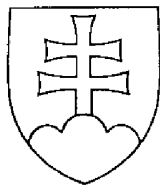


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288342

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2016.01):

C07K 14/00

C07K 16/00

C07K 19/00

A61K 38/00

A61P 3/00

- (21) Číslo prihlášky: **670-2003**
(22) Dátum podania prihlášky: **29. 11. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/251 954**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **7. 12. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 8. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2004**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **17. 2. 2016**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US01/43165**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/46227**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;**

(72) Pôvodca: **Glaesner Wolfgang, Indianapolis, IN, US;**
Micanovic Radmilla, Indianapolis, IN, US;
Tschang Sheng-Hung Rainbow, Carmel, IN, US;

(74) Zástupca: **Hörmannová Zuzana, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **GLP-1 fúzne proteíny**

(57) Anotácia:
Vynález sa týka analógov, derivátov a fragmentov GLP-1, fúzovaných na polypeptidy, ktoré spôsobujú predĺženie polčasu životnosti peptidov *in vivo*. Takýmito polypeptidmi sú Fc časť imunoglobulínu, jej analóg alebo fragment. Fúzne proteíny môžu byť použité na liečenie diabetes mellitus nezávislého od inzulínu alebo obezity.

SK 288342 B6

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka peptidov, podobných glukagónu, vrátane analógov a ich derivátov, fúzaných na proteíny, ktoré umožňujú predĺžiť polčas životaschopnosti peptidov *in vivo*. Tieto fúzne proteíny sa dajú

5 použiť na liečenie diabetes mellitus, ktorý nie je závislý od inzulínu, rovnako ako iných ochorení.

Doterajší stav techniky

Peptid 1 podobný glukagónu (ďalej GLP podľa anglického názvu Glucagon-Like Peptide) (GLP-1) obsahuje 37 aminokyselín a je vylučovaný L-bunkami čreva odozvou na príjem potravy. Bolo zistené, že stimuluje vylučovanie inzulínu (inzulinotropné účinky), čím spôsobuje spotrebovávanie glukózy bunkami a znižuje koncentráciu glukózy v krvnom sére (pozri napr. Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research, 40: 333 – 343 (1992)). Ale, GLP-1 je málo aktívny. Následné endogénne štiepenie medzi šiestym a siedmym miestom spôsobuje vznik účinnejšieho biologicky aktívneho GLP-1(7-37)OH peptidu. Je známe veľké množstvo typov analógov a derivátov GLP-1 a sú tu citované ako zlúčeniny GLP-1. Medzi tieto GLP-1 analógy patria exendíny, čo sú peptidy, ktoré sa nachádzajú v jede kôrovca podozrivého (jedovatá jašterica z juhozápadu USA). Exendíny majú sekvenčnú homológiu s prírodným GLP-1 a môžu sa viazať s receptorom GLP-1 iniciovať signálnu prevádzku kaskádu zodpovednú za rad dejov pripisovaných GLP-1(7-37)OH.

Zlúčeniny GLP-1 majú súvislosť s radom fyziologicky významných dejov. Napríklad sa zistilo, že GLP-1 stimuluje uvoľňovanie inzulínu, znižuje vylučovanie glukagónu, inhibuje vyprázdňovanie žalúdka a zvyšuje využívanie glukózy (Nauck, M. A. a kol. (1993) Diabetológia 36: 741 – 744, Gutniak, M. a kol. (1992) New England J. of Med. 326: 1316 – 1322, Nauck, M. A. a kol. (1993) J. Clin Invest. 91: 301 – 307).

GLP-1 je najslubnejší pri liečení diabetes mellitus, ktorý nie je závislý od inzulínu (NIDDM). Na trhu je rad orálnych liečiv na liečenie rezistencie proti inzulínu, spojenej s NIDDM. S postupom času však musí pacient prejsť na liečbu, ktorá stimuluje uvoľňovanie inzulínu a prípadne i na liečbu, ktorá vyžaduje injekčné podávanie inzulínu. Súčasné účinné látky, ktoré stimulujú uvoľňovanie inzulínu, však môžu spôsobovať hypoglykémiu rovnako, ako ju spôsobuje podávanie inzulínu. Účinnosť GLP-1 je však regulovaná hladinou glukózy v krvi. Keď hladina klesne na určitú prahovú úroveň, GLP-1 nie je účinný. Z tohto dôvodu s liečbou pomocou GLP-1 nie je spojené žiadne riziko hypoglykémie.

Ale účinnosť terapie pomocou GLP-1 peptidov je obmedzená ich rýchlym vylúčením a krátkym polčasom životnosti. Napríklad GLP-1 (7-36) má sérový polčas rozpadu iba 3 až 5 minút. Keď je GLP-1(7-37) amid podávaný subkutánne, má čas účinnosti okolo 50 minút. Dokonca analógy a deriváty, ktoré sú odolné proti endogénnemu štiepeniu proteázou, nemajú polčas životnosti tak dlhý, aby nebolo nutné opakovať podávanie v priebehu 24 hodín. Rýchle odstránenie terapeutického činidla je pre pacienta nepohodlné v prípadoch, kedy je žiaduce udržiavať v krvi vysokú hladinu účinnej látky v predĺženom časovom intervale, pokiaľ nie je podanie účinnej látky nutné zopakovať. Ďalej, dlhodobá účinná zlúčenina je hlavne dôležitá pre diabetických pacientov, ktorých liečebný režim vyžaduje iba podávanie orálnych liečiv. Títo pacienti sa veľmi ťažko prispôbujú režimu, ktorý vyžaduje viacnásobné podávania injekcií alebo liečiv.

Podstata vynálezu

Tento vynález prekonáva problémy spojené s podávaním zlúčeniny, ktorá má krátky plazmový polčas životnosti. Zlúčeniny podľa vynálezu zahŕňujú GLP-1 zlúčeniny fúzané na iné proteíny s dlhým polčasom obehu, ako je Fc podiel imunoglobulínu alebo albumínu.

Všeobecne sa s malými terapeutickými peptidmi zle manipuluje lebo i drobné zmeny v ich štruktúre môžu ovplyvniť ich stabilitu a/alebo biologickú aktivitu. To obzvlášť platí pre GLP-1 zlúčeniny, ktoré sú práve vo vývoji. Napríklad GLP-1(7-37)OH má tendenciu k zmene konformácie z primárne α -helixovej štruktúry na primárne beta-vrstvenú štruktúru. Z tejto beta-vrstvenej formy vzniká agregovaný materiál, o ktorom sa predpokladá, že je neaktívny. Je preto prekvapujúce, že bolo možné vyvinúť biologicky aktívne GLP-1 fúzne proteíny s predĺženým polčasom. Bolo to zvlášť neočakávané, ak uvažujeme už len samotnú obtiažnosť práce s GLP-1(7-37)OH a relatívne veľké rozmery fúzovanej časti k malému pripojenému peptidu GLP-1.

Medzi ďalšie zlúčeniny podľa vynálezu patrí heterológny fúzny proteín, v ktorom je prvý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde prvý polypeptid je GLP-1 zlúčenina a druhý polypeptid je zvolený zo skupiny, do ktorej patrí

- a) Fc podiel imunoglobulínu,
- b) analóg Fc podielu imunoglobulínu,
- c) fragmenty Fc podielu imunoglobulínu,

a kde C-zakončenie prvého polypeptidu je fúzané k N-zakončeniu druhého polypeptidu. GLP-1 zlúčenina

môže byť fúzovaná k druhému polypeptidu cez peptidový linker. Je výhodné, aby bol peptidový linker zvolený zo skupiny pozostávajúcej z

- a) peptidu bohatého na glycín,
- b) peptidu majúceho sekvenciu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, kde n je 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6, a
- c) peptidu majúceho sekvenciu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.

Je obvykle vhodné, aby GLP-1 zlúčenina, ktorá je časťou heterológneho fúzneho proteínu, nemala viac ako šesť aminokyselín, líšiacich sa od zodpovedajúcich aminokyselín v zlúčeninách GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendín-4. Je dokonca ešte výhodnejšie, aby GLP-1 zlúčenina nemala viac ako 5 aminokyselín, líšiacich sa od zodpovedajúcich aminokyselín v zlúčeninách GLP-1 (7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendín-4. Najvýhodnejšie je, aby GLP-1 zlúčenina nemala viac než 4, 3 alebo 2 aminokyseliny, líšiace sa od zodpovedajúcich aminokyselín v zlúčeninách GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendín-4. Výhodne má GLP-1 zlúčenina, ktorá je časťou heterológneho fúzneho proteínu, glycín alebo valín v pozícii 8.

Tento vynález tiež zahŕňa polynukleotidy kódujúce opísané heterológne fúzne peptidy, vektory zahŕňajúce tieto polynukleotidy a hostiteľské bunky transfektované alebo transformované opísanými vektormi. Tiež je tu zahrnutý spôsob výroby heterológneho fúzneho proteínu, pri ktorom sa uskutočňujú kroky transkripcie a translácie tu opísaného nukleotidu za podmienok, v ktorých sa heterológny fúzny proteín exprimuje v detekovateľnom množstve.

Tento vynález tiež zahŕňa spôsob na normalizáciu hladiny krvnej glukózy u cicavcov, ktorí to potrebujú, pri ktorom sa podáva terapeuticky účinné množstvo opísaného heterológneho fúzneho proteínu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Vynález bude bližšie vysvetlený prostredníctvom konkrétnych príkladov uskutočnenia znázornených na výkresoch, na ktorých predstavuje:

- Obrázok 1: Sekvenciu aminokyseliny IgG1 Fc zahrňujúcu ohybovú oblasť, CH₂, CH₃ domény;
- Obrázok 2: Sekvenciu aminokyseliny albumínu ľudského séra;
- Obrázok 3: A. SDS-PAGE gél a imunoblot rovnakého gélu, ktoré ilustrujú molekulárnu hmotnosť fúzných proteínov IgG1-Fc a GLP-1-Fc (pás 1, MW štandardy, pás 2, čistený Fc, pás 3, transfektované prostredie Mock, pás 4, Val⁸-GLP-1-Fc, pás 5, Exendín-4-Fc), B. SDS-PAGE gél a imunoblot rovnakého gélu, ktoré ilustrujú molekulárnu hmotnosť fúzných proteínov ľudského HSA a GLP-1-HSA (pás 1, MW štandardy, pás 2, čistený HSA, pás 3, transfektované prostredie Mock, pás 4, Val⁸-GLP-1-HSA, pás 5, Val⁸-GLP-1-[Gly-Gly-Gly-Ser]₃-HSA);
- Obrázok 4: SDS-PAGE gél čisteného Fc, albumínu, a GLP-1 fúzne proteíny (Pás 1, MW štandardy, pás 2, čistený Fc, pás 3, Val⁸-GLP-1-Fc, pás 4, Exendín-4-Fc, pás 5, MW štandard, pás 6, Val⁸-GLP-1-HSA, pás 7, Exendín-4-HSA, pás 8, Exendín-4-[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃-HSA);
- Obrázok 5: Expresný klonujúci vektor obsahujúci Fc oblasti znázornené na obrázku 1;
- Obrázok 6: Expresný klonujúci vektor obsahujúci albumín sekvenciu znázornenú na obrázku 2;
- Obrázok 7: Expresný klonujúci vektor obsahujúci DNA, v ktorej je zakódovaný 15 aminokyselinový linker fúzovaný v rámci a 5' albumínové sekvencie znázornené na obrázku 2;
- Obrázok 8: Aktivitu GLP-1 fúzných proteínov na dávku *in vitro*;
- Obrázok 9: Farmakokinetiku GLP-1 Fc a HSA fúzných proteínov;
- Obrázok 10: Glukodynamickú odozvu Exendín-Fc u dvoch normálnych hladujúcich psov;
- Obrázok 11: Inzulínotropnú odozvu na Exendín-Fc u dvoch normálnych hladujúcich psov;
- Obrázok 12: DNA sekvenciu zahrňujúcu ľudskú IgG1 Fc oblasť;
- Obrázok 13: DNA sekvenciu zahrňujúcu proteín ľudského albumínu.

Podrobný opis vynálezu

Heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu zahrňujú GLP-1 zlúčeninu fúzovanú na ľudský albumín, analóg ľudského albumínu, fragment ľudského albumínu, Fc časť imunoglobulínu, analóg Fc časti imunoglobulínu alebo fragment Fc časti imunoglobulínu. C-zakončenie zlúčeniny GLP-1 môže byť fúzovaný priamo alebo fúzovaný cez peptidový linker, N-zakončenie albumínu alebo Fc proteín. Tieto heterológne fúzne proteíny sú biologicky aktívne a majú predĺžený polčas životnosti v porovnaní s natívnym GLP-1.

Je výhodné, keď GLP-1 zlúčeniny, ktoré tvoria časť heterológneho fúzneho proteínu, zahrňujú polypeptidy, ktoré majú od dvadsaťpäť do asi tridsaťdeväť prírodne sa vyskytujúcich alebo neprírodne sa vyskytujúcich aminokyselín, ktoré majú dostatočnú homológiu k natívnemu GLP-1(7-37)OH tak, aby prejavovali inzulínotropnú aktivitu naviazaním na GLP-1 receptor na β-bunkách pankreasu. GLP-1 zlúčenina obvykle zahŕňa polypeptid majúci aminokyselinovú sekvenciu GLP-1(7-37)OH, analóg GLP-1(7-37)OH, fragment GLP-1(7-37)OH alebo fragment analógu GLP-1(7-37)OH. GLP-1(7-37)OH má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 1:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
 8 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-
 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

(SEQ ID NO: 1)

Ako je v odbore zvykom, bolo amino zakončenie GLP-1(7-37)OH označené číslom 7 a karboxylové zakončenie číslom 37. Ďalšie aminokyseliny v polypeptide sú číslované postupne, ako je ukázané v SEQ ID NO: 1. Napríklad pozícia 12 je fenyľalanín a pozícia 22 je glycín.

5 GLP-1 zlúčeniny tiež zahrňujú GLP-1 fragmenty. Tento GLP-1 fragment je polypeptid získaný odstránením jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín z N-zakončenia a/alebo C-zakončenia GLP-1(7-37)OH alebo ich analógu alebo derivátu. Nomenklatúra použitá na opis GLP-1(7-37)OH je rovnako použiteľná pre GLP-1 fragmenty. Napríklad GLP-1(9-36)OH označuje GLP-1 fragment získaný odstránením dvoch aminokyselín z N-zakončenia a jednej aminokyseliny z C-zakončenia. Aminokyseliny vo fragmente sú označené rovnakým číslom ako zodpovedajúce aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH. Napríklad N-zakončenie glutámovej kyseliny kyselina v GLP-1(9-36)OH je v pozícii 9, pozícia 12 je obsadená fenyľalanínom, a pozícia 22 je obsadená glycínom, ako v GLP-1(7-37)OH. Pre GLP-1(7-36)OH je glycín v pozícii 37 na GLP-1(7-37)OH odstránený.

15 GLP-1 zlúčeniny rovnako zahrňujú polypeptidy, v ktorých je pridaná jedna aminokyselina alebo viac aminokyselín k N-zakončeniu a/alebo C-zakončeniu GLP-1(7-37)OH alebo jeho fragmenty alebo analógy. Je výhodné, keď GLP-1 zlúčeniny tohto typu majú až cca tridsaťdeväť aminokyselín. Aminokyseliny v rozšírenej GLP-1 zlúčenine sú priradované k rovnakým číslam ako zodpovedajúce aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH. Napríklad N-zakončenie aminokyseliny GLP-1 zlúčeniny získané pridaním dvoch aminokyselín k N-zakončeniu GLP-1(7-37)OH je v pozícii 5 a C-zakončenie aminokyseliny GLP-1 zlúčeniny získané pridaním jednej aminokyseliny k C-zakončeniu GLP-1(7-37)OH je v pozícii 38. V oboch týchto rozšírených GLP-1 zlúčeninách, ako je GLP-1(7-37)OH, je teda pozícia 12 obsadená fenyľalanínom a pozícia 22 je obsadená glycínom. Aminokyseliny 1-6 rozšírenej GLP-1 zlúčeniny sú výhodne rovnaké alebo dochádza ku konzervatívnej substitúcii aminokyseliny v zodpovedajúcej pozícii GLP-1(7-37)OH. Aminokyseliny 38-45 rozšírenej GLP-1 zlúčeniny sú výhodne rovnaké alebo dochádza ku konzervatívnej substitúcii aminokyseliny v zodpovedajúcej pozícii glukagónu alebo Exendínu-4.

25 GLP-1 zlúčeniny podľa vynálezu zahrňujú GLP-1 analógy. GLP-1 analóg má dostatočnú homológiu s GLP-1(7-37)OH alebo fragmentom GLP-1(7-37)OH, takže tento analóg má inzulínotropnú aktivitu. Výhodne má GLP-1 analóg sekvenciu aminokyseliny GLP-1(7-37)OH alebo jeho fragmentu, modifikovaného tak, že jedna, dve, tri, štyri alebo päť aminokyselín sa líši od aminokyselín v zodpovedajúcej pozícii GLP-1(7-37)OH alebo fragmentu GLP-1(7-37)OH. V názvosloví, ktoré je tu použité pre označenie GLP-1 zlúčenín, substituujúca aminokyselina a jej pozícia je určovaná pred hlavnou štruktúrou. Napríklad Glu²²-GLP-1(7-37)OH označuje GLP-1 zlúčeninu, v ktorej glycín, ktorý sa normálne nachádza v pozícii 22 zlúčeniny GLP-1(7-37)OH, bol nahradený kyselinou glutámovou, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH označuje GLP-1 zlúčeninu, v ktorej bol alanín, ktorý sa normálne nachádza v pozícii 8, resp. glycín, ktorý sa normálne nachádza v pozícii 22 na GLP-1(7-37)OH, boli zamenené valínom a kyselinou glutámovou.

35 GLP-1 zlúčeniny podľa vynálezu rovnako zahrňujú GLP-1 deriváty. GLP-1 derivát je definovaný ako molekula, ktorá má sekvenciu aminokyseliny GLP-1 alebo analógu GLP-1, ale navyše majú chemickú modifikáciu jednej vedľajšej skupiny alebo viacerých vedľajších skupín aminokyselín, α -uhlíkových atómov, koncovej aminoskupiny alebo koncovej skupiny karboxylovej kyseliny. Chemická modifikácia zahrňuje, ale nie výhradne, pridávanie chemických skupín, vytváranie nových väzieb a odstraňovanie chemických skupín. Modifikácia vedľajších skupín aminokyselín zahrňuje, bez obmedzenia, acyláciu ϵ -aminoskupín lyzínu, N-alkyláciu arginínu, histidínu alebo lyzínu, alkyláciu karboxylovej skupiny glutámovej alebo asparágovej kyseliny a deamidáciu glutamínu alebo asparagínu. Modifikácia koncovej aminoskupiny zahrňuje bez obmedzenia desamino, N-nižší alkyl, N-di-nižší alkyl a N-acyl modifikáciu. Modifikácia koncovej karboxylovej skupiny zahrňuje bez obmedzenia amid, nižší alkylamid, dialkylamid a nižší alkylester modifikáciu. Nižší alkyl je C₁-C₄ alkyl. Ďalej jedna vedľajšia skupina alebo viacej vedľajších skupín alebo koncových skupín môže byť chránená chrániacimi skupinami, ktoré sú známe odborníkom priemerne skúseným v odbore proteínovej chémie, α -uhlík aminokyseliny môže byť mono- alebo dimetylovaný.

Ktorákoľvek z GLP-1 zlúčenín môže byť časťou heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu, pretože GLP-1 zlúčenina sama o sebe je schopná sa naviazať a indukovať vznik signálu cez GLP-1 receptor. Väzba GLP-1 receptora a prenos signálu môže byť posúdený testami *in vitro*, ktoré sú opísané v patente EP 619 322 a US patente č. 5 120 712.

- 5 Rad účinných GLP-1 fragmentov, analógov a derivátov je v odbore známy a akýkoľvek z týchto analógov a derivátov môže byť rovnako časťou heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu. Vo vynáleze sú poskytnuté niektoré príklady nových GLP-1 analógov, rovnako ako GLP-1 analógov a derivátov známych v odbore.

- 10 Niektoré GLP-1 analógy a GLP-1 fragmenty známe v odbore zahrňujú napríklad GLP-1(7-34) a GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), Gln⁹-GLP-1(7-37), D-Gln⁹-GLP-1(7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1(7-37) a Lys¹⁸-GLP-1(7-37). GLP-1 analógy ako je GLP-1(7-34) a GLP-1(7-35) sú opísané v US patente č. 5 118 666. Rovnako sú známe biologicky spracované formy GLP-1, ktoré majú inzulínotropné vlastnosti, ako je GLP-1(7-36). Iné známe biologicky účinné GLP-1 zlúčeniny sú opísané v US patente č. 5 977 071, Hoffmann a kol., US patente č. 5 545 618, Buckley a kol., a Adelhorst, et. al., J. Biol. Chem. 269: 6275 (1994).

- 15 Výhodná skupina GLP-1 analógov je zostavená z GLP-1 analógov vzorca (I) (SEQ ID NO: 2)

```

7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Phe-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-

18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe-

29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39
Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-

40  41  42  43  44  45
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

```

Vzorec I (SEQ ID NO: 2)

kde:

- Xaa v pozícii 8 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 9 je Glu, Asp alebo Lys;
20 Xaa v pozícii 11 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp alebo Lys;
Xaa v pozícii 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr alebo Lys;
25 Xaa v pozícii 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln alebo Lys;
Xaa v pozícii 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr alebo Lys;
Xaa v pozícii 21 je Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp alebo Lys;
30 Xaa v pozícii 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 26 je Lys; Arg, Gln, Glu, Asp alebo His;
Xaa v pozícii 27 je Leu, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
35 Xaa v pozícii 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp alebo Lys;
Xaa v pozícii 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp alebo His;
Xaa v pozícii 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
40 Xaa v pozícii 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His;
Xaa v pozícii 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys, alebo je odstránená;
Xaa v pozícii 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His, alebo je odstránená;
Xaa v pozícii 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His, alebo je odstránená;
Xaa v pozícii 40 je Gly, Asp, Glu alebo Lys, alebo je odstránená;
45 Xaa v pozícii 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp alebo Lys, alebo je odstránená;

Xaa v pozícii 42 je Ser, Pro, Lys, Glu alebo Asp, alebo je odstránená;

Xaa v pozícii 43 je Ser, Pro, Glu, Asp alebo Lys, alebo je odstránená;

Xaa v pozícii 44 je Gly, Pro, Glu, Asp alebo Lys, alebo je odstránená;

Xaa v pozícii 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp alebo Lys, alebo je odstránená;

- 5 s podmienkou, že pokiaľ je aminokyselina v pozícii 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 alebo je 44 odstránená, potom sú odstránené aj všetky aminokyseliny po tejto aminokyseline nasledujúce.

Je výhodné, aby GLP-1 zlúčenina vzorca (I) obsahovala menej ako šesť aminokyselín, ktoré sa líšia od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH alebo Exendín-4. Je výhodnejšie, aby sa menej ako päť aminokyselín líšilo od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH alebo Exendín-4. Je ešte výhodnejšie, aby sa menej ako štyri aminokyseliny líšili od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH alebo Exendín-4.

- 10 GLP-1 zlúčeniny podľa vynálezu zahrňujú deriváty vzorca (I), ako je ich C-1-6-ester alebo amid, alebo C-1-6-alkylamid, alebo C-1-6-dialkylamid. Medzinárodná patentová publikácia WO 99/43 706 opisuje deriváty GLP-1 zlúčenín vzorca (I) a je tu celá zahrnutá ako odkaz. Zlúčeniny vzorca (I) odvodené, ako je opísané v medzinárodnej patentovej publikácii WO 99/43 706, a neodvodené sú tiež zahrnuté v tomto vynáleze.

15 Iná výhodná skupina GLP-1 zlúčenín je tvorená GLP-1 analógmi vzorca II (SEQ ID NO: 3):

```

7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser-

18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Xaa-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Phe-

29  30  31  32  33  34  35  36  37
Ile-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-R

```

Vzorec II (SEQ ID NO: 3),

kde:

- 20 Xaa v pozícii 7 je L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, 3-hydroxyhistidín, homohistidín, α -fluórmetylhistidín alebo α -metylhistidín;
- Xaa v pozícii 8 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;
- Xaa v pozícii 9 je Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu alebo His;
- Xaa v pozícii 11 je Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys alebo His;
- Xaa v pozícii 12 je His, Trp, Phe alebo Tyr;
- 25 Xaa v pozícii 16 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu alebo Ala;
- Xaa v pozícii 18 je His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala alebo Lys;
- Xaa v pozícii 22 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;
- Xaa v pozícii 23 je His, Asp, Lys, Glu, Gln alebo Arg;
- Xaa v pozícii 24 je Glu, Arg, Ala alebo Lys;
- 30 Xaa v pozícii 26 je Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu alebo His;
- Xaa v pozícii 27 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg alebo Lys;
- Xaa v pozícii 30 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;
- Xaa v pozícii 31 je Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp alebo Lys;
- Xaa v pozícii 33 je Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly alebo Glu;
- 35 Xaa v pozícii 34 je Glu, Lys alebo Asp;
- Xaa v pozícii 35 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His alebo Glu;
- Xaa v pozícii 36 je Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu alebo His;
- R v pozícii 37 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, alebo je odstránené.

