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 31
<211> 146
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Description of Unknown: Seal leptin polypeptide

<400> 31
Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
20 25 30

Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
35 40 45

Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65 70 75 80

Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys

145

<210> 32
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 32
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
 100 105 110
 Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 33
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 33

Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
 100 105 110
 Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 34
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 34
 Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

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

Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe
305 310 315 320

Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp
325 330 335

Ser Leu Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val
340 345 350

Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu
355 360 365

Asp Leu Ser Pro Gly Cys
370

<210> 35
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 35
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser

130 135 140

Pro Gly Cys
145

<210> 36
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 36
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30
Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45
Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Cys Asn Asp
65 70 75 80
Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95
Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110
Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125
Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

<210> 37
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 37

```

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1      5      10
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20     25     30
Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Glu Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35     40     45
Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50     55     60
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65     70     75     80
Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85     90     95
Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly
100    105    110
Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115    120    125
Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
130    135    140
Pro Gly Cys
145

```

<210> 38

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 38

```

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

```

```

          35          40          45
Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50          55          60
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65          70          75          80
Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
          85          90          95
Cys Ser Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly
          100          105          110
Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
          115          120          125
Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
          130          135          140
Pro Glu Cys
145
<210> 39
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide
<400> 39
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1          5          10          15
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
          20          25          30
Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
          35          40          45
Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
          50          55          60
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
          65          70          75          80
Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
          85          90          95

```

Cys Ser Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Glu Cys
145

<210> 40
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 40
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys Ser Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Glu Cys
145

<210> 41
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 41
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15
Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30
Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45
Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60
Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80
Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95
Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110
Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125
Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Glu Cys
145

<210> 42
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 42

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95Cys Ser Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140Pro Glu Cys
145

<210> 43

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 43

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
130 135 140

Pro Glu Cys
145

<210> 44

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 44

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Glu Cys
 145
 <210> 45
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 45
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys Ser Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Glu Ser Leu Gly
 100 105 110
 Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Glu Cys

145

<210> 46
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 46
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Glu Cys
 145

<210> 47
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 47

Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95

Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110

Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
 130 135 140

Pro Glu Cys
 145

<210> 48
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 48
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln

50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu Gln Gln Leu Asp Val Ser
 130 135 140
 Pro Glu Cys
 145
 <210> 49
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 49
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys Ser Leu Pro Gln Thr Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110

Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Glu Cys
145

<210> 50
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 50
Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
20 25 30

Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
35 40 45

Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
50 55 60

Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
65 70 75 80

Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
100 105 110

Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
130 135 140

Pro Gly Cys
145

<210> 51
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 51
 Met Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser
 20 25 30
 Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro
 35 40 45
 Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp
 65 70 75 80
 Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser
 85 90 95
 Cys His Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly
 100 105 110
 Glu Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Gln Gln Leu Asp Leu Ser
 130 135 140
 Pro Glu Cys
 145

<210> 52
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 52
 Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15

Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
 20 25 30
 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
 85 90 95
 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
 100 105 110
 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140
 Cys
 145

<210> 53

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 53

Met Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
 20 25 30

Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45

Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65 70 75 80

Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 54

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic polypeptide

<400> 54

Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1 5 10 15

Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
20 25 30

Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
35 40 45

Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
65 70 75 80

Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
85 90 95

Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 55
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 55
Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
20 25 30

Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
35 40 45

Arg Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65 70 75 80

Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 56

<211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 56
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15

 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
 20 25 30

 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45

 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60

 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80

 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
 85 90 95

 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
 100 105 110

 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125

 Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Asn Pro Gly
 130 135 140

 Cys
 145

 <210> 57
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 57
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
 100 105 110
 Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Asn Pro
 130 135 140

Gly Cys
145

<210> 58
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 58
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser Lys
 20 25 30
 Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala

```

65              70              75              80
Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
      85              90              95
Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
      100             105             110
Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
      115             120             125
Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
      130             135             140

Cys
145

<210> 59
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 59
Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1      5      10      15
Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
      20      25      30
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
      35      40      45
Leu Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
      50      55      60
Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65      70      75      80
Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
      85      90      95
Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
      100     105     110
Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
      115     120     125