Iná výhodná skupina GLP-1 zlúčenín je tvorená GLP-1 analógmi vzorca III (SEQ ID NO: 4):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Xaa-Xaa-Glu-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Xaa-Phe
 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-R

Vzorec III (SEQ ID NO: 4) ,

kde:

- Xaa v pozícii 7 je L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, β -hydroxyhistidín, homohistidín, α -fluórmetylhistidín alebo α -metylhistidín;
- 5 Xaa v pozícii 8 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;
- Xaa v pozícii 11 je Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys alebo His;
- Xaa v pozícii 12 je His, Trp, Phe alebo Tyr;
- Xaa v pozícii 16 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu alebo Ala;
- Xaa v pozícii 22 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Arg alebo Cys;
- 10 Xaa v pozícii 23 je His, Asp, Lys, Glu alebo Gln;
- Xaa v pozícii 24 je Glu, His, Ala alebo Lys;
- Xaa v pozícii 25 je Asp, Lys, Glu alebo His;
- Xaa v pozícii 27 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg alebo Lys;
- Xaa v pozícii 30 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;
- 15 Xaa v pozícii 33 je Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly alebo Glu;
- Xaa v pozícii 34 je Glu, Lys alebo Asp;
- Xaa v pozícii 35 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His alebo Glu;
- Xaa v pozícii 36 je Arg, Glu alebo His;
- R v pozícii 37 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, alebo je odstránený.
- 20 Iná výhodná skupina GLP-1 zlúčenín je tvorená GLP-1 analógmi vzorca (IV) (SEQ ID NO: 5):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Xaa-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe
 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa-Arg-R

Vzorec IV (SEQ ID NO: 5) ,

kde:

- Xaa v pozícii 7 je L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, β -hydroxyhistidín, homohistidín, α -fluórmetylhistidín alebo α -metylhistidín;
- 25 Xaa v pozícii 8 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met alebo Thr;
- Xaa v pozícii 12 je His, Trp, Phe alebo Tyr;
- Xaa v pozícii 16 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu alebo Ala;
- Xaa v pozícii 22 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;
- Xaa v pozícii 23 je His, Asp, Lys, Glu alebo Gln;
- 30 Xaa v pozícii 26 je Asp, Lys, Glu alebo His;
- Xaa v pozícii 30 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;
- Xaa v pozícii 35 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, alebo Glu;
- R v pozícii 37 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, alebo je odstránený.
- Iná výhodná skupina GLP-1 zlúčenín je tvorená GLP-1 analógmi vzorca (V) (SEQ ID NO: 6):

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Lys-Glu-Phe
 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Ile-Xaa-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

Vzorec V (SEQ ID NO: 6),

kde:

Xaa v pozícii 7 je L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, (3-hydroxyhistidín, homohistidín, α -fluórmetylhistidín alebo α -metylhistidín;

- 5 Xaa v pozícii 8 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;
 Xaa v pozícii 22 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;
 Xaa v pozícii 23 je His, Asp, Lys, Glu alebo Gln;
 Xaa v pozícii 24 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg alebo Lys;
 Xaa v pozícii 30 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;

- 10 R v pozícii 37 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, alebo je odstránený.

- Medzi výhodné GLP-1 zlúčeniny vzorca (I), (II), (III), (IV) a (V) patria GLP-1 analógy alebo fragmenty GLP-1 analógov, kde analógy alebo fragmenty obsahujú inú aminokyselinu ako alanín v pozícii 8 (analógy pozície 8). Je výhodné, aby tieto analógy pozície mali jednu ďalšiu zmenu alebo viac ďalších zmien v pozíciách 9, 11, 12, 16, 18, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36 a 37 v porovnaní so zodpovedajúcou aminokyselinou natívneho GLP-1(7-37)OH. Je tiež výhodné, aby tieto analógy mali 6 alebo menej zmien v porovnaní so zodpovedajúcou aminokyselinou natívneho GLP-1(7-37)OH alebo GLP-1(7-36)OH. Ešte výhodnejšie analógy majú 5 alebo menej zmien v porovnaní s porovnateľnými aminokyselinami v natívnom GLP-1(7-37)OH alebo GLP-1(7-36)OH alebo majú 4 alebo menej GLP-1(7-37)OH alebo GLP-1(7-36)OH. Je dokonca ešte výhodnejšie, keď tieto analógy majú 3 alebo menej zmien v porovnaní s porovnateľnými aminokyselinami v natívnom GLP-1(7-37)OH alebo GLP-1(7-36)OH. Najvýhodnejšie majú tieto analógy 2 alebo menej zmien v porovnaní s porovnateľnými aminokyselinami v natívnom GLP-1(7-37)OH.

- Bolo zistené, že zlúčeniny vzorca (II), (III), (IV) a (V) majú menší sklon k zhlukovaniu a vytváraniu nerozpustnej formy. To je tiež v kontexte fúzneho proteínu, kde si relatívne malý GLP-1 peptid musí udržať účinnú konformáciu napriek tomu, že je fúzovaný na oveľa väčší proteín. Výhodné GLP-1 zlúčeniny vzorca (II), (III), (IV) a (V) obsiahnuté vo fúzných proteínoch podľa vynálezu zahŕňujú GLP-1 analógy alebo fragmenty GLP-1 analógov, v ktorých je glycín na pozícii 22 a hlavne alanín v pozícii 8 nahradený inou aminokyselinou.

- Keď je v pozícii 22 asparágová kyselina, glutámová kyselina, arginín alebo lyzín, v pozícii 8 je výhodne glycín, valín, leucín, izoleucín, serín, treonín alebo metionín a ešte výhodnejšie valín alebo glycín. Keď je v pozícii 22 sulfónová kyselina, ako je kyselina cysteová, v pozícii 8 je výhodne glycín, valín, leucín, izoleucín, serín, treonín alebo metionín a ešte výhodnejšie valín alebo glycín.

- Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú GLP-1 analógy vzorca IV (SEQ ID NO: 5), kde analógy majú sekvenciu GLP-1(7-37)OH s výnimkou toho prípadu, že aminokyselina v pozícii 8 je výhodne glycín, valín, leucín, izoleucín, serín, treonín alebo metionín a ešte výhodnejšie valín alebo glycín a v pozícii 30 je kyselina glutámová, kyselina asparágová, serín alebo histidín a ešte výhodnejšie kyselina glutámová.

- Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú GLP-1 analógy vzorca (IV) (SEQ ID NO: 5), kde analógy majú sekvenciu GLP-1(7-37)OH s výnimkou toho prípadu, že aminokyselina v pozícii 8 je výhodne glycín, valín, leucín, izoleucín, serín, treonín alebo metionín a ešte výhodnejšie valín alebo glycín a v pozícii 37 je histidín, lyzín, arginín, serín, glutámová kyselina, asparágová kyselina, tryptofán, tyrozín, fenylalanín a ešte výhodnejšie histidín.

- Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú GLP-1 analógy vzorca (IV) (SEQ ID NO: 5), kde analógy majú sekvenciu GLP-1(7-37)OH s výnimkou toho prípadu, že aminokyselina v pozícii 8 je výhodne glycín, valín, leucín, izoleucín, serín, treonín alebo metionín a ešte výhodnejšie valín alebo glycín a v pozícii 22 je glutámová kyselina, lyzín, asparágová kyselina alebo arginín a ešte výhodnejšie glutámová kyselina alebo lyzín a v pozícii 23 je lyzín, arginín, glutámová kyselina, asparágová kyselina a histidín a ešte výhodnejšie lyzín alebo glutámová kyselina.

Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú GLP-1 analógy vzorca (V) (SEQ ID NO: 6), kde analógy majú sekvenciu GLP-1(7-37)OH s výnimkou toho prípadu, že aminokyselina v pozícii 8 je výhodne glycín, valín,

leucín, izoleucín, serín, treonín alebo metionín a ešte výhodnejšie valín alebo glycín a v pozícii 22 je glutámová kyselina, lyzín, asparágová kyselina alebo arginín a ešte výhodnejšie kyselina glutámová alebo lyzín a v pozícii 27 je alanín, lyzín, arginín, tryptofán, tyrozín, fenylalanín alebo histidín a ešte výhodnejšie alanín.

Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú GLP-1 analógy vzorca (II), kde analógy majú sekvenciu GLP-1(7-37)OH s výnimkou toho prípadu, že aminokyselina v pozícii 8 a jedna aminokyselina, dve alebo tri aminokyseliny vybrané zo skupiny pozostávajúcej z pozície 9, pozície 11, pozície 12, pozície 16, pozície 18, pozície 22, pozície 23, pozície 24, pozície 26, pozície 27, pozície 30, pozície 31, pozície 33, pozície 34, pozície 35, pozície 36 a pozície 37 sa líšia od aminokyseliny na zodpovedajúcej pozícii natívneho GLP-1(7-37)OH.

Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny vzorca (II) zahŕňujú: Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gly³⁴-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH, a Gly⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH.

Iná výhodná skupina GLP-1 analógov a derivátov použiteľných v tomto vynáleze je tvorená molekulami vzorca (VI) (SEQ ID NO: 7):

R₁-X-Glu-Gly¹⁰-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-

Ser-Tyr-Leu²⁰-Y-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Z-

Phe-Ile-Ala³⁰-Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-R₂

Vzorec VI (SEQ ID NO: 7),

kde:

R₁ je vybraný zo skupiny zahrňujúcej L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, β-hydroxyhistidín, homohistidín, α-fluórmethylhistidín a α-methylhistidín,

X je vybraný zo skupiny zahrňujúcej Ala, Gly, Val, Thr, Ile a α-metyl-Ala;

Y je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly;

Z je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly;

R₂ je Gly-OH.

Iná výhodná skupina GLP-1 zlúčenín použiteľná v tomto vynáleze je opísaná vo WO 91/11 457 a pozostáva v podstate z GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) alebo GLP-1(7-37) alebo ich amidových foriem, a ich farmaceuticky prijateľných solí, ktoré majú aspoň jednu modifikáciu, vybranú zo skupiny zahrňujúcej:

(a) zámenu glycínu, serínu, cysteínu, treonínu, asparagínu, glutamínu, tyrozínu, alanínu, valínu, izoleucínu, leucínu, metionínu, fenylalanínu, arginínu alebo D-lyzínu za lyzín v pozícii 26 a/alebo v pozícii 34; alebo zámenu glycínu, serínu, cysteínu, treonínu, asparagínu, glutamínu, tyrozínu, alanínu, valínu, izoleucínu, leucínu, metionínu, fenylalanínu, lyzínu alebo D-arginínu za arginín v pozícii 36,

(b) zámenu oxidačne rezistentnej aminokyseliny za tryptofán v pozícii 31,

(c) zámenu aspoň jednej z týchto látok: tyrozín za valín v pozícii 16, lyzín za serín v pozícii 18; kyselina

asparágová za kyselinu glutámovú v pozícii 21; serín za glycín v pozícii 22; arginín za glutamín v pozícii 23; arginín za alanín v pozícii 24; a glutamín za lyzín v pozícii 26, a

(d) zámenu aspoň jednej z týchto látok: glycín, serín alebo cysteín za alanín v pozícii 8; kyselina asparágová, glycín, serín, cysteín, treonín, asparagín, glutamín, tyrozín, alanín, valín, izoleucín, leucín, metionín alebo fenylalanín za kyselinu glutámovú v pozícii 9; serín, cysteín, treonín, asparagín, glutamín, tyrozín, alanín, valín, izoleucín, leucín, metionín alebo fenylalanín za glycín v pozícii 10; a kyselina glutámová za kyselinu asparágovú v pozícii 15; a

(e) zámenu glycínu, serínu, cysteínu, treonínu, asparagínu, glutamínu, tyrozínu, alanínu, valínu, izoleucínu, leucínu, metionínu alebo fenylalanínu alebo D alebo N-acylovanej alebo alkylovanej formy histidínu za histidín v pozícii 7; pričom v zámenách (a), (b), (d) a (e) môžu byť substituované aminokyseliny prípadne v D-forme a aminokyseliny substituované v pozícii 7 môžu prípadne byť v N-acylovanej alebo N-alkylovanej forme.

Pretože enzým dipeptidyl-peptidáza IV (DPP IV) môže byť zodpovedný za pozorovanú rýchlu deaktiváciu podávaného GLP-1 (pozri napr. Mentlein, R. a kol., Eur. J. Biochem., 214: 829 – 835 (1993)), sú v kontexte fúzných proteínov výhodné GLP-1 analógy a deriváty, ktoré sú chránené proti činnosti DPP IV, a ešte výhodnejšie sú fúzne proteíny, kde GLP-1 zlúčeninou je Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, α-metyl-Ala⁸-GLP-1(7-37)OH alebo Gly⁸-Gln²¹-GLP-1(7-37)OH.

Inou výhodnou skupinou GLP-1 zlúčenín použiteľnou v tomto vynáleze sú zlúčeniny vzorca (VII) (SEQ ID NO: 8) chránené v US patente č. 5 512 549, ktorý je tu výslovne uvedený v odkaze.

R¹-Ala-Glu-Gly¹⁰-

Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-

Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Xaa-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-

Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-R³

R²

Vzorec VII (SEQ ID NO: 8) ,

kde:

R¹ je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z 4-imidazopropionylu, 4-imidazoacetylú alebo 4-imidazo-α,α-dimetylacetylú,

R² je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z C₆-C₁₀ nerozvetveného acylú alebo je odstránený;

R³ je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z Gly-OH alebo NH₂; a Xaa je Lys alebo Arg.

Ešte výhodnejšie zlúčeniny vzorca (IV) použiteľné v tomto vynáleze sú tie, v ktorých Xaa je Arg a R² je C₆-C₁₀ nerozvetvený acyl. Dokonca ešte výhodnejšie zlúčeniny vzorca (IV) použiteľné v tomto vynáleze sú tie, v ktorých Xaa je Arg, R² je C₆-C₁₀ nerozvetvený acyl, R³ je Gly-OH. Iné vysoko výhodné zlúčeniny vzorca (IV), použiteľné v tomto vynáleze sú tie, v ktorých Xaa je Arg, R² je C₆-C₁₀ nerozvetvený acyl, R³ je Gly-OH, a R¹ je 4-imidazopropionyl. A obzvlášť výhodná zlúčenina vzorca (IV) použiteľná v tomto vynáleze je tá, v ktorej Xaa je Arg, R² je C₈ nerozvetvený acyl, R³ je Gly-OH, a R¹ je 4-imidazopropionyl.

Výhodne tieto GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú GLP-1 analógy, kde základný reťazec týchto analógov alebo fragmentov obsahuje aminokyselinu inú ako alanín v pozícii 8 (analógy pozície 8). Základný reťazec môže rovnako zahŕňať L-histidín, D-histidín alebo modifikované formy histidínu, ako je desaminohistidín, 2-aminohistidín, β-hydroxyhistidín, homohistidín, α-fluórmethylhistidín alebo α-methylhistidín v pozícii 7. Je výhodné, aby tieto analógy pozície 8 obsahovali jednu ďalšiu zmenu alebo viac ďalších zmien na pozíciách 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 a 37 v porovnaní so zodpovedajúcou aminokyselinou natívneho GLP-1(7-37)OH. Je ešte výhodnejšie, aby tieto analógy pozície 8 obsahovali jednu ďalšiu zmenu alebo viac ďalších zmien na pozíciách 16, 18, 22, 25 a 33 v porovnaní so zodpovedajúcou aminokyselinou natívneho GLP-1(7-37)OH.

Vo výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 12 je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z tryptofánu alebo tyrozínu. Je ešte výhodnejšie, keď okrem zámeny v pozícii 12, sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je dokonca ešte výhodnejšie, keď okrem zámeny v pozíciách 12 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou.

V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 16 je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z tryptofánu, izoleucínu, leucínu, fenylalanínu alebo tyrozínu. Je ešte výhodnejšie, keď okrem zámeny v pozícii 16 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom.

Je zvlášť výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 16 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je tiež výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 16 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je tiež výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 16 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

5 V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 18 je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z tryptofánu, tyrozínu, fenylalanínu, lyzínu, leucínu alebo izoleucínu, výhodne tryptofánu, tyrozínu a izoleucínu. Je ešte výhodnejšie, keď okrem zámény v pozícii 18 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je zvlášť výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 18 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je dokonca ešte výhodnejšie, keď okrem zámény v pozíciách 18 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 18 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

10 V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 19 je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z tryptofánu alebo fenylalanínu, výhodne tryptofánu. Je výhodnejšie, keď okrem zámény v pozícii 19 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom, a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je zvlášť výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 19 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 19 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 19 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

20 V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 20 je fenylalanín, tyrozín alebo tryptofán. Je výhodnejšie, keď okrem zámény v pozícii 20 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je zvlášť výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 20 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 20 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 20 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

25 V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 25 je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z valínu, izoleucínu a leucínu, výhodne valínu. Je výhodnejšie, keď okrem zámény v pozícii 25 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom, a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je zvlášť výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 25 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 25 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 25 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

30 V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 27 je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z izoleucínu alebo alanínu. Je výhodnejšie, keď okrem zámény v pozícii 27 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom, a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je zvlášť výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 27 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 27 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 27 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

35 V inom výhodnom uskutočnení je GLP-1 analógom GLP-1(7-37)OH, kde aminokyselina v pozícii 33 je izoleucín. Je výhodnejšie, keď okrem zámény v pozícii 33 sa aminokyselina v pozícii 8 nahradí glycínom, valínom, leucínom, izoleucínom, serínom, treonínom alebo metionínom, a ešte výhodnejšie valínom alebo glycínom. Je ešte výhodnejšie, keď okrem zámény v pozíciách 33 a 8 sa aminokyselina v pozícii 22 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 33 a 8 sa aminokyselina v pozícii 30 nahradí kyselinou glutámovou. Je rovnako výhodné, keď okrem zámény v pozíciách 33 a 8 sa aminokyselina v pozícii 37 nahradí histidínom.

50 GLP-1 zlúčeniny majú modifikácie na jednej pozícii alebo viacerých nasledujúcich pozíciách: 8, 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 a 37. Tieto GLP-1 zlúčeniny vykazujú účinnosť v porovnaní s GLP-1(7-37)OH a zahŕňujú sekvenciu aminokyseliny vzorca (IX) (SEQ ID NO: 12)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-

Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-

Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇

Vzorec (IX) (SEQ ID NO: 12),

55 kde:

Xaa₇ je L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, (β-hydroxyhistidín, homohistidín, α-fluór-methylhistidín alebo α-methylhistidín.

Xaa₈ je Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;

Xaa₁₂ je Phe, Trp alebo Tyr;

5 Xaa₁₆ je Val, Trp, Ile, Leu, Phe alebo Tyr;

Xaa₁₈ je Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

Xaa₁₉ je Tyr, Trp alebo Phe;

Xaa₂₀ je Leu, Phe, Tyr alebo Trp;

Xaa₂₂ je Gly, Glu, Asp alebo Lys;

10 Xaa₂₅ je Ala, Val, Ile alebo Leu;

Xaa₂₇ je Glu, Ile alebo Ala;

Xaa₃₃ je Ala alebo Glu;

Xaa₃₃ je Val alebo Ile, a

Xaa₃₇ je Gly, His, NH₂ alebo je odstránená.

15 Niektoré výhodné GLP-1 zlúčeniny vzorca (IX) zahŕňujú GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂.

20 Niektoré výhodné GLP-1 zlúčeniny vzorca (IX), ktoré majú viacnásobné zámesty, zahŕňujú GLP-1(7-37)OH, kde v pozícii 8 je valín alebo glycín, v pozícii 22 je kyselina glutámová, v pozícii 16 je tyrozín, leucín alebo tryptofán, v pozícii 18 je tyrozín, tryptofán alebo izoleucín, v pozícii 25 je valín a v pozícii 33 je izoleucín. Iné výhodné GLP-1 zlúčeniny zahŕňujú nasledujúce zlúčeniny: Val⁸-Tyr¹²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-Phe¹⁹-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Leu¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ile¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Trp¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH a Val⁸-Ile¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH.

40 GLP-1 zlúčeniny podľa vynálezu tiež zahŕňujú exendínové zlúčeniny. Exendín-3 a Exendín-4 sú biologicky aktívne peptidy, prvýkrát izolované z jedu jašteríc *Helodermatidae*, a bolo ukázané, že viažu GLP-1 receptor a stimulujú produkciu H⁺ závislú od cAMP v parietálnych bunkách cicavcov. Exendín-3 a Exendín-4 sú oba peptidy z 39 aminokyselín, ktoré sú približne z 53 % homológne s GLP-1. Pôsobia ako účinný agonista s aktivitou GLP-1. Je možné zaznamenať, že v N-koncovnej časti je skrátený derivát Exendínu, známy ako Exendín(9-39 aminokyselín), inhibítorom Exendínu-3, Exendínu-4 a GLP-1.

50 Exendínová zlúčenina obvykle obsahuje polypeptid, ktorý má sekvenciu aminokyselín Exendínu-3, Exendínu-4 alebo ich analógov alebo fragmentov. Exendín-3 a Exendín-4 sú opísané v US patente č. 5 424 286.

55 Exendín-3 má sekvenciu aminokyselín SEQ ID NO: 9:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe
 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
 Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser
 40 41 42 43 44 45
 Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

(SEQ ID NO: 9)

Exendín-4 má sekvenciu aminokyselín SEQ ID NO: 10:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
 Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe
 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
 Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser
 40 41 42 43 44 45
 Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

(SEQ ID NO: 10)

- 5 Medzi GLP-1 zlučieniny tiež patria fragmenty Exendínu, čo sú polypeptidy, získané po skrátení jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín z N-zakončenia a/alebo C-zakončenia Exendínu alebo analógu Exendínu. Ďalej medzi GLP-1 zlučieniny patria exendínové polypeptidy, v ktorých bola jedna aminokyselina alebo viacej aminokyselín pridaná k N-zakončeniu a/alebo C-zakončeniu Exendínu alebo jeho fragmentov. Exendínové zlučieniny tohto typu majú viac ako štyridsaťpäť aminokyselín.
- 10 Medzi GLP-1 zlučieniny tiež patria analógy Exendínu. Analóg Exendínu má dostatočnú homológiu s Exendínom-4, Exendínom-3 alebo ich fragmentmi takú, že tento analóg má inzulinotropnú účinnosť. Účinnosť exendínových fragmentov a/alebo analógov sa dá posúdiť s použitím testov *in vitro*, ako sú tie, ktoré sú opísané v EP 619 322 a US patente č. 5 120 712.
- 15 Výhodne má Exendínový analóg sekvenciu aminokyselín Exendínu-4 alebo jeho fragmentu modifikovanú tak, aby jedna, dve, tri, štyri alebo päť aminokyselín sa líšilo od aminokyselín v zodpovedajúcej pozícii Exendínu-4 alebo fragmentu Exendínu-4. V názvosloví, ktoré je tu použité na označovanie exendínových zlučienín, so substituujúcou aminokyselinou a jej pozícia je uvedená pred východiskovou štruktúrou. Napríklad Val⁸-Exendín-4 znamená exendínové zlučieninu, v ktorej bol glycín, ktorý je normálne v pozícii 8 Exendínu-4, zamenený valínom.
- 20 Iná výhodná skupina GLP-1 zlučienín pozostáva z GLP-1/Exendín-4 analógov vzorca (VIII) (SEQ ID NO: 11)

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
 Xaa-Xaa-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa-Ser
 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Xaa-Xaa-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Xaa-Phe

29 30 31 32 33 34 35 36 37

Ile-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-R

Vzorec VIII (SEQ ID NO: 11),

kde:

Xaa v pozícii 7 je L-histidín, D-histidín, desaminohistidín, 2-aminohistidín, β -hydroxyhistidín, homohistidín, α -fluórmetylhistidín alebo α -metylhistidín;

5 Xaa v pozícii 8 je Gly, Ala alebo Val;

Xaa v pozícii 16 je Leu alebo Val;

Xaa v pozícii 18 je Lys alebo Ser;

Xaa v pozícii 19 je Gln alebo Tyr;

Xaa v pozícii 20 je Met alebo Leu;

10 Xaa v pozícii 22 je Glu alebo Gln;

Xaa v pozícii 23 je Glu alebo Gln;

Xaa v pozícii 25 je Val alebo Ala;

Xaa v pozícii 26 je Arg alebo Lys;

Xaa v pozícii 27 je Leu alebo Glu;

15 Xaa v pozícii 30 je Glu alebo Ala;

Xaa v pozícii 33 je Val alebo Lys;

Xaa v pozícii 34 je Asn alebo Lys;

Xaa v pozícii 36 je Gly alebo Arg, a

R v pozícii 37 je Gly, Pro, Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser alebo je odstránený.

20 Účinnosť 18 rôznych druhov, ktoré patria do tejto skupiny, je uvedená v tabuľke 6.

Ďalšie exendínové analógy, ktoré sú použiteľné pre tento vynález, sú opísané v medzinárodnej patentovej publikácii PCT WO 99/25728 (Beeley a kol.), WO 99/25727 (Beeley a kol.), WO 98/05351 (Young a kol.), WO 99/40788 (Young a kol.), WO 99/07404 (Beeley a kol.) a WO 99/43708 (Knudsen a kol.).

25 Fúzne proteíny GLP-1 podľa vynálezu môžu zahŕňať glykozylované miesta. Glykozylácia je chemická modifikácia, kde sú sacharidové skupiny pridané k proteínu na určitých miestach. Glykozylácia proteínov hrá úlohu pri zaistení správneho náboja, konformácie a stability zrelého proteínu a môže zamerať proteín na bunkový povrch a spôsobiť prípadnú sekréciu proteínu. Najdôležitejšie je, že glykozylácia ovplyvňuje vylúčenia *in vivo* pre mnohé proteíny. Sacharidy môžu byť O-viazané alebo N-viazané. Všeobecne O-viazané sacharidy sú naviazané ku kyslíku hydroxylovej skupiny serínu a treonínu, a N-viazané sacharidy sú naviazané k amidovému dusíku asparagínu. Zmluvné miesto pre N-glykozyláciu je Asn X1 X2, kde X1 je akákoľvek aminokyselina s výnimkou Pro a X2 je Ser alebo Thr.