```

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140

Gly Cys
 145

<210> 60
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 60
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15

Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
 20 25 30

Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45

Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80

Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys His
 85 90 95

Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
 100 105 110

Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140

Cys
 145

<210> 61
 <211> 146
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 61

Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
20 25 30

Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
35 40 45

Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65 70 75 80

Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95

His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 62

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 62

Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1 5 10 15

Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
20 25 30

Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Pro
 85 90 95
 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
 100 105 110
 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140

Cys
 145

<210> 63
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 63
 Met Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 64

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 64

Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1 5 10 15

Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser Lys
20 25 30

Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
35 40 45

Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
65 70 75 80

Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Pro
85 90 95

Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140

Cys
 145

<210> 65
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 65
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45

Leu Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
 100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140

Gly Cys
 145

<210> 66
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 66
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser Arg
 20 25 30
 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His
 85 90 95
 Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
 100 105 110
 Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140
 Cys
 145
 <210> 67
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 67
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Cys Ser
 20 25 30

Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 68
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 68
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser Lys
 20 25 30
 Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro

85 90 95

Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 69
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 69
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65 70 75 80

Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 70
<211> 145
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 70
Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1 5 10 15
Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser Lys
20 25 30
Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
35 40 45
Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60
Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
65 70 75 80
Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys His
85 90 95
Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
100 105 110
Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125
Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 71
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 71
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
 85 90 95
 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 72
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 72
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser Lys
 20 25 30
 Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu
 35 40 45

Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
65 70 75 80

Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His
85 90 95

Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
100 105 110

Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 73

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 73

Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser
20 25 30

Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95

His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
100 105 110

Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 74

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 74

Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1 5 10 15

Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser Arg
20 25 30

Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
35 40 45

Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
65 70 75 80

Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
85 90 95

Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 75
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 75
Met Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
20 25 30
Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
35 40 45
Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
50 55 60
Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
65 70 75 80
Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
85 90 95
Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110
Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125
Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 76
<211> 145
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 76
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser Arg
 20 25 30
 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
 85 90 95
 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
 100 105 110
 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140
 Cys
 145

<210> 77
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 77
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45

Arg Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
 100 105 110
 Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 78
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 78
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser Arg
 20 25 30
 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45
 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60
 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80
 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys Pro
 85 90 95
 Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val

100 105 110
 Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125
 Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Asn Pro Gly
 130 135 140
 Cys
 145
 <210> 79
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 79
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
 85 90 95
 Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
 100 105 110
 Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 80
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 80
 Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
 1 5 10 15

 Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser Arg
 20 25 30

 Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
 35 40 45

 Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
 50 55 60

 Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu Ala
 65 70 75 80

 Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys His
 85 90 95

 Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
 100 105 110

 Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
 115 120 125

 Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
 130 135 140

 Cys
 145

<210> 81
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 81
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr

```

1             5             10             15
Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
      20      25      30
Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
      35      40      45
Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
      50      55      60
Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val Gln Ile Ala Asn Asp Leu
      65      70      75      80
Ala Asn Leu Arg Ala Leu Leu Arg Leu Leu Ala Ser Ala Lys Ser Cys
      85      90      95
His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
      100      105      110
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
      115      120      125
Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
      130      135      140

Gly Cys
145

<210> 82
<211> 145
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
      polypeptide

<400> 82
Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1             5             10             15
Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser Arg
      20      25      30
Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
      35      40      45
Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
      50      55      60

```

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
65 70 75 80

Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys Pro
85 90 95

Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn Val
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 83
<211> 146
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 83
Met Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
1 5 10 15

Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
20 25 30

Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
35 40 45

Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
50 55 60

Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
65 70 75 80

Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
85 90 95

Pro Val Pro Arg Ala Arg Gly Ser Asp Thr Ile Lys Gly Leu Gly Asn
100 105 110

Val Leu Arg Ala Ser Val His Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
115 120 125

Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
130 135 140

Gly Cys
145

<210> 84
<211> 145
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 84
Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile
1 5 10 15

Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser Arg
20 25 30

Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val Arg
35 40 45

Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile Leu
50 55 60

Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu
65 70 75 80

Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His
85 90 95

Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly Val
100 105 110

Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg Leu
115 120 125

Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro Gly
130 135 140

Cys
145

<210> 85
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 85
 Met Pro Ile Gln Arg Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr
 1 5 10 15
 Ile Ile Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser Pro Pro Gln Gly Val Ser Ser
 20 25 30
 Arg Pro Arg Val Ala Gly Leu Asp Phe Ile Pro Arg Val Gln Ser Val
 35 40 45
 Arg Thr Leu Ser Gly Met Asp Gln Ile Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Ile
 50 55 60
 Leu Thr Ser Leu Gln Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys
 85 90 95
 His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly
 100 105 110
 Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg
 115 120 125
 Leu Lys Ala Ala Leu Gln Asp Met Leu Arg Gln Leu Asp Arg Asn Pro
 130 135 140
 Gly Cys
 145

<210> 86
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 86
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 87
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 88
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 88
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 89
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

<210> 90
<211> 32
<212> PRT
<213> Oncorhynchus sp.

<400> 90
 Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
 1 5 10 15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
 20 25 30

<210> 91
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 91
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu
 1 5 10 15

His Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr
 20 25 30

<210> 92
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> N-term hydrogen, N-term capping group or a linker to a duration enhancing moiety

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> May or may not be present

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> Lys, Cys or Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Lys, Cys or Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Lys, Cys or Pro

<220>

```

<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Lys, Cys or Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Lys, Cys or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(29)
<223> Lys, Cys or Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> Lys, Cys or Asn

<220>
<223> C-term substituted or unsubstituted amino, substituted
or unsubstituted alkylamino, substituted or unsubstituted
dialkylamino, substituted or unsubstituted cycloalkylamino,
substituted or unsubstituted arylamino, substituted or

<220>
<223> cont. from above; unsubstituted aralkylamino, substituted
or unsubstituted alkylloxy, substituted or unsubstituted
arylloxy, substituted or unsubstituted aralkylloxy, or
hydroxyl

<400> 92
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1      5      10     15

Val His Ser Ser Xaa Asn Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Val
      20     25     30

Gly Ser Asn Thr Tyr
      35

<210> 93
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220>
<223> C-term NH2

<400> 93
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1      5      10     15

Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly

```

20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 94
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
<223> C-term NH2

<400> 94
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Lys Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 95
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
<223> C-term NH2

<400> 95
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

Arg Ser Ser Lys Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 96
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 96
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 97
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 97
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 98
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 98
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Lys Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 99
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 99
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Lys Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 100
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 100
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 101
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 101
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 102
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 102
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Lys Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 103
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> C-term NH2
 <400> 103
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15
 His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30
 Ser Asn Thr Tyr
 35
 <210> 104
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <220>
 <223> C-term NH2
 <400> 104
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15
 His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Lys Val Gly
 20 25 30
 Ser Asn Thr Tyr
 35
 <210> 105
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <220>
 <223> C-term NH2
 <400> 105
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15
 His Ser Ser Asn Asn Phe Lys Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 106
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
<223> C-term NH2

<400> 106
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Lys Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 107
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
<223> C-term NH2

<400> 107
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Lys Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 108
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<223> C-term NH2

<400> 108

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Lys Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 109

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<223> C-term NH2

<400> 109

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Lys Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 110

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<223> C-term NH2

<400> 110

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 111
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 111
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 112
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 112
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 113
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 113

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 114
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 114
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 115
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 115
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 116
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 116
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 117
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 117
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 118
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 118
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 119
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 119
 Lys Asp Asn Thr Ala Thr Lys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Pro Ser Thr Asn Val
 20 25 30

 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

 <210> 120
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 120
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