30 GLP-1 zlúčeniny obvykle nie sú glykozylované *in vivo*, ale je zaujímavé, že GLP-1 fúzne proteíny podľa vynálezu, medzi ktoré patrí GLP-1 zlúčenina s predĺženým C-zakončením fúzovaným na Fc sekvenciu, je glykozylovaný na poslednom seríne v predĺžení C-zakončenia (SSGAPPPS*) a na treoníne v pozícii 11 v N-koncovnej oblasti Fc (AEPKSCDKTHT*CPPC...).

Heterológne Fc fúzne proteíny

Opísané GLP-1 zlúčeniny môžu byť nafúzované priamo alebo cez peptidový linker k Fc časti imunoglobulínu.

40 Imunoglobulíny sú molekuly obsahujúce polypeptidové reťazce, spojené disulfidovými väzbami, ktoré obvykle majú dva ľahké a dva ťažké reťazce. V každom reťazci má jedna doména (V) variabilnú sekvenciu aminokyselín v závislosti od špecifickosti molekuly protilátky. Iné domény (C) majú do značnej miery konštantnú sekvenciu, ktorá je pri molekulách tohto typu bežná.

45 Ako sa tu používa, Fc časť imunoglobulínu má význam, ktorý je všeobecne uvádzaný v oblasti imunológie. Presnejšie povedané, tento termín znamená fragment protilátky, ktorá sa získava odstránením dvoch regiónov, ktoré viažu antigén (Fab fragmenty), z protilátky. Jedným zo spôsobov, ako odstrániť Fab fragmenty, je natráviť imunoglobulín papaínovou proteázou. Fc časť je teda vytvorená z približne rovnako veľkých fragmentov z konštantných oblastí oboch ťažkých reťazcov, ktoré sú spojené nekovalentnými interakciami a disulfidickými väzbami. Fc časť môže obsahovať ohybové oblasti a predlžovať sa cez CH₂ a CH₃ domény k C-zakončeniu protilátky. Príklady ohybových oblastí pre ľudské a myšie imunoglobulíny možno nájsť v publikácii Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C. A. K, ed., W. H. Freeman and Co., 1992, a informácie o nich sú tu uvedené formou odkazu. Fc časť môže ďalej obsahovať jedno glykozylačné miesto alebo viacej glykozylačných miest. Na obrázku 1 je ukázaná sekvencia aminokyselín reprezentatívneho Fc proteínu, ktorý obsahuje ohybovú oblasť, CH₂ a CH₃ domény a jedno N-glykozylačné miesto v pozícii

82.

Existuje päť typov ľudských imunoglobulínových Fc regiónov s rôznymi účinkami a farmakokinetickými vlastnosťami: IgG, IgA, IgM, IgD a IgE. IgG je najrozšírenejší imunoglobulín v sére. IgG tiež má zo všetkých imunoglobulínov v sére najdlhší polčas života (23 dní). Na rozdiel od ostatných imunoglobulínov je IgG účinne recirkulovaný a následne viazaný na Fc receptor. Existujú štyri poddruhy IgG: G1, G2, G3 a G4, z ktorých každá má rôzne účinky a funkcie. G1, G2 a G3 môžu viazať C1q a fixovať doplnok, zatiaľ čo G4 nemôže. Napriek tomu, že G3 je schopný viazať C1q účinnejšie ako G1, G1 je účinnejší pri sprostredkovaní komplementom riadenej lýzy bunky. G2 fixuje komplement veľmi neúčinne. Väzbové miesto C1q v IgG je umiestnené na oblasti karboxylového zakončenia CH₂ domény.

Všetky IgG poddruhy sú schopné naviazať sa na Fc receptory (CD16, CD32, CD64), pričom G1 a G3 sú účinnejšie ako G2 a G4. Väzbová oblasť Fc receptora IgG je tvorená rezíduami umiestnenými jednak v ohybovej oblasti a tiež v oblasti karboxylového zakončenia CH₂ domény.

IgA môže existovať v monomérnej a dimérnej forme držiacej pohromade J-reťazcom. IgA je druhým najrozšírenejším Ig v sére, ale má polčas života iba 6 dní. IgA má tri efektorové funkcie. Viaže sa k IgA špecifickému receptoru na makrofágy a eozinofily, ktoré sa podieľajú na fagocytóze a degranulácii. IgA môže tiež fixovať komplement cez inú neznámu alternatívnu cestu.

IgM je exprimovaný ako pentamér alebo hexamér, držiaci pohromade J-reťazcom. IgM má polčas života 5 dní. Viaže sa slabšie na C1q cez väzbové miesto lokalizované v jeho CH₃ doméne. IgD má polčas životnosti v sére 3 dni. Je nejasné, aké efektorové funkcie náležia tomuto Ig. IgE je monomérny Ig a má polčas životnosti 2,5 dňa. IgE sa viaže na dva Fc receptory spúšťajúce degranuláciu a výsledkom je uvoľnenie prozápalových účinných látok.

V závislosti od požadovaného efektu *in vivo* môžu heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu obsahovať akýkoľvek opísaný izotyp alebo môžu obsahovať zmenené Fc regióny, pri ktorých bol zmenený komplement a/alebo väzbové funkcie Fc receptora. Heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu teda môžu obsahovať celú Fc časť imunoglobulínu, fragmenty Fc časti imunoglobulínu alebo ich analógy fúzované na GLP-1 zlúčeninu.

Fúzne proteíny podľa vynálezu môžu pozostávať z proteínov s jedným reťazcom alebo viacerých polypeptidov. Dva alebo viac Fc fúzných proteínov môže byť vyrobených tak, že interagujú pomocou disulfidovej väzby, ktorá sa prirodzene tvorí medzi Fc oblasťami. Tieto multiméry môžu byť homogénne s ohľadom na GLP-1 zlúčeninu alebo môžu obsahovať iné GLP-1 zlúčeniny fúzované na N-zakončenie Fc časti fúzneho proteínu.

Bez ohľadu na konečnú štruktúru fúzneho proteínu, Fc alebo Fc podobnej oblasti, musí slúžiť k predĺženiu polčasu životnosti v plazme GLP-1 zlúčeniny fúzovanej na N-zakončenie. Fúzovaná GLP-1 zlúčenina musí ďalej udržiavať určitú biologickú aktivitu. Zväčšenie polčasu sa dá dokázať použitím metódy opísanej v príklade 7, v ktorom sa porovnáva polčas životnosti fúzneho proteínu s polčasom životnosti samotnej GLP-1 zlúčeniny. Biologická aktivita sa dá zistiť pomocou *in vitro* a *in vivo* metód, známych v odbore. Reprezentatívne biologické testy sú opísané ako príklady 6, 8 a 9.

Vzhľadom na to, že Fc oblasť IgG vyrobená proteolýzou má rovnaký polčas životnosti *in vivo* ako intaktná IgG molekula a Fab fragmenty rýchlo degradujú, predpokladá sa, že príslušná sekvencia predlžujúca polčas životnosti, sídli v CH₂ a/alebo CH₃ doménach. Ďalej bolo ukázané v literatúre, že rýchlosti katabolizmu IgG variantov, ktoré neviažu Fc receptor s vysokou afinitou alebo C1q, sú neodlíšiteľné od rýchlostí vylúčenia hlavného štandardného typu protilátky, čo indikuje, že katabolické miesto je odlišné od miest zahrnutých v Fc receptore alebo C1q väzbe (Wawrzynczak a kol., (1992) *Molecular Immunology* 29: 221). Štúdie zamerané na rozpoznávanie miest mutagenézy, pri ktorej sa používa murín IgG1 Fc regiónu, navrhli, aby miesto IgG1 Fc regiónu, ktoré kontroluje rýchlosť katabolýzy, bolo lokalizované na medzičlánku CH₂-CH₃ domény.

Na základe týchto štúdií môžu byť Fc regióny s cieľom optimalizovať polčas životnosti fúzovaných proteínov modifikované na katabolickom mieste. Je výhodné, aby Fc región, používaný pre heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu, bol odvodený od IgG1 alebo IgG4 Fc regiónu. Je výhodnejšie, aby Fc región bol IgG4 alebo odvodený od IgG4. Výhodne obsahuje IgG Fc región CH₂ i CH₃ regióny vrátane ohybového regiónu.

Heterológne fúzne proteíny s albumínom

GLP-1 zlúčeniny opísané vyššie môžu byť fúzované priamo alebo cez peptidový linker na albumín alebo na analóg, fragment alebo ich derivát.

Všeobecne môžu byť albumínové proteíny upravujúce časť fúzovaných proteínov podľa vynálezu odvodené od albumínu klonovaného z ľubovoľného druhu. Ale na zníženie nebezpečenstva, že sa fúzovaný proteín stane imunogénny u ľudí, je výhodnejšie používať ľudský albumín a fragmenty a jeho analógy. Albumín ľudského séra (HSA) pozostáva z jedného neglykozylovaného polypeptidového reťazca s 585 aminokyselinami so vzorcom s molekulárnou hmotnosťou 66 500. Sekvencia aminokyselín ľudskej HSA je znázornená na obrázku 2. (Pozri Meloun a kol. (1975) *FEBS Letters* 58: 136, Behrens a kol. (1975) *Fed. Proc.* 34: 591,

Lawn a kol. (1981) Nucleic Acids Research 9: 6102 – 6114, Minghetti a kol. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6747). Boli opísané rôzne polymorfné varianty a tiež analógy a fragmenty albumínu. (Pozri Weitkamp a kol., (1973), Ann. Hum. Genet. 37: 219). Napríklad v EP 322 094 vynálezcovia objavili rôzne kratšie formy HSA. Niektoré z týchto fragmentov zahŕňujú HSA(1-373), HSA(1-388), HSA(1-389), HSA(1-369) a HSA(1-419), a fragmenty medzi 1-369 a 1-419. EP 399 666 prináša objav fragmentov albumínu, ktoré zahŕňujú HSA(1-177) a HSA(1-200) a fragmenty medzi HSA(1-177) a HSA(1-200).

Je treba vnímať, že heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu zahŕňajú GLP-1 zlúčeniny, ktoré sú s akýmkoľvek albumínovým proteínom vrátane fragmentov, analógov a derivátov, v ktorých je tento fúzovaný proteín biologicky aktívny a má dlhší plazmový polčas životnosti než samotná GLP-1 zlúčenina. Takže nie je nutné, aby albumínová časť fúzneho proteínu mala polčas životnosti v plazme rovnaký ako natívny ľudský albumín. Fragmenty, analógy a deriváty sú známe alebo môžu byť generované, aby mali dlhší polčas životnosti alebo mali dĺžku polčasu životnosti medzi polčasom životnosti natívneho ľudského albumínu a diskutovanej GLP-1 zlúčeniny.

Heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu zahŕňajú proteíny, ktoré majú konzervatívnu aminokyselinovú substitúciu v GLP-2 zlúčenine a/alebo Fc alebo albumínovej časti fúzneho proteínu. Konzervatívna substitúcia je nahradenie aminokyseliny inou aminokyselinou, ktorá má rovnaký čistý elektrický náboj a približne rovnakú veľkosť a tvar. Aminokyseliny s alifatickými alebo substituovanými alifatickými aminokyselinovými vedľajšími reťazcami majú približne rovnakú veľkosť, keď celkový počet uhlíkov heteroatómov v ich vedľajšom reťazci sa nelíši o viac ako asi 4. Majú približne rovnaký tvar, pokiaľ sa počet vetiev vedľajšieho reťazca nelíši o viac ako jednu. Aminokyseliny s fenylovými alebo substituovanými fenylovými skupinami sa považujú za približne rovnako veľké a rovnakého tvaru. Okrem špecificky tu vytvorených, sa konzervatívne substitúcie uskutočňujú s prirodzene sa vyskytujúcimi aminokyselinami.

Výraz aminokyselina, ktorý sa tu používa, sa myslí v najširšom zmysle a zahŕňa prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny rovnako ako neprimrodzene sa vyskytujúce aminokyseliny vrátane analógov a derivátov aminokyselín. Naposledy uvedené zahŕňujú molekuly s aminokyselinovými skupinami. Odborník v odbore rozpozná vo svetle tejto najširšej definície, že uvedený odkaz na aminokyselinu zahŕňa napríklad prirodzene sa vyskytujúce proteogénne L-aminokyseliny, D-aminokyseliny, chemicky modifikované aminokyseliny, ako sú analógy a deriváty aminokyselín, prirodzene sa vyskytujúce neproteogénne aminokyseliny, ako je norleucín, β -alanín, ornitín, GABA atď., a chemicky pripravené zlúčeniny s vlastnosťami, o ktorých je v odbore známe, že sú charakteristické pre aminokyseliny. Použitý výraz proteogénne znamená, že aminokyselina môže byť zabudovaná v peptide, polypeptide alebo proteíne v bunke metabolickou cestou.

Zabudovanie neprírodných aminokyselín vrátane syntetických nenatívnych aminokyselín, substituovaných aminokyselín alebo jednej D-aminokyseliny alebo viacerých D-aminokyselín do heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu môže byť vo viacerých smeroch výhodné. Peptidy obsahujúce D-aminokyseliny atď. vykazujú zvýšenú stabilitu *in vitro* alebo *in vivo* v porovnaní s ich náprotivkami obsahujúcimi L-aminokyseliny. Takže konštrukcia peptidov atď. zahŕňajúca D-aminokyseliny môže byť zvlášť užitočná, ak sa požaduje väčšia intracelulárna stabilita. Konkrétnejšie, D-peptidy a pod. sú rezistentné proti endogénnym peptidázam a proteázam, čím uskutočňujú zlepšenú biologickú dostupnosť molekuly a predĺženú životnosť *in vivo*, pokiaľ sú takéto vlastnosti potrebné. Navyše D-peptidy a pod. nemôžu byť účinne spracované pre hlavný histokompatibilný komplex triedy II – obmedzenie prezentácie pomocným T-bunkám a sú teda menej schopné vyvolať humorálnu imunitnú odpoveď v celom organizme.

Okrem štruktúrálnej/funkčnej analýzy rôznych peptidov zahrnutých v tomto vynáleze existuje rad faktorov, ktoré môžu byť uvažované pri výbere aminokyselín pre substitúciu. Jeden z faktorov, ktorý môže byť zohľadnený pri uskutočňovaní týchto zmien, je hydropatický index aminokyselín. Význam hydropatického indexu aminokyselín pri interaktívnej biologickej funkcii proteínu bol diskutovaný v publikácii Kyte a Doolittle (1982, J. Mol. Biol., 157: 105 – 132). Je akceptované, že relatívny hydropatický charakter aminokyselín prispieva k sekundárnej štruktúre výsledného proteínu. To má ďalej vplyv na interakciu proteínu s molekulami, ako sú enzýmy, substráty, receptory, ligandy, DNA, protilátky, antigény atď. Každá aminokyselina má priradený hydropatický index, založený na jej hydrofóbnosti a charakteristike nábojov: izoleucín (+4,5), valín (+4,2), leucín (+3,8), fenylalanín (+2,8), cysteín/cystín (+2,5), metionín (+1,9), alanín (+1,8), glycín (-0,4), treonín (-0,7), serín (-0,8), tryptofán (-0,9), tyrozín (-1,3), prolín (-1,6), histidín (-3,2), glutamát/glutamín/asparagín (-3,5), lyzín (-3,9) a arginín (-4,5).

Ako je v odbore známe, určité aminokyseliny v peptide, polypeptide alebo proteíne sa dajú nahradiť inými aminokyselinami, ktoré majú podobný hydropatický index alebo ohodnotenie za vzniku výsledného peptidu a pod. s podobnou alebo zlepšenou biologickou účinnosťou. Na uskutočňovanie týchto zmien je výhodné, aby boli vzájomne zamieňané aminokyseliny, ktoré majú hydropatické indexy v rámci hodnôt ± 2 . Výhodnejšie substitúcie sú tie, v ktorých majú aminokyseliny hydropatické indexy v rozmedzí ± 1 . Najvýhodnejšie substitúcie sú tie, v ktorých aminokyseliny majú hydropatické indexy v rozmedzí $\pm 0,5$.

Podobne môžu byť aminokyseliny substituované na základe hydrofilnosti. U. S. patent č. 4 554 101 vysvetľuje, že najväčšia lokálna priemerná hydrofilnosť proteínu určená na základe hydrofilnosti v ňom suse-

- diacich aminokyselín koreluje s biologickou vlastnosťou proteínu. Aminokyselinám sú priradené hodnoty hydrofilnosti nasledujúcim spôsobom: arginín/lyzín (+3,0), aspartát/glutamát (+3,0+1), serín (+0,3), asparagín/glutamín (+0,2), glycín (0), treonín (-0,4), prolín (-0,5±1), alanín/histidín (-0,5), cysteín (-1,0), metionín (-1,3), valín (-1,5), leucín/izoleucín (-1,8), tyrozín (-2,3), fenyľalanín (-2,5) a tryptofán (-3,4). Jedna aminokyselina v peptide, polypeptide alebo proteíne teda môže byť substituovaná inou aminokyselinou, ktorá má podobný index hydrofilnosti a stále produkuje výsledný peptid a pod., ktorý má podobnú biologickú účinnosť, t. j. stále si zachováva správnu biologickú funkciu. Pri uskutočňovaní takýchto zmien sa môžu navzájom substituovať aminokyseliny, ktoré majú hydropatické indexy v rozmedzí hodnôt ± 2 , výhodnejšie sú tie, ktoré majú hodnoty v rozmedzí ± 1 , a najvýhodnejšie sú tie, ktoré majú hodnoty v rozmedzí $\pm 0,5$.
- Ako bolo podčiarknuté, substitúcia aminokyselín vo fúzovaných proteínoch podľa vynálezu môže byť založená na relatívnej podobnosti substituentov vo vedľajších reťazcoch aminokyselín, napríklad ich hydrofóbnosti, hydrofilnosti, náboji, veľkosti, atď. Ďalej môžu byť substitúcie založené na sekundárnej štruktúrnej podobnosti. Napríklad helikálna aminokyselina môže byť nahradená aminokyselinou, ktorá zachováva helikálnu štruktúru. Exemplárne substitúcie, ktoré zohľadňujú rôzne zmienené kritéria s cieľom uskutočniť konzervatívne zmeny aminokyseliny vedúce ku skrytým zmenám v aktuálnych peptidoch atď. môžu mať vhodné substituenty vybrané z iných členov triedy, ku ktorej prirodzene sa vyskytujúca aminokyselina prináleží.
- Aminokyseliny môžu byť rozdelené do nasledujúcich štyroch skupín: (1) kyslé aminokyseliny, (2) bázické aminokyseliny, (3) neutrálne polárne aminokyseliny a (4) neutrálne nepolárne aminokyseliny.
- Všeobecné spôsoby výroby heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu
- Aj keď heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu môžu byť vyrobené rôznymi spôsobmi, výhodné sú spôsoby, ktoré využívajú rekombinantné techniky. Na účely tohto vynálezu, ako je tu vysvetlené a chránené, ďalej sú definované všeobecné termíny a skratky pre molekulárnu biológiu. Termíny a skratky použité v tomto dokumente majú svoj normálny význam, pokiaľ nie je uvedené inak. Napríklad °C znamená stupne Celzia, mmol znamená milimol alebo milimoly, mg znamená miligramy, µg znamená mikrogramy, „ml“ znamená mililitre a µl znamená mikrolitre. Skratky aminokyselín sú uvedené 37C. F. R § 1.822 (b) (2) (1994).
- Párové bázy alebo bp, ako sa tu používa, znamená DNA alebo RNA. Skratky A, C, G a T zodpovedajú 5'-monofosfátovým formám deoxyribonukleozidom deoxyadenozínu, deoxycytidínu, deoxyguanozínu a tymidínu, keď sa objaví v DNA molekulách. Skratky U, C, G a A zodpovedajú 5'-monofosfátovým formám ribonukleozidov uridínu, cytidínu, guanozínu a adenosínu, keď sa objaví v RNA molekulách. V dvojreťazcovej DNA sú párové bázy spojené vždy A s T alebo C s G. V DNA/RNA, heteroduplexnej párovej báze môže znamenať spojenie A s U alebo C s G. (Pozri definícia komplementárny ďalej).
- Digescia alebo reštrikcia DNA znamená katalytické rozštiepenie DNA reštrikčným enzýmom, ktorý pôsobí len v niektorých sekvenciách DNA (sekvenčné špecifické endonukleázy). Rôzne tu používané reštrikčné enzýmy sú obchodne dostupné a ich reakčné podmienky, kofaktory a iné požiadavky boli použité, ako sú známe odborníkovi v odbore. Vhodné pufrý a množstvo substrátu pre konkrétne reštrikčné enzýmy sú špecifikované výrobcom alebo sa môžu ľahko nájsť v literatúre.
- Ligácia znamená spôsob výroby fosfodiesterových väzieb medzi dvoma dvojvláknovými fragmentmi nukleových kyselín. Pokiaľ nie je inak ustanovené, ligácia sa dá dosiahnuť s použitím známych pufrův a podmienok s použitím DNA ligáz, ako je T4 DNA ligáza.
- Plazmid znamená extrachromozomálny (zvyčajne) samoreplikujúci sa genetický prvok. Plazmidy sú obvykle označované malým písmenom p, nasledovaným písmenami a/alebo číslicami. Uvedené východiskové plazmidy sú dostupné obchodne, všeobecne a neobmedzene dostupné alebo môžu byť konštruované z dostupných plazmidov v súlade s publikovanými postupmi. Navyše ekvivalentné plazmidy, podobné tým, ktoré sú tu opísané, sú v odbore známe a sú známe bežne skúsenému odborníkovi v odbore.
- Klonovací vektor rekombinantnej DNA, ako sa tu používa, znamená akékoľvek autonómne sa replikujúce činidlo, ktoré zahŕňa plazmidy a fágy, ale nie je na ne obmedzené. Toto činidlo zahŕňa DNA molekulu, ku ktorej môže byť pridaných alebo bolo pridaných jeden segment alebo viac ďalších segmentov DNA.
- Expresný vektor rekombinantnej DNA, ako je tu používaný, znamená akýkoľvek klonujúci vektor rekombinantnej DNA, v ktorom bol zabudovaný promótor na riadenie transkripcie vlozenej DNA.
- Transkripcia znamená spôsob, v ktorom sa informácia obsiahnutá v nukleotidovej sekvencii DNA prenáša do komplementárnej sekvencie RNA.
- Transfekcia znamená vloženie expresného vektora do hostiteľskej bunky, kde sú alebo nie sú akékoľvek kódovacie sekvencie v skutočnosti exprimované. Odborníkom v odbore je známych mnoho spôsobov transfekcie, napríklad spoločné zrážanie s fosforečnanom vápenatým, lipozómová transfekcia a elektroforéza. Úspešná transfekcia je všeobecne rozpoznávaná vtedy, keď sa v hostiteľskej bunke objaví akákoľvek indikácia, že sa v nej nachádza vektor.
- Transformácia znamená zavedenie DNA do organizmu tak, aby DNA bola replikovateľná buď ako extrachromozomálny element, alebo chromozomálna integrácia. Spôsoby transformácie bakteriálnych a eukaryotických hostiteľov sú dobre známe v odbore, veľa z týchto spôsobov ako nástrek do jadra, splnutie protop-

lastov alebo pôsobenie vápnika s použitím chloridu vápenatého je opísaných v J. Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989). Všeobecne sa zavádza DNA do kultivačného substrátu termín transformácie sa používa ako opak k termínu transfekcie.

Translácia ako je tu používaná, znamená proces pri ktorom sa používa genetická informácia messenger-RNA (mRNA), aby sa spresnila a nasmerovala syntéza reťazca polypeptidu.

Vektor znamená zlúčeninu nukleovej kyseliny, použitú na transfekciu a/alebo transformáciu buniek pri gémovej manipulácii, ktorá nesie polynukleotidové sekvencie, zodpovedajúce príslušným molekulám proteínu, ktoré, ak sú kombinované s vhodnými riadiacimi sekvenciami, prepožičiavajú špecifické vlastnosti hostiteľskej bunke, ktorá je transfektovaná a/alebo transformovaná. Vhodnými vektormi sú plazmidy, vírusy a bakteriofágy. Umelé vektory sú konštruované štiepením a opakovaným spájaním DNA molekúl z rôznych zdrojov, pričom sa používajú reštrikčné enzýmy a ligázy. Termín vektor, ako je tu používaný, zahŕňa klonujúce vektory rekombinantnej DNA a expresné vektory rekombinantnej DNA.

Komplementárny alebo komplementarita, ako sa tu používa, znamená párové bázy (puríny a pyrimidíny), ktoré sa spájajú vodíkovými väzbami do dvojreťazcovej nukleovej kyseliny. Komplementárne sú nasledujúce párové bázy: guanín a cytozín, adenín a tymín, a adenín a uracil.

Hybridizácia, ako je tu používaná, znamená proces, pri ktorom sa reťazec nukleovej kyseliny spája s komplementárnym reťazcom pomocou párovania báz. Podmienky používané pri hybridizácii dvoch neidentických, ale veľmi podobných komplementárných nukleových kyselín, sa mení v závislosti od stupňa komplementarity týchto reťazcov a ich dĺžky. Tieto techniky a podmienky na ich uskutočňovanie sú dobre známe odborníkom v odbore.

Izolovaná sekvencia aminokyseliny znamená akúkoľvek sekvenciu aminokyseliny, konštruovanú alebo syntetizovanú, ktorá je pozične odlišná od prírodnej sa vyskytujúcej sekvencie.

Izolovaná zlúčenina DNA znamená akúkoľvek sekvenciu DNA, konštruovanú alebo syntetizovanú, ktorá je pozične odlišná od prirodzenej pozície v DNA génómu.

Izolovaná zlúčenina nukleovej kyseliny znamená akúkoľvek sekvenciu RNA alebo DNA, bez ohľadu na spôsob konštrukcie alebo syntézy, ktorá je pozične odlišná od svojej prirodzenej pozície.