 His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly
 20 25 30

 Ser Asn Thr Tyr
 35

 <210> 121
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

 <400> 121
 Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
 20 25 30

 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

 <210> 122

```

<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polypeptide

<400> 122
Lys Ala Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1          5          10
Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
          20          25          30
Gly Ser Asn Thr Tyr
          35

<210> 123
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polypeptide

<400> 123
Lys Ala Asn Thr Ala Thr Ala Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1          5          10          15
Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
          20          25          30
Gly Ser Asn Thr Tyr
          35

<210> 124
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polypeptide

<400> 124
Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1          5          10          15
Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
          20          25          30
Gly Ser Asn Thr Tyr
          35

```

<210> 125
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 125
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 126
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 126
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 127
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 127
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15
 His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 128
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 128
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 129
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 129
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 130
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 130
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Ser Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 131
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 131
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Ser Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 132
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 132
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 133
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 133
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu

1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Ile Leu Pro Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 134
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 134
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Ile His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 135
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 135
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Ile His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 136
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 136
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Ile
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 137
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 137
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ile Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 138
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 138
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ile Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Ala Val Leu Ser Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 139
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 139
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Ile Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35
 <210> 140
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 140
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser His Asn Leu Gly Ala Ala Leu Leu Pro Thr Asp Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35
 <210> 141
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 141
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser His Asn Leu Gly Ala Ala Leu Ser Pro Thr Asp Val
 20 25 30
 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35
 <210> 142
 <211> 36

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 142
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu Val
1      5      10      15

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

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 143
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 143
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu
1      5      10      15

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

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 144
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<400> 144
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu
1      5      10      15

Val Arg Ser Ser His Asn Leu Gly Ala Ile Leu Pro Pro Thr Asp Val
20      25      30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

```

<210> 145
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 145
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Thr Asn Phe Leu
 1 5 10 15

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

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 146
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <223> N-term mPEG40KD

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 146
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 147
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<223> N-term mPEG40KD

<220>

<223> C-term NH2

<400> 147

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 148

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 148

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Lys Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 149

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 149

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Lys Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 150

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 150

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 151

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 151
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 152
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Lys(mPEG40KD)

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 152
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Lys Val
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 153
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 153

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1 5 10 15

Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Val Leu Pro Pro Thr Lys Val Gly
20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 154

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Lys(Y-shaped-mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 154

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val Arg Ser Ser Asn Asn Leu Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 155

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 155

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Lys Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 156

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 156

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 157

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Lys(mPEG40KD)

<220>

<223> C-term NH2

<400> 157
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Lys Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 158
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Lys(Y-shaped-mPEG40KD)

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 158
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Lys Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 159
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Lys(mPEG40KD)

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 159

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Lys Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 160
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Lys(mPEG40KD)

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 160
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Lys Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val Gly
 20 25 30

Ser Asn Thr Tyr
 35

<210> 161
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Lys(mPEG40KD)

<220>
 <223> C-term NH2

<400> 161
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val

```

1             5             10             15
His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Lys Pro Pro Thr Asn Val Gly
20             25             30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 162
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (27)..(27)
<223> Lys(mPEG40KD)

<220>
<223> C-term NH2

<400> 162
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1             5             10             15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Lys Pro Thr Asn Val Gly
20             25             30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 163
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> Lys(mPEG40KD)

<220>
<223> C-term NH2

<400> 163
Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val
1             5             10             15

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Lys Thr Asn Val Gly
20             25             30

Ser Asn Thr Tyr
35

<210> 164
<211> 6
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> Description of Unknown: Leptin conserved motif
      peptide