Primér znamená fragment nukleovej kyseliny, ktorý funguje ako iniciačný substrát na enzymatické alebo syntetické predlžovanie.

Promótor znamená sekvenciu DNA, ktorá usmerňuje transkripciu z DNA na RNA.

Sonda znamená zlúčeninu nukleovej kyseliny alebo jej fragment, ktorá sa hybridizuje s inou zlúčeninou nukleovej kyseliny.

Presnosť hybridizačných reakcií je ľahko stanoviteľná odborníkom v odbore a všeobecne sa zisťuje empirickým výpočtom, závislým od dĺžky sondy, teploty premývania a koncentrácie soli. Všeobecne vyžadujú dlhšie sondy vyššie teploty na správnu teplotnú hybridizáciu a kratšie sondy potrebujú nižšiu teplotu. Hybridizácia všeobecne závisí od schopnosti denaturovanej DNA znovu hybridizovať, keď sú v médiu prítomné komplementárne reťazce pod svojou polovičnou teplotou denaturácie. Čím vyšší je stupeň požadovanej homológie medzi sondou a hybridizovateľnou sekvenciou, tým vyššia teplota sa dá použiť. Ako výsledok je treba uviesť, že vyššie relatívne teploty majú tendenciu robiť reakciu presnejšou, zatiaľ čo nižšie teploty menej. Na uvedenie ďalších podrobností a vysvetlení presnosti hybridizácie pozri Ausubel a kol., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, 1995.

Presné podmienky alebo vyššia presnosť podmienok, ako sú tu opísané, môžu byť stanovené tým, že (1) využívajú malú iónovú silu a vysokú teplotu na premývanie, napríklad 15 mmol chlorid sodný/1,5 mmol citrát sodný/0,1 % dodecylsulfát sodný pri 50 °C; (2) využívajú v priebehu hybridizácie denaturačné činidlo, ako je formamid, napríklad 50 % (obj/obj) formamid s 0,1 % albumín hovädzieho séra/0,1 % fikor/0,1 % polyvinylpyrrolidón/50 mmol pufor s pyrofosforečnanom sodným pri pH 6,5 s 750 mmol chlorid sodný/75 mmol citrát sodný pri 42 °C, alebo (3) využíva 50 % formamid, 5X SSC (750 mmol chlorid sodný, 75 mmol citrát sodný), 50 mmol fosforečnan sodný (pH 6,8), 0,1 % difosforečnan sodný, 5X Denhardtov roztok, DNA zo spermií lososa upraveného ultrazvukom (50 µg/ml), 0,1 % SDS a 10 % dextránsulfát pri 42 °C s premytím pri 42 °C v 0,2X SSC (30 mmol chlorid sodný/3 mmol citrát sodný) a 50 % formamidom pri 55 °C, nasledovaným intenzívnym premytím s pomocou 0,1 X SSC obsahujúceho EDTA pri 55 °C.

Stredné presné podmienky sú opísané v Sambrook a kol. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, (1989)), a zahŕňujú použitie premývacích roztokov a hybridizačných podmienok (t. j. teploty, iónovej sily a % SDS) menej prísnych, ako bolo opísané skôr. Príkladom týchto podmienok je inkubácia cez noc pri 37 °C v roztoku, ktorý obsahuje: 20 % formamidu, 5X SSC (750 mmol chlorid sodný, 75 mmol citrát sodný), 50 mmol fosforečnan sodný pri pH 7,6, 5X Denhardtov roztok, 10 % dextránsulfát a 20 mg/ml denaturovaných rozrušených DNA losích spermií, po ktorom nasleduje premytie v 1X SSC pri približne 37 – 50 °C. Odborník v odbore ľahko rozpozná, ako nastaviť teplotu, iónovú silu atď. pokiaľ je nutné prispôbiť rôzne faktory, ako je dĺžka sondy a podobne.

PCR znamená známu polymerázovú reakciu reťazca, ktorá využíva teplotne stabilnú polymerázu DNA.

Vedúca sekvencia znamená sekvenciu aminokyseliny, ktorá môže byť enzymaticky alebo chemicky od-

stránená, aby sa dal vyrobiť požadovaný polypeptid, o ktorý nám ide.

Vylučovacia signálna sekvencia znamená aminokyselinovú sekvenciu, všeobecne prítomnú na N-kon-
covej oblasti väčšieho polypeptidu, ktorá funguje ako iniciátor spojenia tohto polypeptidu membránovými
kompartimentami bunky, ako je endoplazmatické retikulum a sekrécia tohto polypeptidu cez plazmovú mem-
bránu.

Konštrukcia DNA kódujúca heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu

Štandardné albumínové a imoglobulínové proteíny možno získať z mnohých zdrojov. Tieto proteíny
možno napríklad získať z cDNA knižnice, pripravenej z tkanív a buniek, ktoré obsahujú mRNA, o ktorú nám
ide, v detekovateľnom množstve. Knižnice možno prehľadávať pomocou sond, vyrobených s použitím zná-
mych DNA alebo proteínových sekvencií na nájdenie sekvencie pre konkrétny proteín, ktorý nás zaujíma.
Napríklad konštantné regióny ľahkých a ťažkých reťazcov imunoglobulínu sú opísané v Adams a kol. (1980)
Biochemistry 19: 2711 – 2719, Goughet a kol. (1980) Biochemistry 19: 2702 – 2710, Dolby a kol. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6027 – 6031, Rice a kol. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7862 – 7862,
Falkner a kol. (1982) Nature 298: 286 – 288 a Morrison a kol. (1984) Ann. Rev. Immunol. 2: 239 – 256.
Niektoré odkazy opisujúce albumínové proteíny a DNA sekvencie sú obsiahnuté v Meloun a kol. (1975)
FEBS Letters 58: 136, Behrens a kol. (1975) Fed. Proc. 34: 591, Lawn a kol. (1981) Nucleic Acids Research
9: 6102 – 6114 a Minghetti a kol. (1986) J. Biol. Chem. 261: 6747.

Skríning cDNA alebo genómovej knižnice s vybranou sondou môže byť uskutočňovaný s použitím štand-
ardných postupov, ktoré sú opísané v Sambrook a kol., Molekular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Alternatívnym prostriedkom na izoláciu génov kódujúcich al-
bumínový alebo imoglobulínový proteín je spôsob PCR (Sambrook et. al., supra, Dieffenbach a kol., PCR
Primer: A, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)). PCR priméry možno kon-
štruovať na základe publikovaných sekvencií.

Všeobecne môžu štandardné sekvencie s plnou dĺžkou klonované z konkrétnych druhov slúžiť ako matri-
ce na vytvorenie analógov, fragmentov a derivátov, ktoré si udržiajú schopnosť prenášať dlhší polčas život-
nosti na GLP-1 zlúčeniny, ktoré sú časti fúzovaných proteínov. Je výhodné, aby Fc a albumínové časti hete-
rológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu boli odvodené od natívnej ľudskej sekvencie s cieľom zní-
žiť riziko potenciálnej imunogenicity fúzovaných proteínov u ľudí.

Najmä je výhodné, aby imoglobulínová časť fúzneho proteínu podľa vynálezu obsahovala iba Fc frag-
ment imoglobulínu. V závislosti od toho, či je žiadaná konkrétna efektorová funkcia a od štruktúrnych
vlastností fúzneho proteínu, môže Fc fragment obsahovať ohybovú oblasť spolu s CH2 a CH3 doménami
alebo niektoré ich ďalšie kombinácie. Tieto Fc fragmenty môžu byť konštruované s použitím PCR techník s
primérmí určenými na hybridizáciu sekvencií, zodpovedajúcich požadovanému koncu fragmentu. Pokiaľ sú
podobne požadované fragmenty albumínu, môžu byť navrhnuté PCR priméry komplementárne s internými
albumínovým sekvenciami. Môžu byť rovnako vytvorené PCR priméry, ktoré tvoria miesta pre reštrikčné
enzýmy, aby sa uľahčilo klonovanie do expresného vektora.

DNA kódujúca GLP-1 zlúčeniny podľa vynálezu môže byť vyrobená rôznymi spôsobmi, vrátane spôso-
bov klonovania, ktoré boli opísané vyššie, rovnako ako chemickou syntézou DNA. Chemická syntéza môže
byť atraktívna, ak dĺžka kódovaného peptidu je malá. Pre GLP-1 bola publikovaná aminokyselinová sekven-
cia, rovnako ako sekvencia preproglukagónového génu. (Lopez a kol. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:
5485 – 5489, Bell a kol. (1983) Nature, 302: 716 – 718, Heinrich, G. a kol. (1984) Endocrinol., 115: 2176 až
2181, Ghigliione, M. a kol. (1984), Diabetológia 27: 599 – 600). Priméry teda môžu byť vytvorené pre PCR
natívne GLP-1 zlúčeniny a ich fragmenty.

Gén kódujúci fúzovaný proteín môže byť konštruovaný ligáciou DNA kódujúcej GLP-1 zlúčeninu s DNA
kódujúcou albumín alebo Fc proteín. Gén kódujúci GLP-1 zlúčeninu a gén kódujúci albumín alebo Fc proteín
môžu byť rovnako pripojené cez DNA kódujúcu linkerový peptid.

Funkcia a stabilita *in vivo* heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu môže byť zlepšená prida-
ním malých peptidových linkerov na prevenciu potenciálnych nežiaducich interakcií domén. Aj keď tieto
linkery môžu mať potenciálne akúkoľvek dĺžku a obsahovať akúkoľvek kombináciu aminokyselín, je výhod-
né, keď ich dĺžka nie je väčšia, než aká je nevyhnutná na prevenciu nežiaducich interakcií domén a/alebo op-
timalizáciu biologickej aktivity a/alebo stability. Všeobecne by linkery nemali obsahovať aminokyseliny
s extrémne veľkými vedľajšími reťazcami alebo aminokyseliny, spôsobilé zaviesť významnú sekundárnu
štruktúru. Je výhodné, aby linker bol bohatý serín-glycín a mal dĺžku kratšiu ako 30 aminokyselín. Je výhod-
nejšie, keď linker má dĺžku kratšiu ako 20 aminokyselín. Je dokonca ešte výhodnejšie, keď má linker dĺžku
kratšiu ako 15. Výhodný linker obsahuje opakovanie sekvencie Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. Je výhodné, keď má
medzi 2 až 6 opakovaniami tejto sekvencie. Je dokonca ešte výhodnejšie, keď má medzi 3 až 4 opakovaniami
sekvencie.

DNA kódujúca štandardný typ GLP-1, albumínu a Fc polypeptidu a ich fragmenty, môže byť mutovaná
buď pred ligáciou, alebo v kontexte cDNA, kódujúca celý fúzovaný proteín. V odbore je známych mnoho

mutagénnych techník. Napríklad mutagénna metóda PCR využíva predĺženie prekryvaného reťazca, aby sa vytvorili špecifické mutácie bázy s cieľom zmeniť špecifické aminokyselinové sekvencie v zodpovedajúcom proteíne. Táto PCR mutagenéza vyžaduje použitie štyroch primérov, dvoch v prednej orientácii (priméry A a C) a dvoch v zadnej orientácii (priméry B a D). Mutovaný gén sa zosilňuje zo vzorky štandardného typu v dvoch rôznych krokoch. Prvá reakcia zosilňuje gén pre každú polovicu zvlášť, že sa uskutočňuje reakcia A s B a zvláštna reakcia C s D, kde B a C priméry sú zamerané na oblasť génu, ktorý má byť mutovaný. Keď sa tieto priméry porovnávajú s cieľovou oblasťou, obsahujú nesprávne združené bázy, ktoré sa majú zmeniť. Len čo sú reakcie A s B a C s D dokončené, sú reakčné produkty izolované a zmiešané na použitie ako vzorka pre reakciu A s D. Výťažkom tejto reakcie je potom plne mutovaný produkt.

Len čo bol vyrobený gén kódujúci celý fúzovaný proteín, môže byť klonovaný do vhodného expresného vektora. Špecifické stratégie, ktoré môžu byť použité na vytvorenie GLP-1 fúzovaných proteínov podľa vynálezu sú opísané v príklade 1.

Všeobecné spôsoby rekombinantnej expresie heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu

Hostiteľské bunky sa transfektujú alebo transformujú opísanými expresnými alebo klonujúcimi vektormi na výrobu heterológneho fúzneho proteínu a kultivované v bežnom živnom roztoku upravenom na indukciu promótorov, výber transformantov alebo zosilnenie génov kódujúcich požadované sekvencie. Kultivačné podmienky, ako je prostredie, teplota, pH a podobne, môžu byť zvolené i stredne skúseným odborníkom v odbore bez nadmerného počtu experimentov. Všeobecne možno princípy, postupy a praktické techniky pre maximalizovanie výťažkov bunkových kultúr nájsť v publikácii *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) a Sambrook a kol., supra. Spôsoby transfekcie sú známe odborníkom v odbore, napríklad CaPO_4 a elektroporácia. Všeobecné aspekty systému transformácie hostiteľských buniek cicavcov boli opísané v U. S. Patente č. 4 399 216. Transformácia do produktu je obvykle uskutočňovaná podľa metódy Solingen a kol., *J. Bact.* 130 (2): 946 – 7 (1977) a Hsiao a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (8): 3892 – 33 (1979). Rovnako môžu byť použité ďalšie spôsoby na zavádzanie DNA do bunky, ako je jadrová mikroinjekcia, elektroporácia, fúzia bakteriálneho protoplastu s intaktnou bunkou alebo polykationmi, napríklad polybrén alebo polyomitín. Pre rôzne techniky transformácie buniek cicavcov pozri Keown a kol., *Methods in Enzymology* 185: 527 – 37 (1990) a Mansour a kol., *Nature* 336 (6197): 348 až 52 (1988).

Vhodné hostiteľské bunky na klonovanie a expresiu nukleových kyselín (napr. DNA) vo vektoroch tu zahŕňujú prokaryoty, kvasinky alebo vyššie eukaryotické bunky. Medzi vhodné prokaryoty patria (bez toho, aby bol výpočet týchto prokaryotov na tieto bunky obmedzený) eubaktérie, ako sú gramnegatívne alebo grampozitívne organizmy, napríklad *Enterobacteriaceae* ako je *E. coli*. Rôzne kmene *E. coli* sú bežne dostupné, ako napríklad *E. coli* K12 kmeň MM294 (ATCC 3 1.446), *E. coli* XI 776 (ATCC 3 1.537), *E. coli* kmeň W3 110 (ATCC 27.325) a K5 772 (ATCC 53.635). Medzi iné výhodné prokaryotické hostiteľské bunky patrí *Enterobacteriaceae*, ako je *Escherichia*, napr. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, napr. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, napr. *Serratia marcescens* a *Shigella*, rovnako ako *Bacilli*, ako je *B. subtilis* a *B. licheniformis* (napr. *B. licheniformis* 4 1 P opísaný v DD266,7 10, publikovaný 12. apríla 1989), *Pseudomonas*, ako je *P. aeruginosa* a *Streptomyces*. Tieto príklady sa skôr dajú považovať za ilustratívne ako za obmedzujúce. Obzvlášť výhodný ako hostiteľ alebo základný hostiteľ je kmeň W3110, pretože ide o najbežnejší hostiteľský kmeň na fermentáciu produktov rekombinantnej DNA. Hostiteľská bunka výhodne vylučuje minimálne množstvo proteolytických enzýmov. Napríklad preto, aby sa dosiahla genetická mutácia v génoch kódujúcich proteíny, endogénne proti hostiteľovi, môže byť modifikovaný kmeň W3 110, pričom príklady týchto hostiteľov zahŕňujú *E. coli* W3110 kmeň 1A2, ktorý má kompletný genotyp *ronA*, *E. coli* W3110 kmeň 9E4, ktorý má kompletný genotyp *ton4 ptr3*, *E. coli* W3 110 kmeň 27C7 (ATCC 55,244), ktorý má kompletný genotyp *tonA, ptr3 phoA EI5 (argF-lac) I69 degP ompT/can'*, *E. coli* W3110 kmeň 40B4, čo je kmeň 37D6 s delečnou mutáciou *degP* nerezistentnou proti kanamycínu, a *E. coli* kmeň, ktorý má mutovanú periplazmickú proteázu, opísanú v U. S. patente č. 4 946 783, vydanom 7. augusta 1990. Alternatívne sú vhodné spôsoby klonovania *in vivo*, napr. PCR alebo iné reakcie polymeráz nukleových kyselín.

Vhodnými klonujúcimi alebo expresnými hostiteľmi pre vektory fúzovaných proteínov sú okrem prokaryotov eukaryotické mikróby, ako sú vláknité huby alebo kvasinky. Najbežnejšie používaným nižším eukaryotickým hostiteľským mikroorganizmom je *Saccharomyces cerevisiae*. Medzi iné patrí *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature* 290: 140 – 3 (1981), EP 139 383 publikovaný 2. mája 1995), *Muyveromyces* (US Patent č. 4 943 529, Fleer a kol., *Bio/Technology* 9 (10): 968 – 75 (1991)), ako je napríklad *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574) (de Louvencourt a kol., *J. Bacteriol.* 154 (2): 737 – 42 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12, 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16, 045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906) (Van den Berg a kol., *Bio/Technology* 8 (2): 135 – 9 (1990)), *K. thermotolerans* a *K. marxianus*, *yarrowia* (EP 402 226), *Pichia pastoris* (EP 183 070) (Sreekrishna a kol., *J. Basic Microbiol.* 28 (4): 265 – 78 (1988)), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244 234), *Neurospora crassa*

(Case a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (10): 5259 – 63 (1979)), *Schwanniomyces* ako je *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394 538 publikované 31. októbra 1990) a vláknité huby, ako sú napr. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91,00357 publikované 10. januára 1991) a *Aspergillus* hostiteľ, ako je *A. nidulans* (Ballance a kol., Biochem. Biophys. Res. Comm. 112 (1): 284 – 9 (1983)), Tilburn a kol., Gen 26 (2 až 3): 205 – 21 (1983), Melton a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (5): 1470 – 4 (1984)) a *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. 4 (2): 475 – 9 (1985)). Metylotrofné kvasinky sú zvolené z rodov, medzi ktoré patrí *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* a *Rhodotoruia*. Zoznam špecifických druhov, ktorý je príkladom tejto triedy kvasiniek, možno nájsť v publikácii C. Antony, The Biochemistry of Methy-

lotrophs 269 (1982).

Vhodné hostiteľské bunky na expresiu fúzovaných proteínov podľa vynálezu sú odvodené od viacbunkových organizmov. Príklady buniek bezstavovcov sú bunky hmyzu, ako je *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sp. *Spodoptera* high5, rovnako ako rastlinné bunky. Príklady vhodných cicavčích hostiteľských bunkových línií sú vaječníky čínskeho škrečka (CHO) a COS bunky. Konkrétnejšími príkladmi sú línie CV1 z opičích obličiek, transformovaná SV 40 (COS-7, ATCC CRL 1651), línia z obličiek ľudských embryí (293 alebo 293

bunky subklonované pre rast v suspenznej kultúre, Graham a kol., J. Gen Virol., 36 (1): 59 – 74 (1977)), bunky vaječníkov čínskeho škrečka/DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (7): 4216 – 20 (1980)), bunky myši (sertoli) (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 (1): 243 – 52 (1980)), ľudské pľúcne bunky (W138. ATCC CCL 75), ľudské pečene bunky (Hep G2, HB 8065) a tumor myšej prsnej žľazy (MMT 060562, ATCC CCL 51). Domnievame sa, že výber vhodnej hostiteľskej bunky je pre odborníka v odbore ľahký.

Fúzny proteín podľa vynálezu môže byť rekombinantne vyrobený priamo alebo ako proteín, ktorý má signálnu sekvenciu alebo iné ďalšie sekvencie, ktoré tvoria špecifické štiepne miesto na N-zakončení zrelého fúzneho proteínu. Všeobecne môže byť signálna sekvencia zložkou vektora alebo môže byť časťou DNA kódujúcou fúzovaný proteín, ktorá je zavedená do vektora. Signálna sekvencia môže byť prokaryotická signálna sekvencia vybraná napríklad zo skupiny, do ktorej patrí alkalická fosfatáza, penicilináza, Ipp alebo tepelne stabilné enterotoxinové II zavádzace. Na vylučovanie kvasiniek môže byť signálnou sekvenciou napr. zavádzač kvasinkovej invertázy, zavádzač a faktora (vrátane zavádzačov *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* α -faktoru, pričom druhý zavádzač je opísaný v U. S. Patente č. 5 010 182) alebo zavádzač kyslej fosfatázy, zavádzač glukoamylázy *C. albicans* (EP 362 179) alebo signál, opísaný v publikácii WO 90/13 646. Pri expresii cicavčích buniek môžu byť použité na kontrolu vylučovania proteínu cicavčie signálne sekvencie, ako sú signálne sekvencie z vylučovaných polypeptidov rovnakých alebo príbuzných druhov, rovnako ako vylučovanie zavádzače vírusov.

Expresné i klonovacie vektory obsahujú sekvenciu nukleovej kyseliny, ktorá umožňuje, aby sa vektor replikoval v jednej vybranej hostiteľskej bunke alebo viacerých vybraných hostiteľských bunkách. Takéto sekvencie sú dobre známe pre rôzne baktérie, kvasinky a vírusy. Pre väčšinu gramnegatívnych baktérií je vhodný počiatok replikácie z plazmidu pBR322, počiatok z plazmidu 2u je vhodný pre kvasinky a pre klonujúce vektory v cicavčích bunkách sú vhodné počiatky z rôznych vírusov (SV40, polyoma, adenovírus, VSV alebo BPV).

Expresné a klonovacie vektory obvykle obsahujú selekčný gén, rovnako označovaný ako voliteľný marker. Obvyklé selekčné gény kódujú proteíny, ktoré (a) dávajú rezistenciu antibiotikám alebo iným toxínom, napr. ampicilínu, neomycínu, metotrexatu alebo tetracyklínu, (b) vyrovnávajú autotrofné nedostatky alebo (c) dodávajú nevyhnutné živiny, ktoré nie sú dostupné v komplexnom médiu, napr. gén kódujúci D-alanín receptora pre mikroorganizmy *Bacillus*.

Príkladom vhodných voliteľných markerov pre cicavčie bunky sú tie, ktoré sú schopné rozpoznať bunky spôsobilé prevziať nukleovú kyselinu kódujúcu fúzovaný proteín, ako je DHFR alebo tymidínkináza. Pokiaľ je použitý štandardný typ DHFR, je vhodnou hostiteľskou bunkou bunková línia CHO s nedostatočnou aktivitou DHFR, vyrobená a šírená, ako je opísané (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7): 4216 až 20 (1980)). Vhodným selekčným génom na použitie v kvasinkách je trpí gén prítomný v kvasinkovom plazmide YRp7 (Stinchcomb a kol., Nature 282 (5734): 39 – 43 (1979), Kingsman a kol., Gen 7 (2): 141 – 52 (1979), Tschumper a kol., Gen 10 (2): 157 – 66 (1980)). Tento trpí gén uskutočňuje selekčný marker pre mutovaný kmeň kvasiniek, ktorým chýba schopnosť rastu v tryptofáne, napríklad ATCC č. 44076 alebo PEPC1 (Jones, Genetics 85: 23 – 33 (1977)).

Expresné a klonovacie vektory obvykle obsahujú promótor operabilne napojený na sekvenciu nukleovej kyseliny kódujúcej fúzovaný proteín, aby riadil syntézu mRNA. Promótory rozpoznávané radom potenciálnych hostiteľských buniek sú dobre známe. Medzi promótory vhodné na použitie s prokaryotickými hostiteľmi patrí β -laktamáza a laktózové promótorové systémy (Chang a kol., Nature 275 (5681): 617 – 24 (1978), Goeddel a kol., Nature 281 (5732): 544 – 8 (1979)), alkalická fosfatáza a tryptofán (up) promótorový systém (Goeddel, Nukleic Acids Res. 8 (18): 4057 – 74 (1980), EP 36 776 publikovaný 30. septembra 1981), a hybridné promótory, ako je tento promótor (deBoer a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1): 21 – 5 (1983)). Promótory na použitie v bakteriálnych systémoch tiež obsahujú sekvenciu Shine-Dalgarno (S. D.) operabilne

naviazanú na DNA kódujúcu fúzovaný proteín.

Medzi príklady vhodných promótorových sekvencií na použitie s kvasinkovými hosťiteľmi patrí 3-fosfoglycerátkináza (Hitzeman a kol., J. Biol. Chem. 255 (24): 12073 – 80 (1980)) alebo iné glykolytické enzýmy [Hess a kol., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry 17 (23): 49007 (1978)], ako sú eno-

láza, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, hexokináza, pyruvátdekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukóza-6-fosfátizomeráza, 3-fosfoglycerátmutáza, pyruvátkináza, triosofosfátizomeráza, fosfoglukózoizomeráza a glukokináza.

Iné kvasinkové promótory, ktoré sú indukovateľnými promótorami, ktoré majú ďalšie výhody spočívajúce v transkripcii riadenou rastovými podmienkami, sú promótorové regióny pre alkoholdehydrogenázu 2, izocytochróm C, kyslík fosfatázu, degradatívne enzýmy spojené s metabolizmom dusíka, metallotioneín, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu a enzýmy zodpovedné za využitie maltózy a galaktózy. Vhodné vektory a promótory použiteľné na expresiu kvasiniek sú ďalej opísané v EP 73 657. Transkripcia mRNA kódujúca fúzovaný proteín z vektorov v cicavčích hosťiteľských bunkách môže byť riadená napríklad promótorami, získanými z genómov vírusov, ako sú vírus polyómu, vírus chrípky hydiny, adenovírus, (ako je Adenovírus 2), vírus bovinného papillomu, vírus vtáčieho sarkómu, cytomegalovírus a retrovírus, vírus hepatitídy B a Simian Vírus 40 (SV 40), z heterológnych cicavčích promótorov, napr. aktinový promótor alebo imunoglobulínový promótor a promótory vzniknuté tepelným šokom, za podmienky, že takéto promótory sú kompatibilné so systémom hosťiteľskej buky.