<400> 164
Gly Leu Asp Phe Ile Pro
1             5

```

10. Химерный полипептид по любому из пп.1-9, где последовательность зрелого лептина человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44.

SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85.

21. Химерный полипептид по любому из пп.1-20, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33.

22. Химерный полипептид по любому из пп.1-21, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

23. Химерный полипептид по любому из пп.1-21, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30.

24. Химерный полипептид по любому из пп.1-21, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

25. Химерный полипептид по любому из пп.1-21, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

26. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение химерного полипептида по любому из пп.1-25 нуждающемуся в этом субъекту в количестве, эффективном для лечения указанного заболевания или нарушения.

27. Способ по п.26, где заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из липодистрофии, дислипидемии, гиперлипидемии, избыточной массы тела, ожирения, гипоталамической аменореи, болезни Альцгеймера, лептиновой недостаточности, жировой дистрофии печени, сахарного диабета (включая I тип и II тип), неалкогольного стеатогепатита (NASH), заболевания неалкогольного ожирения печени (NAFLD), метаболического синдрома X и болезни Хантингтона.

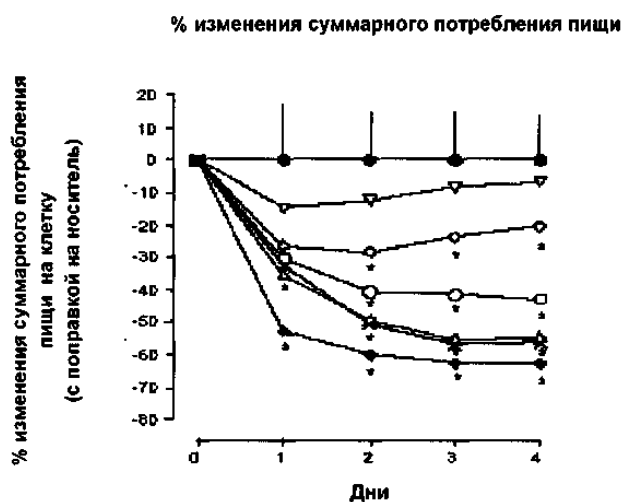
28. Способ по п.26 или 27, где заболевание или нарушение представляет собой липодистрофию, дислипидемию, гиперлипидемию, избыточную массу тела, ожирение, гипоталамическую аменорею, болезнь Альцгеймера, лептиновую недостаточность, жировую дистрофию печени или сахарный диабет.

29. Способ по любому из пп.26-28, где заболевание или нарушение представляет собой сахарный диабет I типа или сахарный диабет II типа.

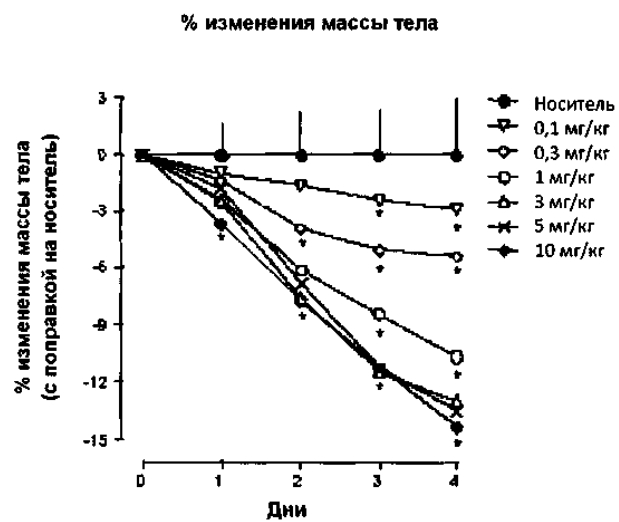
30. Способ по любому из пп.26-28, где заболевание или нарушение представляет собой ожирение.

31. Способ по любому из пп.26-28, где заболевание или нарушение представляет собой липодистрофию или лептиновую недостаточность.

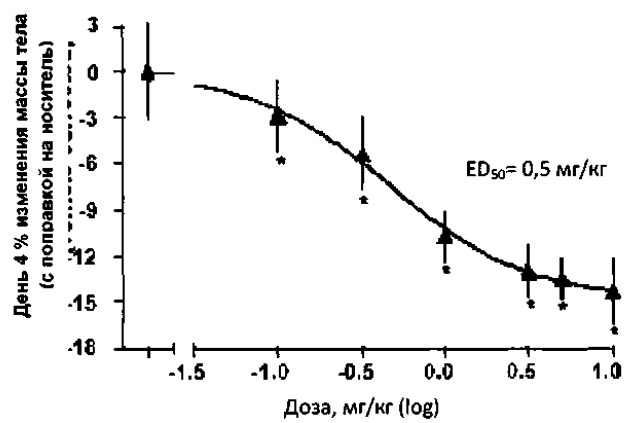
32. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный полипептид по любому из пп.1-25 и фармацевтически приемлемый наполнитель.



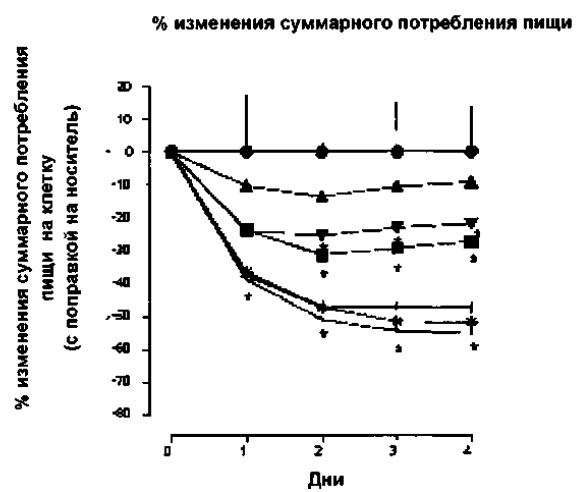
Фиг. 1А



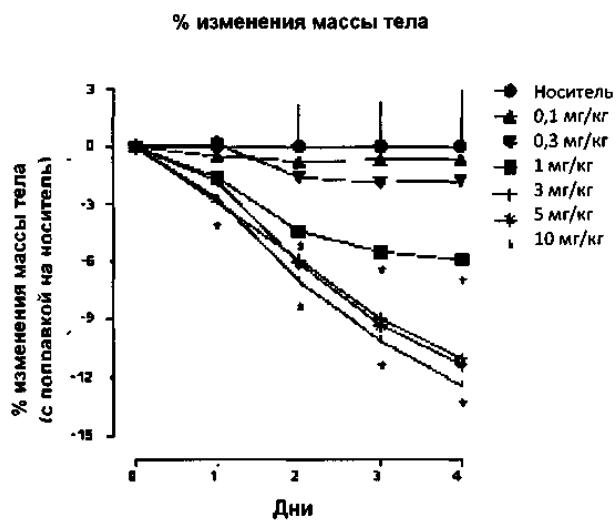
Фиг. 1В



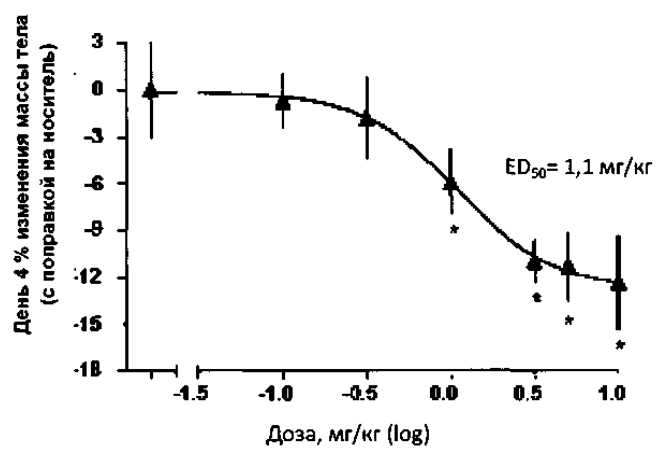
Фиг. 1С



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С