Transkripcia polynukleotidu, kódujúceho fúzovaný proteín vyššími eukaryotmi môže byť zvýšená vložením zosilňovacej sekvencie do vektora. Zosilňovače sú elementy DNA pôsobiace cis mechanizmom, obvykle od 10 do 300 bp, ktoré pôsobia na promótor tak, že zvyšujú jeho transkripciu. Z cicavčích génov je známych mnoho zosilňovacích sekvencií (globín, elastáza, albumín, a-ketoproteín a inzulín). Obvykle sa v tomto prípade použije zosilňovač z vírusu eukaryotických buniek. Medzi príklady patrí zosilňovač SV40 na poslednom replikačnom mieste (bp 100-270), skorý promótor zosilňovač SV40 na poslednom replikačnom mieste (bp 100-270, skorý zosilňovač promótoru cytomegalovírusu, zosilňovač polyómu na poslednom mieste replikačného počiatku a zosilňovač adenovírusu. Zosilňovač môže byť zapojený do vektora v pozícii 5' alebo 3' kóduvacej sekvencie fúzneho proteínu, ale je výhodne umiestnený na mieste 5' od promótoru.

Expresné vektory používané v eukaryotických hosťiteľských bunkách (kvasinky, huby, hmyz, rastliny, zvieratá, človek alebo bunky s jadrom z iných mnohobunkových organizmov) tiež obsahujú sekvencie nutné na ukončenie transkripcie a na stabilizáciu mRNA. Takéto sekvencie ale sú všeobecne dostupné z 5' a prípadne 3' netranslantovaných regiónov eukaryotov alebo DNA alebo cDNA vírusov. Tieto regióny obsahujú nukleotidové segmenty transkribované ako polyadenylované fragmenty v netranslatovanej časti mRNA kódujúcej fúzovaný proteín.

Z kultivačného média alebo lyzátov hosťiteľských buniek môžu byť získané rôzne formy fúzovaných proteínov. Pokiaľ sú viazané na membránu, môžu z nej byť uvoľnené s použitím vhodného roztoku detergentu (napr. Triton-X 100) alebo enzymatickým štiepením. Bunky využívané pri expresii fúzneho proteínu môžu byť porušené rôznymi fyzikálnymi alebo chemickými prostriedkami, ako je cyklus zmrazovania a rozmrazovania, pôsobenie ultrazvuku, mechanické rozrušenie alebo činidlá na lýzu buniek.

Čistenie heterológnych fúzných proteínov podľa vynálezu:

Len čo sú heterológne fúzne proteíny exprimované v zodpovedajúcej hosťiteľskej bunke, je možné izolovať a čistiť analógy. Vhodnými čistiacimi procedúrami sú: frakcionácia na karboxymetylcelulóze, gélová filtrácia, napr. na Sephadex G-75, aniónová výmena v živici, napríklad na DEAF alebo Mono-Q, kationová výmena napríklad na CM alebo Mono-S, proteín A sefaróza na odstránenie kontaminantov, napríklad IgG, kovové chelatačné kolóny, ktoré viažu epitopom značené formy polypeptidu, HPLC s reverznou fázou, chromatofokusácia, silikagél, zrážanie etanolom a zrážanie síranom amónnym.

Na čistenie proteínov môže byť použitý rad spôsobov a tieto metódy sú známe v odbore a sú opísané napríklad v Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83 – 9 (1990) a Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982). Vybraný(é) čistiaci krok(y) závisia od povahy vybraného spôsobu výroby a konkrétneho vyrábaného fúzneho proteínu. Napríklad, fúzne proteíny obsahujúce Fc fragment môžu byť účinne čistené s použitím matrice afinity Protein A alebo Protein G. Na elúciu fúzneho proteínu z afinitnej matrice možno použiť pufr s nízkym alebo vysokým pH. Mierne elučné podmienky napomáhajú predchádzaniu nevratnej denaturácie fúzneho proteínu. Rovnako môžu byť použité pufr obsahujúce imidazol. Príklad 3 opisuje niektoré úspešné čistiace protokoly pre fúzne proteíny podľa vynálezu.

Charakterizácia heterológnych fúzných proteínov podľa vynálezu:

Na charakterizáciu fúzných proteínov podľa vynálezu existuje rad spôsobov. Medzi tieto spôsoby patrí: SDS-PAGE spojená s metódami farbenia proteínu alebo imunobloting s použitím anti-IgG alebo anti-HSA protilátky. Iné spôsoby zahŕňujú maticou asistovanú laserovú desorpciu/ionizačnú hmotnostnú spektrometriu (MALDI-MS), kvapalinovú chromatografiu/hmotnostnú spektrometriu, izoelektrickú fokusáciu, analyt-

kú výmenu aniónov, chromatofokusáciu a cirkulárny dichroizmus, čo je iba stručný výpočet. Reprezentatívne množstvo heterológnych fúzovaných proteínov bolo charakterizované s použitím metódy SDS-PAGE spojené s imunoblotingom, rovnako ako hmotnostnou spektrometriou (pozri príklady 4 a 5 a obrázok 3 a 4).

5 Napríklad tabuľka 3 (pozri príklad 5) ilustruje výpočet molekulárnej hmotnosti reprezentatívneho počtu fúzných proteínov a rovnako tak hmotnosť stanovenú hmotnostnou spektrometriou. Okrem toho obrázky 3 a 4 ilustrujú molekulárne hmotnosti reprezentatívneho počtu fúzných proteínov, ako boli stanovené metódou elektroforézy na polyakrylamidovom géle (SDS PAGE). Všetky skúšané heterológne fúzne proteíny boli okamžite exprimované a vylučované. Aby boli získané proteíny s presným N-zakončením, bola štiepená signálna sekvencia Igx.

10 Ďalej tabuľka 3 ilustruje, že v niektorých prípadoch je hmotnosť stanovená hmotnostnou spektrometriou väčšia než očakávaná. To je dôsledkom glykozylácie Fc časti a predĺženia C-zakončenia. Enzymatická digestia fúzovaných proteínov nasledovaná HPLC s rezervnou fázou a hmotnostnou spektrometriou môže identifikovať peptidové frakcie, ktoré obsahujú sacharidové skupiny. Tieto frakcie potom môžu byť N-koncovými aminokyselinami sekvencované, aby sa identifikovalo potenciálne glykozylačné miesto. Napríklad charakterizácia Exendínu-4-Fc (SEQ ID NO: 29) ukazuje, že serín v pozícii 39 a treonín v pozícii 50 má glykozylovanú O-väzbu a asparagín v pozícii 122 má glykozylovanú N-väzbu.

15 Reprezentatívny počet GLP-1 fúzovaných proteínov bol tiež skúšaný na aktivitu. Na detekciu GLP-1 aktivity *in vitro* a *in vivo* existuje rad metód (pozri príklady 6, 7, 8 a 9). Tabuľka 4 (príklad 6) ilustruje aktivitu GLP-1 receptora spojeného s niekoľkými GLP-1 fúziami. Čísla sú vyjadrené relatívne k aktivite, spojené s Val⁸-GLP-1(7-37)OH. Všetky testované fúzne proteíny mali aktivitu GLP-1 receptora. Nízka hodnota aktivity *in vitro* neznamena nutne slabý efekt *in vivo*. Vzhľadom na výrazné zvýšenie polčasu životnosti pri týchto fúzovaných proteínov neznamena malá aktivita *in vitro* všeobecne predpoveď malej účinnosti *in vivo*. Obrázok 7 a príklad 7 ilustrujú predĺžený čas životnosti, spojený s fúzovanými proteínmi podľa vynálezu. Napríklad, Val⁸-GLP-1-Fc má polčas životnosti u opíc približne 45 hodín, Val⁸-GLP-1-HSA má polčas životnosti u opíc približne 87 hodín, Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 má polčas životnosti po IV podávaní u psov približne 55 hodín a Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 má polčas životnosti po podávaní subkutánne u psov približne 38 hodín.

Zmesi podľa vynálezu:

30 Podstatným znakom liečivých proteínových prípravkov je tiež fyzikálna stabilita. GLP-1 zlúčeniny je ťažké vyrobiť a formulovať v dôsledku štrukturálnych zmien, ktoré sa objavujú v priebehu výroby. Napríklad niektoré GLP-1 zlúčeniny majú všeobecne sklon k zhlukovaniu. Navyše bolo ukázané, že niektoré GLP-1 zlúčeniny konvertujú z rozpustnej a účinnej α -helixovej formy na nerozpustnú potenciálne neúčinnú β -vrstvou. Fúzia GLP-1 zlúčenín na veľké proteíny, ako je Fc región IgG alebo albumínu, neprispieva len k predĺženiu polčasu životnosti GLP-1 zlúčeniny, ale tiež prispieva k fyzikálnej a konformačnej stabilite GLP-1 zlúčeniny. Napríklad, Val⁸-GLP-1-Linker-HSA v PBS je stabilný pri 37 °C počas približne až 30 dní.

35 Heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu môžu byť formulované s jednou prísadou alebo viacerými prísadami. Účinné fúzne proteíny podľa vynálezu môžu byť kombinované s farmaceuticky prijateľným pufróm a pH upraveným na takú hodnotu, ktorá zaistí prijateľnú stabilitu a pH prijateľné na podávanie, ako je parenterálne podávanie.

40 Prípadne môže byť pridaný jeden farmaceuticky prijateľný antimikrobiálny prostriedok alebo viac farmaceuticky prijateľných antimikrobiálnych prostriedkov. Výhodnými farmaceuticky prijateľnými mikrobiálnymi prostriedkami sú meta-krezol a fenol. Na upravenie iónovej sily a tonicity môže byť pridaná jedna farmaceuticky prijateľná soľ alebo viac farmaceuticky prijateľných solí. Na ďalšiu úpravu izotonicity prípravku môže byť pridaná jedna prísada alebo viacero prísad. Príkladom prísady, ktorá upravuje izotonicitu, je glycerín. Farmaceuticky prijateľné znamená, že tento prostriedok je vhodný na podávanie ľuďom alebo iným živočíchom, a teda neobsahuje toxické prvky alebo nežiaduce kontaminanty a neruší v nich účinnosť aktívnych zložiek.

50 V tomto vynáleze sa dá použiť farmaceuticky prijateľná soľná forma heterológnych fúzovaných proteínov podľa vynálezu. Bežne používanými kyselinami na výrobu adičných solí s kyselinami sú anorganické kyseliny, ako je kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina jodovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná a podobne, a organické kyseliny, ako je p-toluénsulfónová kyselina, metánsulfónová kyselina, kyselina šťaveľová, p-brómfenylsulfónová kyselina, kyselina uhličitá, kyselina jantárová, kyselina citrónová, kyselina benzoová, kyselina octová a podobne. Výhodné adičné soli s kyselinami sú tie, ktoré tvoria minerálne kyseliny, ako je kyselina chlorovodíková a bromovodíková.

55 Medzi adičné soli s bázami patria tie, ktoré sú odvodené od anorganických zásad, ako sú hydroxidy, uhličitany, hydrogenuhličitany amónne, alkalické alebo kovov alkalických zemín a podobne. Zásady používané na výrobu solí podľa vynálezu zahŕňujú hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid amónny, uhličitán draselný a podobne.

60

Podávanie zmesí:

Podávanie môže byť uskutočnené akoukoľvek cestou, o ktorej je i stredne skúsenému lekárovi známe, že je účinná. Metódy podávania môžu byť vonkajšie a vnútorné. Parenterálnym podávaním sa všeobecne v lekárskej literatúre rozumie injekcia dávky do tela sterilnou striekačkou alebo iným mechanickým zariadením, ako je infúzna pumpa. Periférne parenterálne cesty zahŕňujú intravenózne, intramuskulárne, subkutánne a intraperitoneálne cesty podávania.

Heterológne fúzne proteíny podľa vynálezu môžu byť rovnako podávané orálne, rektálne, nazálne, nižšími dýchacími cestami, čo sú neparenterálne cesty. Medzi týmito neparenterálnymi cestami je výhodná cesta cez nižšie dýchacie cesty a orálna cesta.

Fúzne proteíny podľa vynálezu môžu byť použité na liečenie radu ochorení a stavov. Fúzne proteíny podľa vynálezu primárne prejavujú svoj biologický účinok pôsobením na receptor, o ktorom sa tu hovorí ako o GLP-1 receptore. Subjekty s chorobami a/alebo stavmi potom odpovedajú na stimuláciu GLP-1 receptora alebo na podávanie GLP-1 zlúčeniny priaznivo a môžu tak byť liečené pomocou GLP-1 fúzovaných proteínov podľa vynálezu.

O týchto subjektoch sa hovorí ako o tých, ktoré potrebujú liečenie Glp-1 zlúčeninami alebo potrebujú stimuláciu GLP-1 receptora. Medzi tieto subjekty patria subjekty s diabetom, ktorý nevyžaduje liečbu inzulínom, diabetes, ktorý vyžaduje liečbu inzulínom (pozri WO 00/16797), infarkt myokardu (pozri WO 98/08531), obezita (pozri WO 8/19698), katabolické zmeny po chirurgickom zásahu (pozri U. S. Patent č. 6 006 753), funkčné dyspepsie a syndróm dráždivého tračníka (pozri WO 99/64060). Medzi subjekty rovnako patria tie, ktoré potrebujú profylaktickú liečbu GLP-1 zlúčeninami, napr. subjekty, u ktorých je nebezpečie, že sa u nich vyvinie diabetes nezávislý od inzulínu (pozri WO 00/07617). Medzi subjekty, u ktorých je riziko rozvinutia diabetes nezávislého od inzulínu, patria subjekty s porušenou toleranciou glukózy alebo s poruchou glykémie, subjekty, ktorých telesná hmotnosť je o približne 25 % nad normálnou telesnou hmotnosťou, zodpovedajúcou výške a telesnej stavbe subjektu, ďalej subjekty s čiastočnou pankreatektómiou, subjekty, ktorých jeden rodič alebo obaja rodičia mali diabetes nezávislý od inzulínu, subjekty s tehotenským diabetom a subjekty s akútnou alebo chronickou pankreatitídou.

Účinné množstvo GLP-1 zlúčeniny je množstvo, ktoré má za následok požadovaný liečebný a/alebo profylaktický účinok, bez toho, aby spôsobil nežiaduce vedľajšie účinky pri podávaní subjektu, ktorý potrebuje stimuláciu GLP-1 receptora. Požadovaný terapeutický účinok predstavuje jeden dej alebo viac nasledujúcich dejov: 1) zlepšenie príznakov spojených s chorobou alebo stavom, 2) zdržanie nástupu príznakov spojených s chorobou alebo stavom, 3) predĺženie dĺžky života pri porovnaní s absenciou liečby a 4) vyššia kvalita života pri porovnaní s absenciou liečby. Napríklad účinné množstvo GLP-1 zlúčeniny na liečenie diabetu je množstvo, ktoré môže mať za následok lepšie riadenie koncentrácie krvnej glukózy v porovnaní s absenciou liečby, v dôsledku čoho dôjde k oneskorenému nástupu komplikácií diabetu, ako je retinopatia, neuropatia alebo choroby obličiek. Účinné množstvo GLP-1 zlúčeniny pri prevencii diabetu je množstvo, ktoré spomalí v porovnaní so situáciou, keď sa nelieči, nástup vyšších hladín krvnej glukózy, ktoré vyžadujú liečenie pomocou antihypoglykemických liečiv, ako sú sulfonylmočoviny, tiazolidíndióny, inzulín a/alebo bisguanidíny.

Dávka fúzneho proteínu, ktorá je dostatočná na normalizáciu hladiny glukózy, závisí od mnohých faktorov, medzi ktoré patrí, bez toho, aby na ne boli obmedzené, pohlavie subjektu, váha a vek, závažnosť neschopnosti regulovať krvnú glukózu, spôsob podávania a biologická dostupnosť, farmakokinetický profil fúzneho proteínu, účinnosť a formulácia.

Tento vynález zahŕňa GLP-1 zlúčeniny, ktoré majú zlepšené biochemické a biofyzikálne vlastnosti vďaka tomu, že sú fúzované na albumínový proteín, albumínový fragment, albumínový analóg, Fc proteín, Fc fragment, alebo Fc analóg. Tieto heterológne proteíny môžu byť úspešne exprimované v hostiteľskej bunke, pričom zachovávajú signálnu aktivitu spojenú s aktiváciou GLP-1 receptora a majú predĺžený polčas životnosti.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady sú uvádzané s takým cieľom, aby bol opísaný tento vynález. Rozsah tohto vynálezu sa neobmedzuje na tieto príklady. Odborník v odbore rozpozná, že konkrétne opísané reakčné činidlá, zariadenia a postupy sú iba ilustratívne a nie sú mienené tak, že by mali obmedzovať v nejakom smere rozsah vynálezu akýmkoľvek spôsobom.

Príklad 1: Konštrukcia DNA kódujúca heterológne fúzne proteíny

Príklad 1a: Konštrukcia DNA kódujúca Val⁸-GLP-1(7-37)Fc

Podiel Fc ľudského IgG1 bol izolovaný z knižnice cDNA a obsahoval plný pantový región a CH₂ a CH₃ domény. Fragment obsahujúci 696 párových báz tohto Fc podielu ľudského IgG1 bol subklonovaný do miest NheI a Eco47III cicavčieho expresného vektora pJB02, aby sa vytvoril pJB02/Fc (pozri obrázok 5). DNA

kódujúca IgK sekrečnú signálnu sekvenciu fúzanú na Val⁸-GLP-1(7-37) bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou štyroch prekrývajúcich sa a komplementárnych oligonukleotidov:

5'-CTAGCCACCAT~GAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTC
TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAAGT-3' (SEQ ID NO: 12)

5'-GAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTGGAGGGCCAGGC
CGCCAAGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGAAGAGGC-3' (SEQ ID
NO: 13)

5'-TGAAGGTGCCCTCCACGTGGTCACCAAGTGGAACTGGAACCCAGAGCA
GCAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTGG-3' (SEQ ID NO:
14)

5'-GCCTCTTCCCTTACCAGCCAGGCGATGAAGTCTTGGCGGCCTGGCC
CTCCAGATAGGAGGACACGTCCGAGG-3' (SEQ ID NO: 15)

5 Hybridizačná reakcia bola uskutočnená s použitím ekvivalentných množstiev každého oligonukleotidu (pri konečnej koncentrácii 1 pm/μl každého oligonukleotidu). Zmes oligonukleotidov bola zahrievaná 5 min pri 100 °C v ligačnom pufri (50 mmol Tris-HCl, pH 7,5, 10 mmol MgCl₂, 10 mmol DTT, 1 mmol ATP, 25 μg/ml albumín bovinného séra), a potom chladený počas najmenej 2 hodín na 30 °C.

10 Výsledný hybridizačný produkt bol ligovaný počas 2 hodín pri izbovej teplote alebo cez noc pri 16 °C k pJB02/Fc hlavnému reťazcu vektora, ktorý bol digestovaný pomocou NheI a Eco47III. Produkty ligácie boli potom použité, aby sa transformovali vhodné modré bunky XL-1 (Stratagen). Rekombinantné plazmidy boli vyšetřované na prítomnosť peptidu kódujúceho inzerty natrávením klonov pomocou NcoI (kódujúca sekvencia Kozak a prvý Met signálneho peptidu) a sekvencované. Výsledný expresný plazmid, použitý pre transfekčné testy, bol označený pJB02-V8-GLP-1-Fc (obrázok 5).

15 Príklad 1b: Konštrukcia DNA kódujúca Val⁸-GLP-1(7-37)HSA

Plazmid HSA/pcDNA3.1GS bol získaný od Invitrogen (Catalog # H-M12523M-pcDNA3.1/GS) a použitý ako šablóna na izoláciu cDNA kódujúcej albumín ľudskeho séra (HSA). cDNA HSA bola pripravená s použitím PCR, kde boli z konca 5' odstránené DNA kódujúce hlavnú sekvenciu, rovnako ako pro-peptid so šiestimi aminokyselinami. Navyše boli pridané stop kodóny priamo na koniec 3' HSA kódovacej sekvencie. Na-
20 koniec boli na koncoch 5' a 3' vytvorené miesta reštrikčných enzýmov, aby sa docielilo klonovanie. DNA sekvencia HSA prítomná v pôvodnom vektore, získanom od firmy Invitrogen, obsahovala samostatnú bázu zmenenú v regióne 3' génu (pozícia 667), v porovnaní s natívnou ľudskou sekvenciou. Táto zmena má za následok vznik kodónu pre Asn namiesto Asp. Použitím diskutovanej PCR mutagénnej metódy s prekryvom reťazcov bol teda kodón zmenený tak, aby kódoval Asp na tejto pozícii. Výsledný HSA kódujúci DNA bol
25 klonovaný na NheI a HindIII miesta pJB02, aby vzniklo pJB02-HSA (obrázok 6).

Hlavná sekvencia Igκ fúzaná na Val⁸-GLP-1(7-37) sekvenciu bola vytvorená, ako bolo uvedené v príklade 1a. Táto DNA bola ligovaná na NheI a FspI miesta pJB02-HSA, aby vznikol pJB02-Val⁸-GLP-1-HSA.

Príklad 1c: Konštrukcia DNA kódujúca Val⁸-GLP-1(7-37) linker-HSA

30 Vektor pJB02-HSA bol pripravený, ako bolo uvedené v príklade 1b. DNA kódujúca linkerovú sekvenciu (GGGGS)₃ bola ligovaná v rámci na 5' koniec HSA kódujúci DNA, aby vznikol pJB02-linker-HSA (obrázok 7). DNA kódujúca hlavnú sekvenciu Igκ a fúzaná na sekvenciu Val⁸-GLP-1(7-37) a 5' časť linkerovej sekvencie bola vytvorená, ako bolo uvedené v príklade 1a. Táto DNA bola ligovaná na NheI a BspEI miesta pJB02, aby vznikol pJB02-Val⁸-GLP-1-linker-HSA.

35

Príklad 1d: Konštrukcia DNA kódujúca Exendín-4-Fc

Plazmid pJB02/Fc bol pripravený, ako je opísané v príklade 1a. DNA kódujúca Igκ signálnu sekvenciu, fúzanú na Exendín-4, bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou nasledujúcich prekrývajúcich sa a komplementárnych oligonukleotidov:

5'- CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTC
TGGGTTCCAGGTTCCACCGGTAC-3' (SEQ ID NO: 16)

5'- GGAGAGGGAACCTTCACCAGCGACCTGAGCAAGCAGATGGAGGAGG
AGGCCGTGAGACTG-3' (SEQ ID NO: 17)

5'- TTCATCGAGTGGCTGAAGAACGGAGGACCAAGCAGCGGAGCCCCCTCC
TCCTAGC-3' (SEQ ID NO: 18)

5'- GAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGT
CTCCATGGTGG-3' (SEQ ID NO: 19)

5'- CTCCTCCTCCATCTGCTTGCTCAGGTCGCTGGTGAAGGTTCCCTCTCC
GTGACCGGTG-3' (SEQ ID NO: 20)

5'- GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTTGGTCCTCCGTTCTTCAGCCACT
CGATGAACAGTCTCACGGC-3' (SEQ ID NO: 21)

Hybridizačná reakcia bola uskutočnená, ako je opísané v príklade 1a. Hybridizovaný produkt bol ligovaný na pJB02 vektor, ktorý bol natrávený pomocou NheI a Eco47III, ako je opísané v príklade 1a, aby vznikol pJB02-Exendín-4-Fc.

5

Príklad 1e: Konštrukcia DNA kódujúca Exendín-4-HSA

Plazmid pJB02-HSA bol pripravený, ako je opísané v príklade 1b. DNA kódujúca Igκ signálnu sekvenciu, fúzanú na Exendín-4, bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou rovnakých prekryvajúcich sa a komplementárnych oligonukleotidov, ako sú opísané v príklade 1d. Hybridizačné reakcie boli rovnako uskutočňované, ako je opísané vyššie. DNA bola klonovaná na unikátne NheI a FspI miesta v pJB02-HSA, aby vznikol pJB02-Exendín-4-HSA.

10

Príklad 1f: Konštrukcia DNA kódujúca Exendín-4-linker-HSA

Plazmid pJB02-linker-HSA bol konštruovaný, ako je opísané v príklade 1c. DNA kódujúca Igκ signálnu sekvenciu, fúzanú na Exendín-4 a 5' časť linkerovej sekvencie, bola vytvorená ako v príklade 1d. Táto DNA bola klonovaná na unikátne NheI a BspEI miesta v pJB02-linker-HSA, aby vznikol pJB02-Exendín-4-linker-HSA.

15

Príklad 1g: Konštrukcia DNA kódujúca Val⁸-GLP-1/C-Ex-Fc

Plazmid pJB02-Exendín-4-Fc bol pripravený, ako je opísané v príklade 1d. Exendín-4 kódujúci DNA bol odstránený z vektora pomocou AgeI a Eco47III. Val⁸-GLP-1/C-Ex kódujúca DNA bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou nasledujúcich prekryvajúcich sa a komplementárnych oligonukleotidov:

20

5'- CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTGG
AGGGCCAGGCCGCCA-3' (SEQ ID NO: 22)

5'- AGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGCAGCAGCGGAGC
CCCTCCTCCTAGC-3' (SEQ ID NO: 23)

5'- CTCCAGATAGGAGGACACGTCGGAGGTGAAGGTGCCCTCCACGTGA-

3' (SEQ ID NO: 24)

5'- GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTGCCCCGGCCCTTCACCAGCCAG

GCGATGAATTCCTTGGCGGCCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 25)

Hybridizačná reakcia bol uskutočnená, ako je opísané v príklade 1a. Hybridizovaný produkt bol ligovaný na mieste Exendínu-4 v pJB02-Exendín-4-Fc expresnom vektore, aby vznikol pJB02-Val⁸-GLP-1/C-Ex-Fc.

- 5 Príklad 1h: Konštrukcia DNA kódujúca Val⁸-Glu²²-GLP-1-Fc

Plazmid pJB02-Exendín-4-Fc bol pripravený, ako je opísané v príklade 1d. Exendín-4 kódujúca DNA bola odstránená z vektora pomocou Agel a Eco47III. Val⁸-Glu²²-GLP-1 kódujúca DNA bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou nasledujúcich prekrývajúcich sa a komplementárnych oligonukleotidov:

5'-CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTCG

AGGAGCAGGCCGCCA-3' (SEQ ID NO: 26)

5'-AGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGC-3' (SEQ ID NO: 27)

5'-GCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGCCTGCTC-3' (SEQ ID NO: 28)

5'-CTCGAGATAGGAGGACACGTCCGAGGTGAAGGTGCCCTCCACGTGA-3' (SEQ ID NO: 29)

- 10 Hybridizačná reakcia bola uskutočnená, ako je opísané v príklade 1a. Hybridizovaný produkt bol ligovaný v mieste Exendínu-4 v pJB02-Exendín-4-Fc expresného vektora, aby vznikol pJB02-Val⁸-Glu²²-GLP-1-Fc.

Príklad 1i: Konštrukcia DNA kódujúca Val⁸-Glu²²-GLP-1/CEX-Fc

- 15 Plazmid pJB02-Exendín-4-Fc bol pripravený, ako je opísané v príklade 1d. Exendín-4 kódujúca DNA bola vyseknutá z vektora pomocou Agel a Eco47III. Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex kódujúca DNA bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou nasledujúcich prekrývajúcich a komplementárnych oligonukleotidov:

5'- CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTCG

AGGAGCAGGCCGCCA-3' (SEQ ID NO: 30)

5'- AGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGCAGCAGCGGAGCCCTCCTCCTAGC-3' (SEQ ID NO: 31)

5'-CTCGAGATAGGAGGACACGTCCGAGGTGAAGGTGCCCTCCACGTGA-3' (SEQ ID NO: 32)

5'- GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTGCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAATTCCTTGGCGGCCTGCTC-3' (SEQ ID NO: 33)

- 20 Hybridizačná reakcia bola uskutočnená, ako je opísané v príklade 1a. Hybridizovaný produkt bol ligovaný v mieste Exendínu-4 v pJB02-Exendín-4-Fc expresnom vektore, aby vznikol pJB02-Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex-Fc.

Príklad 1j: Konštrukcia DNA kódujúca Gly⁸-GLP-1-Fc

- 25 Plazmid pJB02-Exendín-4-Fc bol pripravený, ako je opísané v príklade 1d. Exendín-4 kódujúca DNA bola odstránená z vektora pomocou Agel a Eco47III. Gly⁸-GLP-1 kódujúca DNA bola vytvorená *in vitro* hybridizáciou nasledujúcich prekrývajúcich sa a komplementárnych oligonukleotidov:

5'-CCGGTCACGGCGAGGGCACCTTCACTAGTGACGTGTCCTCCTATCTGG
AGGGCCAGGCCGCCA-3' (SEQ ID NO: 34)

5'-AGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGC-3' (SEQ ID NO:
35)

5'-CTCCAGATAGGAGGACACGTCACTAGTGAAGGTGCCCTCGCCGTGA-3'
(SEQ ID NO: 36)

5'-GCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACCTCCTTGGCGGCCTGG
CC-3' (SEQ ID NO: 37)

Hybridizačná reakcia bola uskutočnená, ako bolo opísané v príklade 1a. Hybridizovaný produkt bol ligo-
vaný v mieste Exendínu-4 v expresnom vektore pJB02-Exendín-4-Fc, aby vznikol pJB02-Gly⁸-GLP-1-Fc.

5

Príklad 2: Expresia heterológnych fúzných proteínov

Expresia fúzovaných proteínov kódovaných DNA, konštruovaných v príklade 1, bola uskutočnená pre-
chodnými transfektnými bunkami HEK 293EBNA (ako prisadnuté, tak v suspenzii). Bunky boli počítané
a očkované 24 hodín pred transfekciou. Transfekčný kokteíl bol pripravený zmiešaním transfekčného činidla
FuGene™6 (Roche Molecular Biochemicals, katalóg č. 1814443) s OptiMEM (Gibco/BRL) a inkubovaný
pri izbovej teplote 5 min., načo bola pridaná DNA a kokteíl bol inkubovaný ďalších 15 min. Bezprostredne
pred transfekciou bolo na dosku nanosené čerstvé kultivačné médium. Ďalšie detaily transfekcie sú uvedené
v tabuľke 1 a 2.

15 Tabuľka 1: Činidlá použité pri transietnej transfekcii buniek 293EBNA

Tkanivová kultivačná nádoba	Počet naočkovaných buniek	DNA (µg)	FuGene (µl)	OptiMEM médium (ml)	Objem kult. média (ml)
35 mm	5 · 10 ⁵	1,5	9	0,102	2
100 mm	2 · 10 ⁶	12	73	0,820	10
700 cm ² (RB)	2 · 10 ⁷	65	400	4,0	100

Tabuľka 2: Zloženie média

Rastové a transfekčné médium	Kultivačné médium
DMEM F12 3 : 1	báza Hybritech
5 % FBS	1 mmol Ca ²⁺
20 mmol HEPES	20 mmol HEPES
2 mmol L-glutamín	1 µg/ml Nuselín (ľudský inzulín)
50 µg/ml geneticín (G418 NEO)	1 µg/ml ľudský transferín
50 µg/ml tobramycín	50 µg/ml tobramycín

Pri transfekciách malého rozsahu (35 mm – 10 mm nádoby) boli bunky prepláchnuté PBS a prevedené do
kultivačného média 24 hodín po transfekcii a médium bolo zhromaždené a vymenené za čerstvé každých 24
hodín počas niekoľkých dní. V prípade transfekcie veľkého rozsahu (700 cm² valcová banka) boli valcové
banky vypláchnuté PBS 48 hodín po transfekcii a bunky boli prevedené do výťažkového média. Médium bo-
lo zhromažďované a vymieňané za čerstvé každých 24 hodín počas najmenej 10 po sebe nasledujúcich dní.
Obvykle bolo na následné čistenie proteínu použitých 10 zberov.

25

Príklad 3: Čistenie heterológnych fúzných proteínov

Príklad 3a: Čistenie Val⁸-GLP-1-Fc

Približne 4,5 litra ustáleného média (pri hladine expisie fúzných proteínov približne 20 µg/ml) z trans-
fekcie veľkého rozsahu bolo filtrované s použitím filtračného systému CUNO a koncentrované na 250 ml
s použitím filtračného systému ProFlux s tangenciálnym tokom s 10 K filtračnou membránou. Val⁸-GLP-1-
-Fc boli zachytené na kolóne 5 ml HiTrap proteín A v 1x PBS, pH 7,4 pri prietoku 2 ml/min a eluované
50 mmol kyseliny citrónovej s hodnotou pH 3,3. Frakcie (1 ml) boli zhromaždené v skúmavkách obsahujú-
cich 4 ml 1x PBS a 100 µl 1 mol Tris s hodnotou pH 8.

30

Frakcie obsahujúce fúzny proteín, ako bol stanovený pomocou elektroforézy na polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE) a HPLC s reverznou fázou na Zorbax C8, boli spojené a nanosené na kolónu Superdex 75 60/60 v 1x PBS s hodnotou pH 7,4 s prietokom 10 ml/min. Pozitívne frakcie (20 ml/skúmavku) boli zhromaždené a spojené. Spojené frakcie boli potom podrobené chromatografii s C4 reverznou fázou v 0,1 % TFA vo vode pri prietoku 3 ml/min. Val⁸-GLP-1-Fc bol eluovaný s gradientom od 5 % B (0,1 % TFA v acetonitrile) do 100 % B v priebehu 70 min. Eluované frakcie (3 ml/skúmavka) boli zhromaždené. Acetonitril bol odstránený vákuovým sušením a bol pridaný 1 ml H₂O. Vyčistená vzorka (približne 32 ml) bol dvakrát dialyzovaný 4 litrami 1x PBS pH 7,4.

Dialyzovaná vzorka bola potom filtrovaná s použitím filtračnej jednotky MILLEX-GV 0,22 µm a koncentrácia bola stanovená s použitím absorpcie pri 280 nm.

Príklad 3b: Čistenie Val⁸-GLP-1-HSA alebo Val⁸-GLP-1-Linker-HSA

Približne 6,5 litra ustáleného média (stupeň expresie fúzovaných proteínov približne 10 µg/ml) bolo filtrované s použitím filtračného systému CUNO a koncentrované na 380 ml s použitím filtračného systému ProFlux s tangenciálnym tokom s 10 K filtračnou membránou.

Fúzny proteín bol zachytený s použitím 50 ml Q kolóny s rýchlym tokom (Pharmacia) v 20 mmol Tris s hodnotou pH 7,4 pri prietoku 5 ml/min. Proteín bol eluovaný s použitím gradientu: od 0 % do 50 % 20 mmol Tris s hodnotou pH 7,4, 1 mol NaCl v 10 CV, potom na 100 % B v 2 CV.

Frakcie obsahujúce fúzny proteín boli spojené a podrobené C4 chromatografii s reverznou fázou v 0,1 % TFA vo vode pri prietoku 5 ml/min. Fúzny proteín bol eluovaný s gradientom od 20 % B (0,1 % TFA v acetonitrile) do 90 % B v priebehu 120 min. Frakcie (3,5 ml/skúmavka) boli zhromaždené. Acetonitril bol odstránený vákuovým sušením.

Približne 9 ml zhromaždenej vzorky bolo zriedených 1x PBS s hodnotou pH 7,4 na 40 ml a dialyzovaný s 4 litrami 1x PBS pH 7,4 cez noc. Vzorka bola filtrovaná a koncentrácia bola stanovená s použitím absorpcie pri 280 nm.

Príklad 3c: Čistenie Exendínu-4-Fc

Približne 4 litre ustáleného média (stupeň expresie fúzných proteínov približne 8 µg/ml) boli filtrované s použitím filtračného systému CUNO a koncentrované na 250 ml s použitím filtračného systému ProFlux s tangenciálnym tokom s 30 K filtračnou membránou.

Exendín-4-Fc bol zachytený 5 ml kolóny HiTrap proteínu A v 1x PBS s pH 7,4 pri prietoku 2 ml/min a eluovaný v 50 mmol kyseliny citrónovej s hodnotou pH 3,3. Frakcie obsahujúce fúzny proteín boli zhromaždené, filtrované a dialyzované so 4 litrami 1x PBS cez noc. Dialyzovaná vzorka bola potom nanosená na kolónu Superdex 75 60/60 v 1x PBS s hodnotou pH 7,4, 0,5 mol NaCl pri prietoku 10 ml/min. Frakcie (20 ml/skúmavka) obsahujúce fúzny proteín boli zhromaždené, koncentrované na približne 1 mg/ml. Koncentrované vzorky boli potom filtrované s použitím 0,22 filtračnej jednotky MILLEX-GV.

Príklad 3d: Čistenie Exendín-4-HSA a Exendín-4-linker-HSA

Približne 1,1 litra ustáleného média (stupeň expresie fúzných proteínov približne 6 µg/ml) bolo filtrovaný s použitím filtračného systému CUNO a koncentrované na 175 ml s použitím filtračného systému ProFlux s tangenciálnym tokom s 30 K filtračnou membránou.

Fúzny proteín bol zachytený s použitím 5 ml kolóny HiTrap-Sepharose (Pharmacia) v 20 mmol Tris s hodnotou pH 7,4 pri prietoku 2 ml/min. Proteín bol eluovaný s gradientom od 0 % do 50 % 20 mmol Tris s hodnotou pH 7,4, 1 mol NaCl v 12 CV a potom na 100 % B v 4 CV.

Frakcie obsahujúce fúzny proteín boli zhromaždené a podrobené C4 chromatografii s reverznou fázou v 0,1 % TFA vo vode pri prietoku 5 ml/min. Fúzny proteín bol eluovaný s gradientom od 10 % B (0,1 % TFA v acetonitrile) do 100 % B v priebehu 70 min. Frakcie (10 ml/skúmavka) obsahujúce fúzny proteín boli zhromaždené. Acetonitril bol odstránený s použitím vákuovej sušičky.

Približne 8 ml zhromaždených vzoriek bolo dialyzovaných so 4 litrami 1x PBS pH 7,4 cez noc. Vzorka bola filtrovaná a koncentrácia bola stanovená absorpciou pri 280 nm. Dialyzovaná vzorka bola potom nanosená na kolónu Superdex 200 26/60 v 1x PBS pH 7,4, 0,5 mol NaCl pri prietoku 2 ml/min. Frakcie (3 ml/skúmavka) obsahujúce fúzny proteín boli zhromaždené, koncentrované a filtrované.

Príklad 4: Charakterizácia fúzných proteínov metódou elektroforézy na polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE)

Na analýzu čisteného fúzneho proteínu a ustáleného média z buniek transfektovaných rôznymi expresnými vektormi fúzných proteínov boli použité SDS-PAGE s následným imunoblotingom. SDS-PAGE bol uskutočnený v systéme Novex Powerease 500 s použitím Novex 16 % Tris-glycínových vopred vyrobených gélov (EC6498), prevádzkového pufru (10x, LC2675) a vzorkového pufru (L 2676). Vzorky boli redukované s 50 mmol DTT a zahrievané 3 – 5 min pri 95 °C pred naplnením.

Po použití SDS-PAGE gélu bola použitá voda a transferový pufer (1X Tris-Glycín Seprabuff (Owl Scientific kat. č. ER26-S) s 20 % metanolom na vymytie SDS z gélov. Bolo použité transferové zariadenie Novex s PVDF (BioRad, kat. č. 162 – 0174) a nitrocelulózové membrány (BioRad, kat. č. 1703965 alebo 1703932). Transfer bol uskutočnený pri izbovej teplote počas 90 min pri 30 – 35 V. Membrány boli uzavreté v 1X PBS s 0,1 % Tween-20 (Sigma, kat. č. P7949) a 5 % mlieka (BioRad, kat. č. 170-6404) počas 1 – 12 hodín pri 4 °C. Protilátky boli zriedené v 1X PBS + 5 % mlieka a bloty boli inkubované v týchto roztokoch počas 1 – 2 hodín pri 4 °C. Medzi inkubáciami boli bloty premyté 4-krát počas 5 min, vždy s 1X PBS a 0,2 % Tween-20 pri izbovej teplote. PBS bol vyrobený buď z GIBCO 10X PBS (kat. č. 70011), aby vznikla konečná kompozícia 1 mmol jednosýtného fosforečnanu draselného, 3 mmol monohydrogénfosforečnanu sodného, 153 mmol chloridu sodného s hodnotou pH 7,4 alebo s PBS získaným od Sigma (kat. č. 10003), čo poskytlo 120 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl a 10 mmol fosforečnanu s hodnotou pH 7,4 pri 25 °C.

Primárne protilátky boli buď polyklonálny kozí anti-IgG1, alebo králičí anti-HSA. Sekundárne protilátky boli buď antikozy IgG HRP, alebo antikráličie TgG HRP. Sekundárna protilátka bola zriedená 1 : 5000. Na vyvíjanie blotov bol použitý ECL systém (Amersham Pharmacia Biotech, kat. č. RN 2108 a kat. č. RPN1674H).

Obrázok 3A porovnáva čistený Fc proteín s ustáleným médiom z pJB02-Val⁸-GLP-1-Fc a pJB02-Exendín-4-Fc transfektovaných buniek. Zvýšenie mobility je konzistentné so zvyšujúcou veľkosťou v dôsledku GLP-1 časti fúzneho proteínu. Obrázok 3B podobne porovnáva čistený HSA s ustáleným médiom z buniek transfektovaných pJB02-Val⁸-GLP-2-HSA, pJB02-Val⁸-GLP-1-linker-HSA, pJB02-Exendín-4-HSA alebo pJB02-Exendín-4-linker-HSA. Obrázok 4 ukazuje čistené fúzne proteínové prípravky.

Príklad 5: Charakterizácia fúzných proteínov s použitím hmotnostnej spektrometrie

Všetky experimenty boli uskutočňované na hmotnostnom spektrometre Micromass ToFSpec 2E vybavenom elektronikou na vyrovnávanie časovej prestávky, reflektrom (použitom pri analýze 0-8000 Da peptidového rozpätia), lineárnym detektorom (použitom počas analýzy pri vysokej hmotnosti a dobrom signáli) a postakceleračným detektorom (alebo P. A. D., použitom pri analýze pri vysokej hmotnosti a mimoriadne slabom signáli). Dĺžka účinnej cesty zariadenia v lineárnom móde je 1,2 metra, v reflektromovom režime je 2,3 metra. Na detekciu v lineárnom a reflektromovom režime boli použité dva duálne mikrokanálové doskové detektory. Bol použitý dusíkový laser firmy Laser Science Inc. VSL-3371 pracujúci 337 nm pri 5 laserových zábleskoch za sekundu. Všetky dáta boli získané s použitím 2 GHz 8 bitového interného digitalizačného zariadenia a viac ako 50 laserových zábleskov bolo použitých ako priemer na spektrum.

Zariadenie pracovalo v lineárnom režime na analýzu GLP-1 fúzných proteínov, o ktoré ide. Lineárny detektor je zariadenie detegujúce ióny, ktoré putujú svetelnou trubicou zariadenia MALDI-ToF-MS. Meria početnosť iónov v čase a posiela signál do digitalizačného zariadenia na konverziu. Digitalizačné zariadenie je analógovo-digitálny prevodník, ktorý umožňuje prenos signálu z hmotnostného spektrometra do počítača, kde je prevedený do použiteľného m/z spektra.

Ako ionizačná matrica bol použitý rekryštalizovaný nasýtený roztok kyseliny sinapovej (zriedenej v 50/50 Acn/H₂O a 0,1 % TFA). Kyselina sinapová je vhodnou matricou pre proteíny väčšie ako 10 kDa. Aby sa dosiahlo presné zmeranie hmotnosti analyzovaných vzoriek, boli pre vonkajšie a vnútorné kalibračné súbory použité referenčné proteíny s vhodnou hmotnosťou. Vzorky boli všetky analyzované s použitím vzoriek so zriedením 1 : 2 proti matrici. Zariadenie bolo najskôr nastavené na nasledujúce lineárne detekčné podmienky.

Zdroj napätia: 20,0 keV Napätie pulzov: 3,0 keV

Extrakčné napätie: 20,0 keV Hrubý laser: 50

Fokusové napätie: 16,0 keV jemný laser: 50

Lineárny detektor: 3,7 keV

P. A. D.: (mimo prevádzku)

Tieto nastavenia boli upravované (pokiaľ to bolo nutné) tak, aby bol dosiahnutý najlepší pomer signál/šum a najvyššie rozlíšenie. Tabuľka 3 poskytuje vlastnosti odlišných GLP-1 fúzných proteínov.

Tabuľka 3

Fúzny proteín	Očakávaná hmotnosť (kDa)	Hmotnosť stanovená hmotnostnou spektrometriou (kDa)
Val ⁸ -GLP-1-IgG1	59,08	61,94
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-IgG1	59,23	63,61
Gly ⁸ -GLP-1-IgG1	59,00	62,93
Val ⁸ -GLP-1-CEX-IgG1	60,45	65,1 – 65,6
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-IgG1	60,69	65,86
Exendín-4-IgG1	60,69	65,86
Val ⁸ -GLP-1-linker-HSA	70,70	69,89, 70,74

Fúzny proteín	Očakávaná hmotnosť (kDa)	Hmotnosť stanovená hmotnostnou spektrometriou (kDa)
Exendín-4-HSA	70,56	70,62
Exendín-4-linker-HSA	71,56	71,62

CEX znamená C-koncové predĺženie a predstavuje sekvenciu Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser.
Linkerom je Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser.

- 5 Príklad 6: Aktivita heterológnych fúznych proteínov
- Schopnosť fúznych proteínov podľa vynálezu aktivovať GLP-1 receptor bola posúdená s použitím *in vitro* testov, ktoré sú ako také opísané v EP 619 322 Gelfand a kol. a v US patente č. 5 120 712. Aktivita týchto zlúčenín proti aktivite Val⁸-GLP-1(7-37)OH je uvedená v tabuľke 4. Obrázok 8 predstavuje krivku odozvy na *in vitro* dávky na fúzne proteíny Val⁸-GLP-1 a Exendín-4. Ďalej tabuľka 5a a 5b ukazuje *in vitro* aktivitu veľkej skupiny GLP-1 analógov, ktoré môžu byť fúzované na Fc alebo albumínový proteín s cieľom vyrobiť biologicky aktívne fúzne proteíny. Tieto aktivity sú porovnané s GLP-1(7-37)OH.

Tabuľka 4: *In vitro* aktivita GLP-1 fúznych proteínov:

Fúzny proteín	Aktivita <i>in vitro</i> (% Val ⁸ -GLP-1)
Val ⁸ -GLP-1-IgG1	1
Exendín-4-IgG1	240
Val ⁸ -GLP-1-linker-HSA	0,2
Exendín-4-HSA	20
Exendín-4-linker-HSA	90
Exendín-4	500
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-IgG1	3,7
Gly ⁸ -GLP-1-IgG1	3,3
Val ⁸ -GLP-1-CEX-IgG1	3,3
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-IgG1	29
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-C2-IgG1	75
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-linker-IgG1	150
Exendín-4-C2-IgG1	250
Exendín-4-linker-IgG1	330
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-linker-HSA	4
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-linker-IgG4	80

- 15 CEX znamená C-koncové predĺženie a predstavuje sekvenciu Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser.
Linkerom je Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser.
C2 je Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-Ser-Gly-Ala.
Aminokyselinové sekvencie fúznych proteínov, ktoré sú opísané v tabuľkách 3 a 4, sú uvedené od SEQ ID NO: 13 po SEQ ID NO: 31.
- 20 Aminokyselinová sekvencia Val⁸-GLP-1-albumínu ľudského séra je uvedená pod SEQ ID NO: 13.
- 1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR GDAHKSEVAH RFDKLGEEFN KALVLIAFAQ
- 61 YLQQCPFEDH VKLVNEVTEF AKTCVADESA ENCDKSLHTL FGDKLCTVAT LRETYGEMAD
- 121 CCAKQEPERN ECFLQHKDDN PNLPRLVKPE VDMCTAFHD NEETFLKKYL YEIARRHPYF
- 181 YAPELLFFAK RYKAAFTGCC QAADKAACLL PKLDELKDEG KASSAKQRLK CASLQKGER
- 241 AFKAWAVARL SQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECHGD LLECADDRAD LAKYICENQD
- 301 SSSSKLKECC EKPLLEKSHC IAEVENDEMP ADLPSLAADF VESKDVCKNY AEAKDVFLGM
- 361 FLYEYARRHP DYSVVLRL AKTYETTLEK CCAAADPHEC YAKVFDEFKP LVEEPQNLIK
- 421 QNCELFEQLG EYKFNALLV RYTKKVPQVS TPTLVEVSRN LGKVGSKCK HPEAKRMPCA
- 481 EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPL SDRVTKCCTE SLVNRPCFS ALEVDETYVP KEFNAETFTF
- 541 HADICTLSEK ERQIKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD DFAAFVEKCC KADDKETCFA
- 601 EEGKKLVAAS QAALGL (SEQ ID NO: 13)

Aminokyselinová sekvencia Val⁸-GLP-1-linker-albumín ľudského séra je uvedená pod SEQ ID NO: 14.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLVKGR GGGGSGGGG SGGGSDAHK SEVAHRFKDL
61 GEENFKALVL IAFQYLQQC PFEDHVKLVN EVTEFAKTCV ADESAENCDK SLHTLFGDKL
121 CTVALTRETQ GEMADCCAKQ EPERNECFLO HKDDNPNLPR LVRPEVDVMC TAFHDNEETF
181 LKKYLYEIAI RHPYFYAPEL LFFAKRYKAA FTECCQAADK AACLLPKLDE LRDEGKASSA
241 KQRLKCASLQ KGERAFKAW AVARLSQRFP KAFAEVSKL VTDLTQVHTE CCHGDLLECA
301 DDRADLAKYI CENQDSISSK LKECCEKPLL EKSHCIAEVE NDEMPADLPS LAADFVESKD
361 VCKNYAEAKD VFLGMFLYFY ARRHDPYSW LLLRLAKTYE TTLEKCCAAA DPHECYAKVF
421 DEFKPLVEEP QNLIKQNCLE FEQLGEYKFQ NALLVRYTKK VPQVSTPTLV EVSRNLGKVG
481 SKCKHPEAK RMPAEDYLS WLNQLCVLH EKTQVSDRVT KCCTESLVNR PCFSALEVD
541 ETYVPKEFNA ETTFHADIC TLSEKERQIK QTALVELVK HKPKATKEQL KAVMDDFAAF
601 VEKCKADDK ETCFAEEGKK LVAASQAALG L (SEQ ID NO: 14)

```

5 Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-albumín ľudského séra je uvedená pod SEQ ID NO: 15.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFWLVKGR GSSGAPPPSG GGGGSGGGG GGGGSDAHKS
61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA DESAENCDKS
121 LHTLFGDKLC TVATLTRETYG EMADCCAKQE PERNECFLOH KDDNPNLPRL VRPEVDVMCT
181 AFHDNEETFL KKYLYEIAIR HPYFYAPEL FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACLLPKLDEL
241 RDEGKASSAK QRLKCASLQK FGERAFKAWA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV TDLTKVHTEC
301 CHGDLLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN DEMPADLPSL
361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYFYA RRRHDPYSW LLLRLAKTYET TLEKCCAAAD
421 PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ NLIKQNCLEF EQLGEYKFQN ALLVRYTKKV PQVSTPTLVE
481 VSRNLGKVGK KCKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTPVSDRVTK CCTESLVNRR
541 PCFSALEVDE TYVPKEFNAE TTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK
601 AVMDDFAAVF EKCKADDKE TCFAEEGKKL VAASQAALGL (SEQ ID NO: 15)

```

Aminokyselinová sekvencia Exendín-4-albumín ľudského séra je uvedená pod SEQ ID NO: 16.

```

1 HVEGTFTSDL SKQEEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPPSD AHKSEVAHRF KDLGEENFKA
61 LVLI AFAQYL QQC PFEDHVK LVNEVTEFAK TCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR
121 ETY GEMADCC AKQEPERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVD VMCTAFHDNE ETELKKYLYE
181 IARRHPYFYA PELLFFAKRY KAAFTCCQA ADKAACLLPK LDEL RDEGKA SSAKQRLKCA
241 SLQKGERAF KAWAVARLSQ RFPKAFAEV SKLVTDLTQV HTECCHGDL ECADDRADLA
301 KYICENQDSI SSKLKECCEK PLEKSHCIA EVENDEMPAD LPSLAADFE SKDVCKNYAE
361 AKDVFLGMFL YFYARRHPDY SWLLRLAK TYET TLEKCC AAADPHECYA KVFDEFKPLV
421 EEPQNLIKQN CELFEQLGEY KFQNALLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLG KVGSKCKHP
481 EAKRMPCAED YLSWLNQLC VLHEKTPVSD RVT KCCTESL VNRRPCFSAL EVDETWPKE
541 FNAETTFHA DICTLSEKER QIKKQTALVE LVKHKPKATK EQLKAVMDDF AAFVEKCKKA
601 DDKETCF AEE GKLLVAASQA ALGL (SEQ ID NO: 16)

```

Aminokyselinová sekvencia Exendín-4-Linker-albumín ľudského séra je uvedená pod SEQ ID NO: 17.

```

1 HEGGTFTSDL SKQMEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSG GGGSGGGGS GGGGSDAHKS
61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA DESAENCCKS
121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLQH KDDNPNLPR LVRPEVDVMCT
181 AFHDNEETFL KKYLYEIARR HPYFYAPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACLLPKLDEL
241 RDEGKASSAK QRLKCASLQK FGERAFKAWA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV TDLTKVHTEC
301 CHGDILLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLE KSHCIAEVEN DEMPADLPSL
361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYEYA RRHPDYSWL LLRLAKTYET TLEKCCAAAD
421 PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ NLIKQNCLEF EQLGEYKFQN ALLVRYTKKV PQVSTPTLVE
481 VSRNLGKVG S KCKKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTPVSDRVTK CCTESLVNRR
541 PCFSALEVDE TYVPKEFNAE TFTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK
601 AVMDDFAA FV EKCKADDKE TCFAEEGKKL VAASQAALGL (SEQ ID NO: 17)

```

Aminokyselinová sekvencia Val⁸-GLP-1-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 18.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR GAEPKSCDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF
61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQYNSTYRW
121 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV
181 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
241 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 18)

```

5 Aminokyselinová sekvencia Val⁸-GLP-1-CEx-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 19.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQWTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 19)

```

Aminokyselinová sekvencia Val⁸-Glu²²-GLP-1-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 20.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GAEPKSCDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF
61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQYNSTYRW
121 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQWTLPP SREEMTKNQV
181 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
241 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 20)

```

Aminokyselinová sekvencia Val⁸-Glu²²-GLP-1-CEx-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 21.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCWVD VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQWTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 21)

```

10

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-C2-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 22.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGASSGAA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQWTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 22)

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 23.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAEPKSC
61 DKHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
121 GVEVHNATK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
181 GQPREPQWT LPSSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL
241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 23)

5

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG4 je uvedená pod SEQ ID NO: 24.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAESKYG
61 PPCPSCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVQEDPEV QFNWYVDGVE
121 VHNATKPRE EQFNSTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQ
181 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
241 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO: 24)

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-2-Linker-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 25.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG
61 GGGSGGGGSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCWVD
121 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
181 KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQWTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS BIAVEWESNG
241 QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKQKSLSLSP
301 GK (SEQ ID NO: 25)

10

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-2Linker-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 26.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG
61 SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCW VDVSHEDPEV
121 KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
181 KTISKAKGQ REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
241 TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 26)

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-2CEX-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 27.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSS SGAPPPSAEP KSCDKTHTCP
61 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP GDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
121 KTKPREEQYN STYRWSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ

181 WTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY

241 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)

Aminokyselinová sekvencia Gly⁸-Glu²²-Val²⁵-Ile³³-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 28.

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAVK EFLAWLIKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAEPKSC

61 DKHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS

241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 28)

5 Aminokyselinová sekvencia Exendín-4-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 29.

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL

61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ

121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQWTLPPSR

181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS

241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 29)

Aminokyselinová sekvencia Exendín-4-C2-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 30.

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGASSGAA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL

61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ

121 YNSTYRWSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR

181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS

241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 30)

10 Aminokyselinová sekvencia Exendín-4-Linker-IgG1 je uvedená pod SEQ ID NO: 31.

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGGSAEPKSC

61 DKHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RWSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS

241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 31)

Tabuľka 5a: Aktivita GLP-1 analógu *in vitro*

GLP-1 zlúčenina	Aktivácia GLP-1 receptora
GLP-1(7-37)OH	1,0
Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,47 (n = 6)
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	0,282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	0,021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	0,001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH	0,81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,047
Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	1,175
Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,33

GLP-1 zlúčenina	Aktivácia GLP-1 receptora
Gln ²² -GLP-1(7-37)OH	0,42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37)OH	0,56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37)OH	0,50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37)OH	0,40
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH	0,58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37)OH	0,01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37)OH	0,14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	0,53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	1,0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,07
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	0,18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	0,007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	0,02
Val ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1,6
Val ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1,5
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0,37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0,47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH	0,039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1(7-37)OH	0,1
Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1(7-37)OH	0,01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0,17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0,094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0,41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0,15
Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1(7-37)OH	0,33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,23
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0,37
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1(7-37)OH	0,35
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	1,02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	1,43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0,08
Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0,09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0,34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1(7-36)NH ₂	0,53

Tabuľka 5b: Aktivita GLP-1 analógu *in vitro*

GLP-1 zlúčenina	Aktivácia GLP-1 receptora
GLP-1(7-37)OH	1,0
Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,47
Gly ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH	0,80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)NH ₂	0,52
Val ⁸ -Trp ¹² -GLP-1(7-37)OH	0,52
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,52
Val ⁸ -Val ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,52
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	1,18
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,03
Val ⁸ -Leu ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	0,24
Val ⁸ -Tyr ¹² -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0,70

GLP-1 zlúčenina	Aktivácia GLP-1 receptora
Val ⁸ -Trp ¹² -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0,80
Val ⁸ -Tyr ¹² -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,27
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Phe ¹⁹ -GLP-1(7-37)OH	1,32
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,69, 1,79
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,30, 2,16
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,02
Val ⁸ -Ile ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,55
Val ⁸ -Phe ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,08
Val ⁸ -Trp ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,50, 3,10
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,40, 2,77
Val ⁸ -Phe ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0,94
Val ⁸ -Ile ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,88
Val ⁸ -Lys ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,18
Val ⁸ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,50
Val ⁸ -Phe ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	0,70
Val ⁸ -Phe ²⁰ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,27
Val ⁸ -Glu ²² -Leu ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	1,32
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	1,46
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	2,21, 1,36
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0,94
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	1,03
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1(7-37)OH	2,21, 1,79, 1,60
Val ⁸ -Asp ⁹ -Ile ¹¹ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	2,02
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1,64
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ -GLP-1(7-37)OH	2,35
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1(7-37)OH	1,93
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ -GLP-1(7-37)OH	2,30, 2,73, 3,15
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1(7-37)OH	2,07
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1,97
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -Arg ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	2,4, 1,9

Tabuľka 6: Aktivita GLP/Exendín analógov *in vitro*

Sekvencia peptidu	Aktivita <i>in vitro</i> (% Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGP-NH2	6,21
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS-NH2	6,75, 3,25
HVEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIAWLKGRG	2,86
HVEGTFTSDVSSYLEEEEAVRLFIAWLKGRG	1,47
HVEGTFTSDLSKQMEGQAAKEFIAWLKGRG	0,11
HVEGTFTSDVSKQMEGQAAKEFIAWLKGRG	0,04
HGEGTFTSDLSKQMEGQAAKEFIEWLKNNGP-NH2	1,44
HGEGTFTSDLSKQMEEEAAKEFIEWLKNNGP-NH2	2,80
HGEGTFTSDVSSYLEEEEAVRLFIEWLKNNGP-NH2	5,40
HGEGTFTSDLSSYLEEEEAVRLFIEWLKNNGP-NH2	5,07
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRPSSGAPPS-NH2	3,30
HAEGTFTSDVSKQLEEEAAKEFIAWLKGRG	2,15
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLKNNGP-NH2	2,36
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIAWLKGRG	3,25
HVEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLKGRG	1,00
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKNGRG	0,20
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG	1,00
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG	2,12

Príklad 7: Farmakokinetika Val⁸-GLP-1-IgG1 a Val⁸-GLP-1-HSA *in vivo*

- 5 Farmakokinetické štúdie Val⁸-GLP-1-IgG1 a Val⁸-GLP-1-HSA boli uskutočnené na opiciach druhu *cynomolgus*. Opiciam bolo dávkované 5,6 nmol/kg buď čisteného Val⁸-GLP-1-IgG1, alebo Val⁸-GLP-1-HSA. Zlúčeniny boli podávané ako intravenózne pilulky. Bola zhromažďovaná krv pred dávkovaním a v čase 0,083, 0,25, 0,5, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 a 216 hodín po dávkovaní do trubičiek obsahujú-

cich EDTA. Koncentrácia imunoreaktívneho Val⁸-GLP-1 v plazme bola stanovená s použitím rádioimunologických testov, ktoré využívajú polyklonálne antisérum, ktoré má primárnu špecifitu pre región N-zakotenia (7-16) Val⁸-GLP-1(7-37).

- 5 Obrázok 9 zobrazuje koncentráciu Val⁸-GLP-1-Fc a Val⁸-GLP-1-Linker-HSA v plazme po podaní jednotlivej intravenózne dávky dvom opiciam druhu *cynomolgus*. Fc fúzne proteíny majú polčas životnosti približne 45 hodín a albumínový fúzny proteín má polčas životnosti približne 87 hodín.

Príklad 8: Farmakodynamika Exendínu-4-IgG1 *in vivo*

- 10 Boli skúmané dva normálne samce psov bíglov s trvalo zavedenou kanylou potom, čo cez noc hladovali. Boli otvorené arteriálne a venózne vaskulárne prístupové cesty a perkutánne do hlavovej žily bol zavedený a stabilizovaný katéter. Zvieratá boli umiestnené v kliebkach a ich katéter bol napojený na otočný upevňovací systém. Katétrom hlavovej žily bol injekčne intravenózne (1,0 nmol/kg) vstreknutý roztok obsahujúci fúzny proteín Exendín-4-IgG1 (11,8 µM). Katéter bol potom vyčistený 10 ml slaného roztoku. Po dvoch hodinách bola aktivovaná hyperglykemická svorka (150 mg/dl) a pokračovalo sa 3 hodiny. Počas tejto 5 hodinovej periódy sa odoberali vzorky arteriálnej krvi na stanovenie koncentrácie fúzneho proteínu, glukózy a inzulínu v plazme.

- 15 Výsledky tejto štúdie boli porovnané s výsledkami podobnej skôr uskutočnenej štúdie, v ktorej každé zviera dostalo bolu roztoku chloridu sodného a o 3 hodiny neskôr boli zvieratá testované s použitím trojhodinovej hyperglykemickkej svorky (150 mg/dl).

- 20 V oboch uvedených štúdiách bola koncentrácia glukózy v plazme stanovená Beckmanovým glukózovým analyzátorom. Koncentrácie inzulínu v plazme boli stanovené v Linco Research, Inc. s použitím súpravy RIA vyvinutej v ich laboratóriách. Výsledky sú znázornené na obrázkoch 10 a 11.

Príklad 9: Farmakokinetika Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1

- 25 Dvomi skupinám troch normálnych psích samcov bíglov bola podaná subkutánne (SC) alebo intravenózne (IV) dávka 0,1 mg/kg Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1. Koncentrácia Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 v plazme a imunoreaktivita boli stanovené rádioimunologickým testom vo vzorkách zhromažďovaných 30 minút pred dávkovaním až 216 hodín po dávkovaní v skupinách IV a SC. Tieto koncentrácie boli potom použité na stanovenie uvedených farmakokinetických parametrov. Stredný čas vylúčenia polovice dávky pri intravenóznom podávaní Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 bol približne 55 hodín a celkový čas vylúčenia z tela bol 1,5 ml/h/kg. Stredný čas odstránenia polovice dávky pri subkutánnom podávaní Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-Linker-IgG1 bol približne 38 hodín.

Výpis sekvencií

<110> Glaesner, wolfgang
Micanovic, Radmila
Tschang, Sheng-Hung Rainbow

<120> GLP-1 FÚZNE PROTEÍNY

<130> X-13991A

<150> US 60/251,954
<151> 2000-12-07

<150> US 10,433,108
<151> 2003-05-29

<160> 35

<170> PatentIn verzia 3.3

<210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

- 35 <400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 2
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
 alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na pozícii 3 je Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na pozícii 5 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
 alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa na pozícii 8 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
 alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na pozícii 10 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr,
 Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa na pozícii 11 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
 Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na pozícii 12 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,
 Asp, Lys, Trp alebo Tyr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa na pozícii 13 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa na pozícií 14 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Lys, Trp alebo Tyr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Xaa na pozícií 15 je Glu, Asp alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa na pozícií 16 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa na pozícií 17 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa na pozícií 18 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Xaa na pozícií 19 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Xaa na pozícií 20 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp alebo His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Xaa na pozícií 21 je Leu, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa na pozícií 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu,

Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa na pozícii 25 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa na pozícii 26 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa na pozícii 27 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa na pozícii 28 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa na pozícii 29 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa na pozícii 30 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránený;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na pozícii 32 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His alebo je odstránený;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa na pozícii 33 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His alebo je odstránený;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa na pozícii 34 je Gly, Asp, Glu alebo Lys alebo je odstránený;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa na pozícii 35 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránený;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa na pozícii 36 je Ser, Pro, Lys, Glu alebo Asp alebo je odstránený;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)

<223> xaa na pozícii 37 je Ser, Pro, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránený;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> xaa na pozícii 38 je Gly, Pro, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránený;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> xaa na pozícii 39 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránený;

<400> 2

His Xaa Xaa Gly Xaa Phe Thr Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konštrukt

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> xaa na pozícii 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> xaa na pozícii 3 je Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu alebo His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> xaa na pozícii 5 je Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys alebo His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> xaa na pozícii 6 je His, Trp, Phe alebo Tyr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> xaa na pozícii 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu alebo Ala;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa na pozícii 12 je His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser Ala alebo Lys;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa na pozícii 13 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa na pozícii 17 je His, Asp, Lys, Glu, Gln alebo Arg;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa na pozícii 18 je Glu, Arg, Ala alebo Lys;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa na pozícii 20 je Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu alebo His;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa na pozícii 21 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg alebo Lys;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa na pozícii 24 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa na pozícii 25 je Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp alebo Lys;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa na pozícii 27 je Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly alebo Glu;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa na pozícii 28 je Glu, Lys alebo Asp;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa na pozícii 29 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His alebo Glu;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa na pozícii 30 je Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu alebo His;
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly alebo je odstránený.
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Pro alebo je odstránený.
 <400> 3
 Xaa Xaa Xaa Gly xaa xaa Thr Ser Asp xaa Ser xaa xaa Leu Glu Gly

1

5

10

15

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Ile Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 4
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na pozícii 5 je Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na pozícii 6 je His, Trp, Phe alebo Tyr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na pozícii 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu alebo Ala;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa na pozícii 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa na pozícii 17 je His, Asp, Lys, Glu alebo Gln;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa na pozícii 18 je Glu, His, Ala alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa na pozícii 19 je Asp, Lys, Glu alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa na pozícii 21 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa na pozícii 24 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa na pozícii 27 je Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly alebo Glu;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa na pozícii 28 je Glu, Lys alebo Asp;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa na pozícii 29 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His alebo Glu;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa na pozícii 30 je Arg, Glu alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na pozícii 32 je Pro alebo je odstránený.

<400> 4

Xaa Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 5
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met alebo Thr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na pozícii 6 je His, Trp, Phe alebo Tyr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na pozícii 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu alebo Ala;

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)
 <223> Xaa na pozícii 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa na pozícii 17 je His, Asp, Lys, Glu alebo Gln;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa na pozícii 20 je Asp, Lys, Glu alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa na pozícii 24 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa na pozícii 29 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His alebo Glu;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na pozícii 32 je Pro alebo je odstránený.

<400> 5

Xaa Xaa Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Xaa Arg Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa na pozícii 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg alebo Cys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa na pozícii 17 je His, Asp, Lys, Glu alebo Gln;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa na pozícii 18 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa na pozícii 24 je Ala, Glu, Asp, Ser alebo His;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na pozícii 32 je Pro alebo je odstránený.

<400> 6

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Lys Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 7
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Ala, Gly, Val, Thr, Ile a metylalfa-metyl-Ala;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa na pozícii 15 je Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa na pozícii 21 je Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly;

<400> 7

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Xaa Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 8

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa na pozícii 19 je Lys alebo Arg;

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa na pozícii 30 je Gly;

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> AMIDATION

<400> 8

Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
 1 5 10 15

Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
 20 25 30

<210> 9
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<400> 9

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 10
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<400> 10

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 11
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Gly, Ala alebo Val;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na pozícii 10 je Leu alebo Val;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na pozícii 12 je Lys alebo Ser;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa na pozícii 13 je Gln alebo Tyr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa na pozícii 14 je Met alebo Leu;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa na pozícii 16 je Glu alebo Gln;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa na pozícii 17 je Glu alebo Gln;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa na pozícii 19 je Val alebo Ala;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa na pozícii 20 je Arg alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa na pozícii 21 je Leu alebo Glu;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa na pozícii 24 je Glu alebo Ala;

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa na pozícii 27 je Val alebo Lys;

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa na pozícii 28 je Asn alebo Lys;

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa na pozícii 30 je Gly alebo Arg; a

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa na pozícii 31 je Gly alebo Pro;

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa na pozícii 32 je Ser alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa na pozícii 33 je Ser alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa na pozícii 34 je Gly alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa na pozícii 35 je Ala alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa na pozícii 36 je Pro alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa na pozícii 37 je Pro alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa na pozícii 38 je Pro alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa na pozícii 39 je Pro alebo je neprítomný.

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa na pozícii 39 je Ser alebo je neprítomný.

 <400> 11

Xaa Xaa Glu Glu Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa

1 5 10 15
 Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35

<210> 12
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa na pozícii 1 je L-histidín, D-histidín alebo je odstránený.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa na pozícii 2 je Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser alebo Thr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na pozícii 6 je Phe, Trp alebo Tyr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na pozícii 10 je Val, Trp, Ile, Leu, Phe alebo Tyr;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na pozícii 12 je Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa na pozícii 13 je Tyr, Trp alebo Phe;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa na pozícii 14 je Leu, Phe, Tyr alebo Trp;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa na pozícii 16 je Gly, Glu, Asp alebo Lys;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa na pozícii 19 je Ala, Val, Ile alebo Leu;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa na pozícii 21 je Glu, Ile alebo Ala;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)

<223> xaa na pozícií 24 je Ala alebo Glu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> xaa na pozícií 27 je Val alebo Ile; a

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDATION

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> xaa na pozícií 31 je Gly, His alebo je neprítomný.

<400> 12

Xaa Xaa Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
1 5 10 15

Gln Ala Xaa Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Lys Gly Arg Xaa
20 25 30

<210> 13

<211> 616

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konštrukt

<400> 13

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Asp
20 25 30

Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu
35 40 45

Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln
50 55 60

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

Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser
85 90 95

Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg
100 105 110

Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu
115 120 125

Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro
130 135 140

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
 145 150 155 160
 Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
 165 170 175
 His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
 180 185 190
 Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
 195 200 205
 Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
 210 215 220
 Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg
 225 230 235 240
 Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys
 245 250 255
 Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val
 260 265 270
 His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg
 275 280 285
 Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser
 290 295 300
 Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys
 305 310 315 320
 Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu
 325 330 335
 Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu
 340 345 350
 Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg
 355 360 365
 His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr
 370 375 380
 Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys
 385 390 395 400
 Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln
 405 410 415
 Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr
 420 425 430
 Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln

435 440 445
 Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val
 450 455 460
 Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala
 465 470 475 480
 Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu
 485 490 495
 Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
 500 505 510
 Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
 515 520 525
 Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
 530 535 540
 Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
 545 550 555 560
 Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
 565 570 575
 Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala
 580 585 590
 Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
 595 600 605
 Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 610 615
 <210> 14
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> syntetický konštrukt
 <400> 14
 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala
 35 40 45
 His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn
 50 55 60

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

355	360	365
Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His 370 375 380		
Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu 385 390 395 400		
Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr 405 410 415		
Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn 420 425 430		
Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys 435 440 445		
Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val 450 455 460		
Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly 465 470 475 480		
Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu 485 490 495		
Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys 500 505 510		
Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val 515 520 525		
Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val 530 535 540		
Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys 545 550 555 560		
Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val 565 570 575		
Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala 580 585 590		
Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp 595 600 605		
Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala 610 615 620		
Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu 625 630		
<210> 15		
<211> 640		

<212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<400> 15

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
 50 55 60

Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
 65 70 75 80

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
 85 90 95

Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
 100 105 110

Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
 115 120 125

Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
 130 135 140

Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
 145 150 155 160

Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
 165 170 175

Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys
 180 185 190

Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
 195 200 205

Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys
 210 215 220

Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala
 245 250 255

ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala

260					265					270					
Arg	Leu	Ser 275	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys 280	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu 285	Val	Ser	Lys
Leu	Val 290	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys 295	Val	His	Thr	Glu	Cys 300	Cys	His	Gly	Asp
Leu 305	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp 310	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu 315	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys 320
Glu	Asn	Gln	Asp	Ser 325	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu 330	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu 335	Lys
Pro	Leu	Leu	Glu 340	Lys	Ser	His	Cys	Ile 345	Ala	Glu	Val	Glu	Asn 350	Asp	Glu
Met	Pro	Ala 355	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu 360	Ala	Ala	Asp	Phe	Val 365	Glu	Ser	Lys
Asp	Val 370	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala 375	Glu	Ala	Lys	Asp	Val 380	Phe	Leu	Gly	Met
Phe 385	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala 390	Arg	Arg	His	Pro	Asp 395	Tyr	Ser	Val	Val	Leu 400
Leu	Leu	Arg	Leu	Ala 405	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr 410	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys 415	Cys
Ala	Ala	Ala	Asp 420	Pro	His	Glu	Cys	Tyr 425	Ala	Lys	Val	Phe	Asp 430	Glu	Phe
Lys	Pro	Leu 435	Val	Glu	Glu	Pro	Gln 440	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln 445	Asn	Cys	Glu
Leu 450	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu 455	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn 460	Ala	Leu	Leu	Val
Arg 465	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val 470	Pro	Gln	Val	Ser	Thr 475	Pro	Thr	Leu	Val	Glu 480
Val	Ser	Arg	Asn 485	Leu	Gly	Lys	Val	Gly	Ser 490	Lys	Cys	Cys	Lys	His 495	Pro
Glu	Ala	Lys	Arg 500	Met	Pro	Cys	Ala	Glu 505	Asp	Tyr	Leu	Ser	Val 510	Val	Leu
Asn	Gln	Leu 515	Cys	Val	Leu	His	Glu 520	Lys	Thr	Pro	Val	Ser 525	Asp	Arg	Val
Thr	Lys 530	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser 535	Leu	Val	Asn	Arg	Arg 540	Pro	Cys	Phe	Ser
Ala 545	Leu	Glu	Val	Asp	Glu 550	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys 555	Glu	Phe	Asn	Ala	Glu 560

Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
565 570 575

Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
580 585 590

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
595 600 605

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
610 615 620

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630 635 640

<210> 16
<211> 624
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> syntetický konštrukt

<400> 16

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
35 40 45

Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
50 55 60

Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys
65 70 75 80

Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu
85 90 95

Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys
100 105 110

Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp
115 120 125

Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His
130 135 140

Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp
145 150 155 160

Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys

165										170					175				
Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu				
			180					185					190						
Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys				
		195					200					205							
Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu				
	210					215					220								
Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala				
	225				230					235					240				
Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala				
				245					250					255					
Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys				
			260					265					270						
Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp				
		275					280					285							
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys				
	290					295					300								
Glu	Asn	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys				
	305				310					315					320				
Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu				
				325					330					335					
Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys				
			340					345					350						
Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met				
		355					360					365							
Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu				
	370					375					380								
Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys	Cys				
	385				390					395					400				
Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe				
				405					410					415					
Lys	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu				
			420					425					430						
Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val				
		435					440					445							
Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu				
	450					455					460								

Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
 465 470 475 480
 Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
 485 490 495
 Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
 500 505 510
 Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 515 520 525
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
 530 535 540
 Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
 545 550 555 560
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
 565 570 575
 Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
 580 585 590
 Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
 595 600 605
 Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 610 615 620
 <210> 17
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> syntetický konštrukt
 <400> 17
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
 50 55 60
 Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys

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

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

<210> 18
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvencia
 <220>
 <223> syntetický konstrukt

<400> 18

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ala
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
35 40 45

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
50 55 60

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
65 70 75 80

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
85 90 95

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
100 105 110

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
115 120 125

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
130 135 140

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
145 150 155 160

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
165 170 175

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
180 185 190

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
195 200 205

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
210 215 220

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
225 230 235 240

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
245 250 255

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260

<210> 19

<211> 272

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konštrukt

<400> 19

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 50 55 60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 225 230 235 240

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 245 250 255

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

260 265 270
 <210> 20
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia
 <220>
 <223> syntetický konstrukt
 <400> 20
 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ala
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 35 40 45
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 130 135 140
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260

<210> 21
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konstrukt

<400> 21

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 50 55 60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
225 230 235 240

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
245 250 255

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 22

<211> 272

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konstrukt

<400> 22

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
50 55 60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
65 70 75 80

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
85 90 95

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
100 105 110

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
115 120 125

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
130 135 140

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
165 170 175

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
180 185 190

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
195 200 205

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 225 230 235 240

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 245 250 255

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260 265 270

<210> 23

<211> 287

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konštrukt

<400> 23

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 50 55 60

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 65 70 75 80

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 85 90 95

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 100 105 110

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 115 120 125

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 130 135 140

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 145 150 155 160

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 165 170 175

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

180 185 190
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 195 200 205
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 210 215 220
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 225 230 235 240
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 245 250 255
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 260 265 270
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280 285

 <210> 24
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> syntetický konstrukt

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

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 145 150 155 160
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 165 170 175
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 180 185 190
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 195 200 205
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 210 215 220
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 225 230 235 240
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 245 250 255
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 260 265 270
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 275 280

<210> 25
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<400> 25

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

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

<210> 26
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<400> 26

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

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

<210> 27
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> syntetický konštrukt

<400> 27

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1	5	10	15
Gln Ala Ala	Lys Glu Phe Ile Ala	Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser	
	20	25	30
Ser Gly Ala	Pro Pro Pro Ser	Ser Ser Gly Ala Pro	Pro Pro Ser Ala
	35	40	45
Glu Pro Lys	Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr Cys	Pro Pro Cys Pro Ala
	50	55	60
Pro Glu Leu Leu Gly	Gly Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys Pro	
	65	70	75
Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val Thr Cys Val Val	
	85	90	95
Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	
	100	105	110
Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	
	115	120	125
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
	130	135	140
Asp Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Ala	
	145	150	155
Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr Ile Ser	Lys Ala Lys Gly Gln Pro	
	165	170	175
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
	180	185	190
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
	195	200	205
Asp Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
	210	215	220
Lys Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
	225	230	235
Ser Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
	245	250	255
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	260	265	270
Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys		
	275	280	
<210>	28		
<211>	287		

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konštrukt

<400> 28

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Val Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Ile Lys Gly Arg Gly Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
50 55 60

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
85 90 95

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
100 105 110

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
115 120 125

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
130 135 140

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
145 150 155 160

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
165 170 175

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
180 185 190

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
195 200 205

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
210 215 220

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
245 250 255

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

260 265 270
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280 285

 <210> 29
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

 <220>
 <223> syntetický konštrukt

 <400> 29

 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 35 40 45

 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 50 55 60

 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80

 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95

 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110

 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125

 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140

 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160

 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175

 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190

 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205

 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
225 230 235 240

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
245 250 255

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 30

<211> 272

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> syntetický konštrukt

<400> 30

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
35 40 45

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
50 55 60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
65 70 75 80

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
85 90 95

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
100 105 110

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
115 120 125

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
130 135 140

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
145 150 155 160

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
165 170 175

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
180 185 190

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
195 200 205

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
210 215 220

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
225 230 235 240

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
245 250 255

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 31
<211> 287
<212> PRT
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> syntetický konštrukt

<400> 31

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
50 55 60

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
65 70 75 80

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
85 90 95

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
100 105 110

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
115 120 125

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
130 135 140

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
145 150 155 160

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
165 170 175

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
180 185 190

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
195 200 205

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
210 215 220

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
225 230 235 240

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
245 250 255

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
260 265 270

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280 285

<210> 32
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Lys Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Lys Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 33
<211> 703
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 120
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gcccgcagaa ccacaggtgt acaccctgcc ccatccccg 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaagat agt 703

<210> 34
<211> 585
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

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

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

<210> 35
 <211> 1762
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 gatgcgaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa 60
 gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta 120
 aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa 180
 aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt 240

```

cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaac aagaacctga gagaaatgaa 300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattgggtgag accagagggt 360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaa atacttatat 420
gaaattgcca gaagacatcc ttacttttat gcccgggaac tccttttctt tgctaaaagg 480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctggtgcc 540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt 600
gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc tcgcctgagc 660
cagagatttc ccaaagctga gtttgagaa gtttccaagt tagtgacaga tcttaccaaa 720
gtccacacgg aatgtgcc  tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag ggcggacctt 780
gccaagtata tctgtgaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga atgctgtgaa 840
aaacctctgt tggaaaaatc cactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga gatgcctgct 900
gacttgcttt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa aaactatgct 960
gaggcaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag gcacctgat 1020
tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct agagaagtgc 1080
tgtgccgtg cagatcttca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt taaacctctt 1140
gtggaagagc ctcaagaattt aatcaaaaca aattgtgagc tttttgagca gcttgagag 1200
tacaatttcc agaatgcgct attagtctgt tacaccaaga aagtaccca agtgtcaact 1260
ccaactcttg tagaggctct aagaaacctt ggaagggtg gcagcaaatg ttgtaaacat 1320
cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct gaaccagtta 1380
tgtgtgttgc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaatgctg cacagaatcc 1440
ttggtgaaca ggcgaccatg cttttcagct ctggaagtcg atgaaacata cgttcccaa 1500
gagtttaatg ctgaaacatt cactttccat gcagatatat gcacactttc tgagaaggag 1560
agacaaatca agaaacaaac tgcacttggt gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca 1620
aaagagcaac tgaagctgt tatggatgat ttgcgagctt ttgtagagaa gtgctgcaag 1680
gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aacttggtgc tgcaagtcaa 1740
gctgccttag gcttataatg ac 1762

```

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Heterológny fúzny proteín zahrňujúci prvý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzovaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde prvý polypeptid je GLP-1 zlúčenina a druhý polypeptid je vybraný zo skupiny, do ktorej patria:

10

- a) Fc časť imunoglobulínu;
 - b) analóg Fc časti imunoglobulínu; a
 - c) fragmenty Fc časti imunoglobulínu,
- kde C-zakončenie prvého polypeptidu je fúzované na N-zakončenie druhého polypeptidu.

15

2. Heterológny fúzny proteín zahrňujúci prvý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením fúzovaný na druhý polypeptid s N-zakončením a C-zakončením, kde prvý polypeptid je GLP-1 zlúčenina a druhý polypeptid je vybraný zo skupiny, do ktorej patria:

- a) Fc časť imunoglobulínu;
- b) analóg Fc časti imunoglobulínu; a
- c) fragmenty Fc časti imunoglobulínu,

20

kde C-zakončenie prvého polypeptidu je fúzované na N-zakončenie druhého polypeptidu cez peptidový linker.

3. Heterológny fúzny proteín podľa nároku 2, kde peptidový linker je vybraný zo skupiny, do ktorej patria:

- a) peptid bohatý na glycín;
 b) peptid, ktorý má sekvenciu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n, kde n je 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6; a
 c) peptid, ktorý má sekvenciu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.
 4. Heterológny fúzny proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1, 2 alebo 3, kde GLP-1 zlučienina zahrnuje sekvenciu vzorca (I) (SEQ ID NO: 2).

```

7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Phe-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa

18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe

29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39
Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

40  41  42  43  44  45
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

```

Vzorec I (SEQ ID NO: 2)

kde:

- Xaa na pozícii 8 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 9 je Glu, Asp alebo Lys;
 10 Xaa na pozícii 11 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr alebo Lys;
 15 Xaa na pozícii 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln alebo Lys;
 Xaa na pozícii 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr alebo Lys;
 Xaa na pozícii 21 je Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp alebo Lys;
 20 Xaa na pozícii 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp alebo His;
 Xaa na pozícii 27 je Leu, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 25 Xaa na pozícii 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp alebo Lys;
 Xaa na pozícii 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp alebo His;
 Xaa na pozícii 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys;
 30 Xaa na pozícii 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His;
 Xaa na pozícii 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránená;
 Xaa na pozícii 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His alebo je odstránená;
 Xaa na pozícii 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp alebo His alebo je odstránená;
 Xaa na pozícii 40 je Gly, Asp, Glu alebo Lys alebo je odstránená;
 35 Xaa na pozícii 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránená;
 Xaa na pozícii 42 je Ser, Pro, Lys, Glu alebo Asp alebo je odstránená;
 Xaa na pozícii 43 je Ser, Pro, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránená;
 Xaa na pozícii 44 je Gly, Pro, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránená; a
 Xaa na pozícii 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp alebo Lys alebo je odstránená;
 40 s podmienkou, že pokiaľ je aminokyselina na pozícii 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 alebo 44 odstránená, potom sú odstránené aj všetky aminokyseliny po tejto aminokyseline nasledujúce.

5. Heterológny fúzny proteín podľa nároku 4, kde GLP-1 zlučienina nemá viac ako 6 aminokyselín, ktoré sú odlišné od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendínu-4.

6. Heterológny fúzny proteín podľa nároku 4, kde GLP-1 zlučienina nemá viac ako 5 aminokyselín, ktoré sú odlišné od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendínu-4.

7. Heterológny fúzny proteín podľa nároku 4, kde GLP-1 zlúčenina nemá viac ako 4 aminokyseliny, ktoré sa líšia od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendínu-4.
8. Heterológny fúzny proteín podľa nároku 4, kde GLP-1 zlúčenina nemá viac ako 3 aminokyseliny, ktoré sú odlišné od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendínu-4.
- 5 9. Heterológny fúzny proteín podľa nároku 4, kde GLP-1 zlúčenina nemá viac ako 2 aminokyseliny, ktoré sú odlišné od zodpovedajúcej aminokyseliny v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)OH alebo Exendínu-4.
10. Použitie heterológneho fúzneho proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9 na výrobu prostriedku na liečenie pacientov, ktorí majú diabetes mellitus nezávislý od inzulínu.
- 10 11. Použitie heterológneho fúzneho proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 9 na výrobu prostriedku na liečenie pacientov, ktorí sú obézni.

17 výkresov

1/17

Obr. 1

				5					10					15
Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				20					25					30
Pro	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				35					40					45
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Lys	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				50					55					60
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
				65					70					75
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				80					85					90
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
				95					100					105
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				110					115					120
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				125					130					135
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				140					145					150
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				155					160					165
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				170					175					180
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
				185					190					195
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				200					205					210
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				215					220					225
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				230										
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								

[SEQ ID NO: 32]

3/17

Obr. 2 pokračovanie

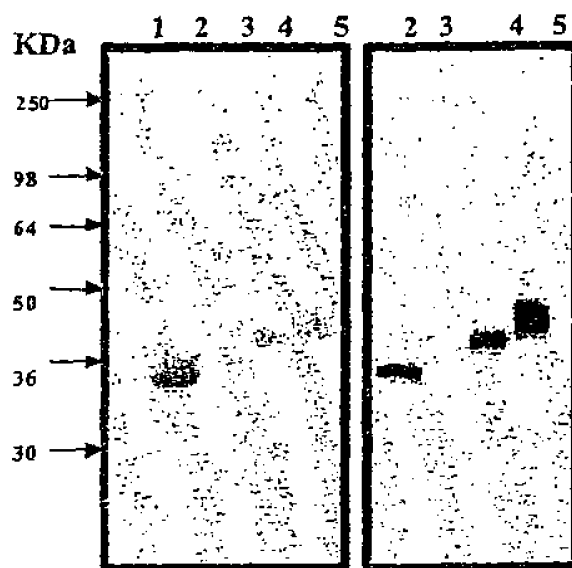
[illegible]

[SEQ ID NO: 34]

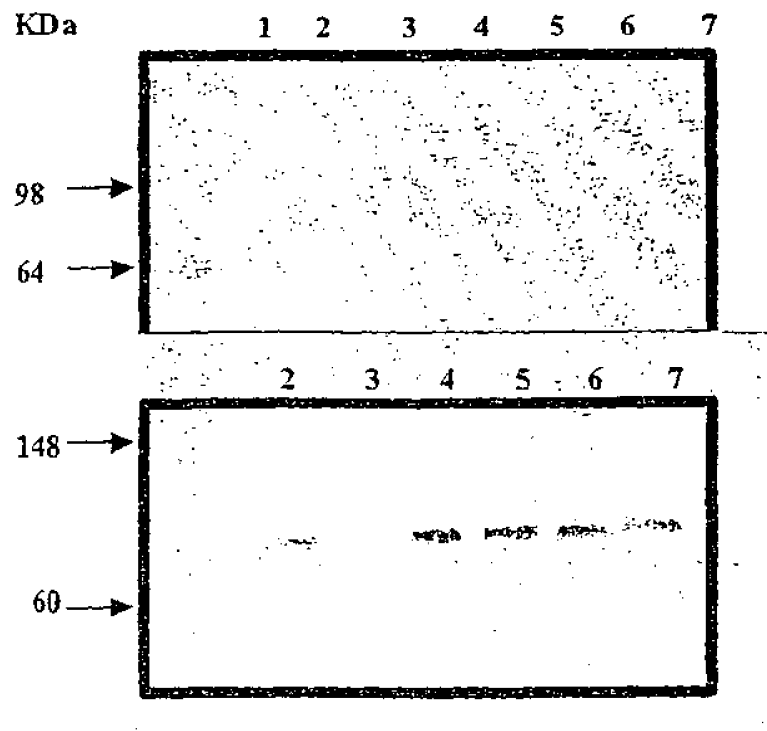
4/17

Obr. 3

A.

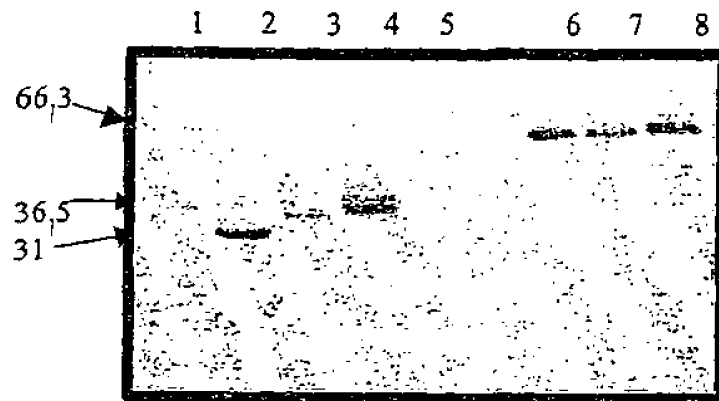


B.



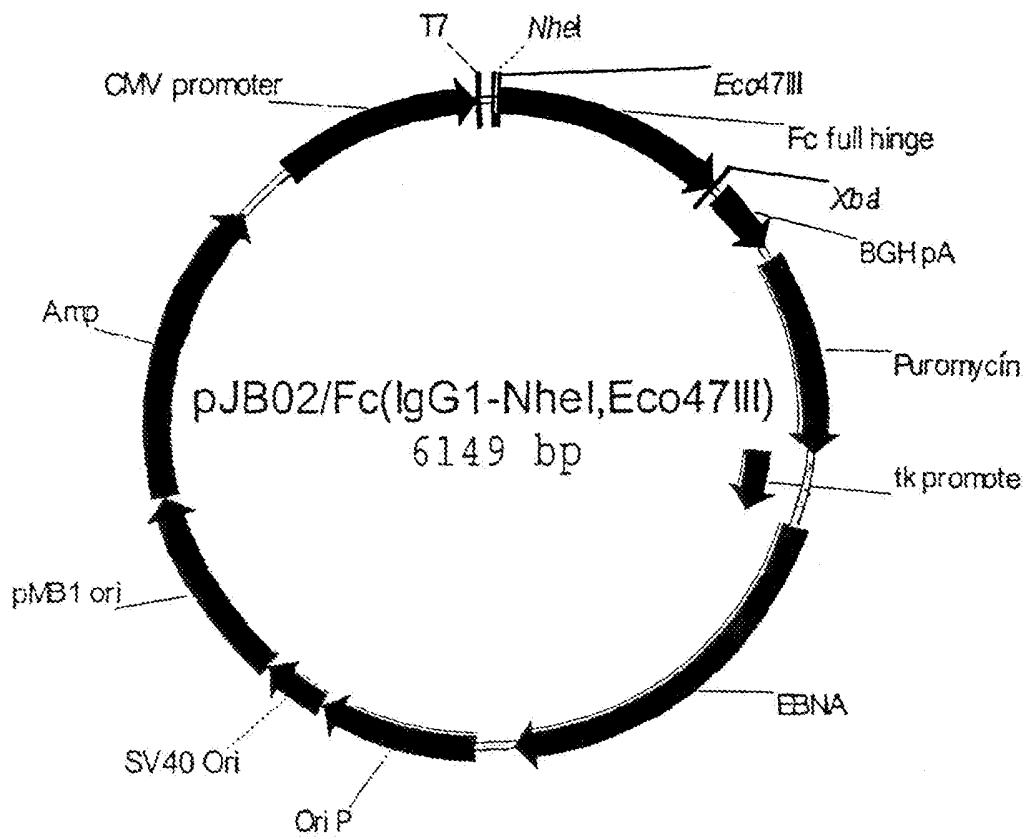
5/17

Obr. 4



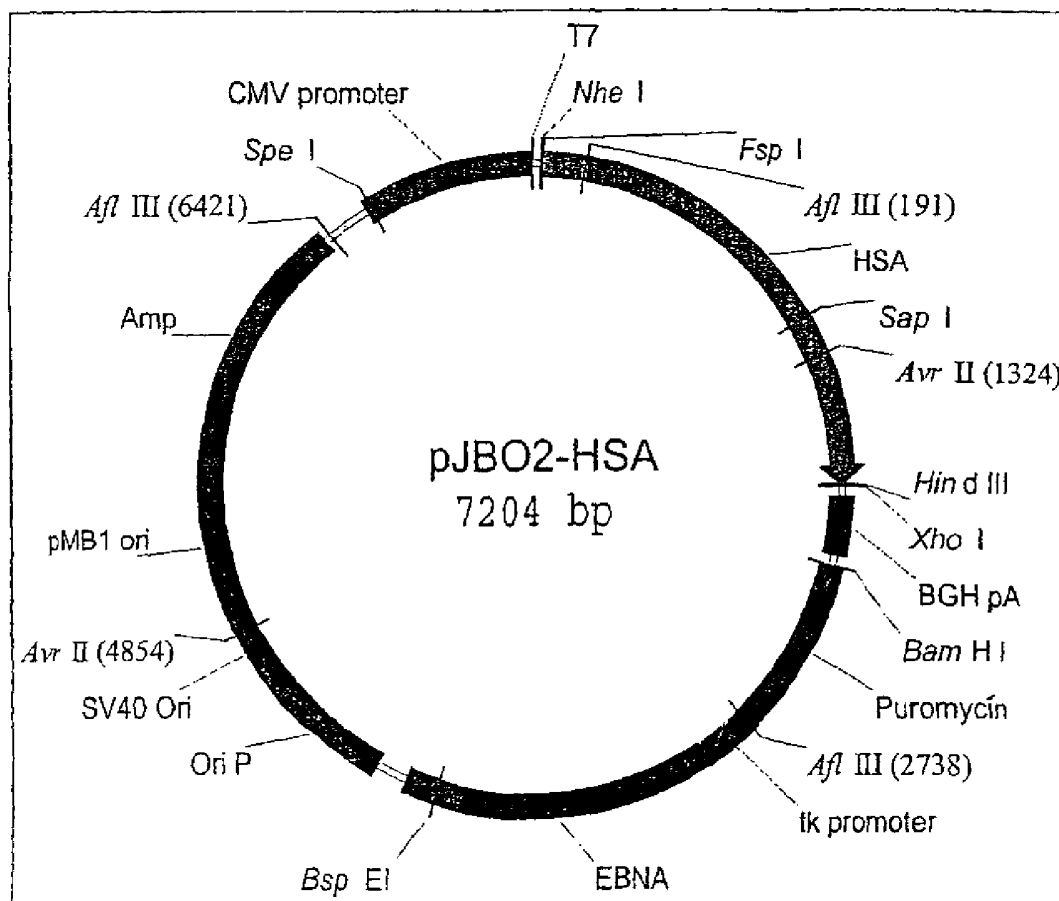
6/17

Obv. 5



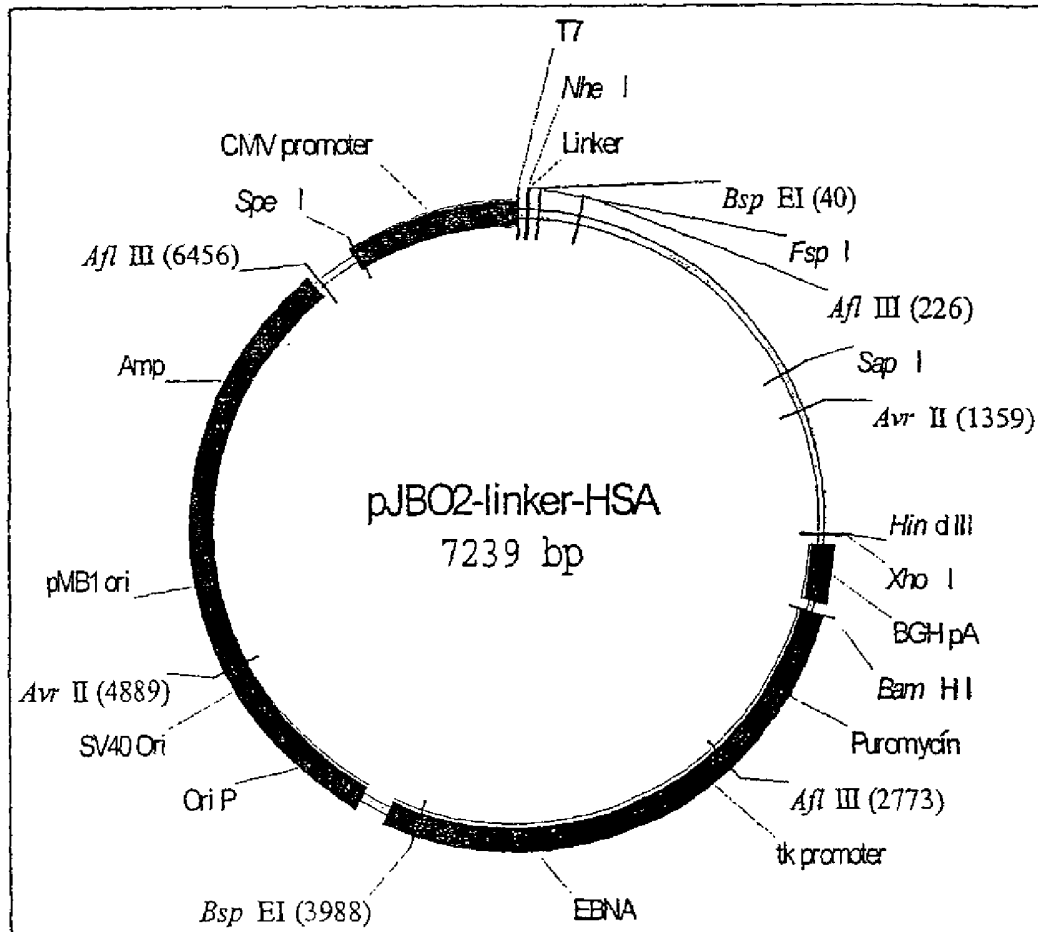
7/17

Obz. 6



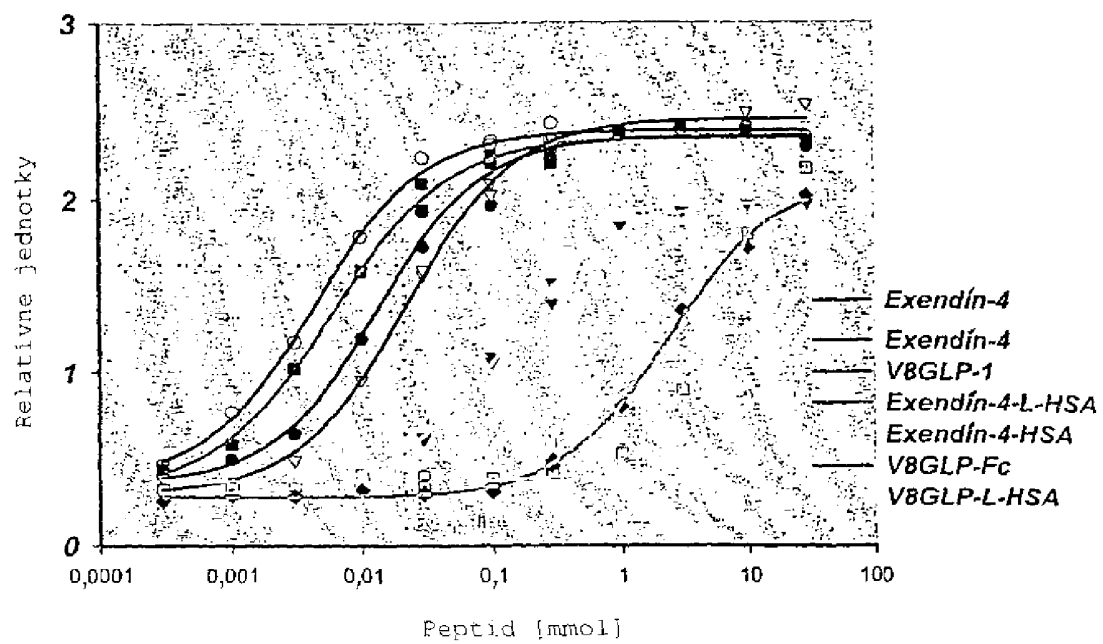
8/17

Obr. 7



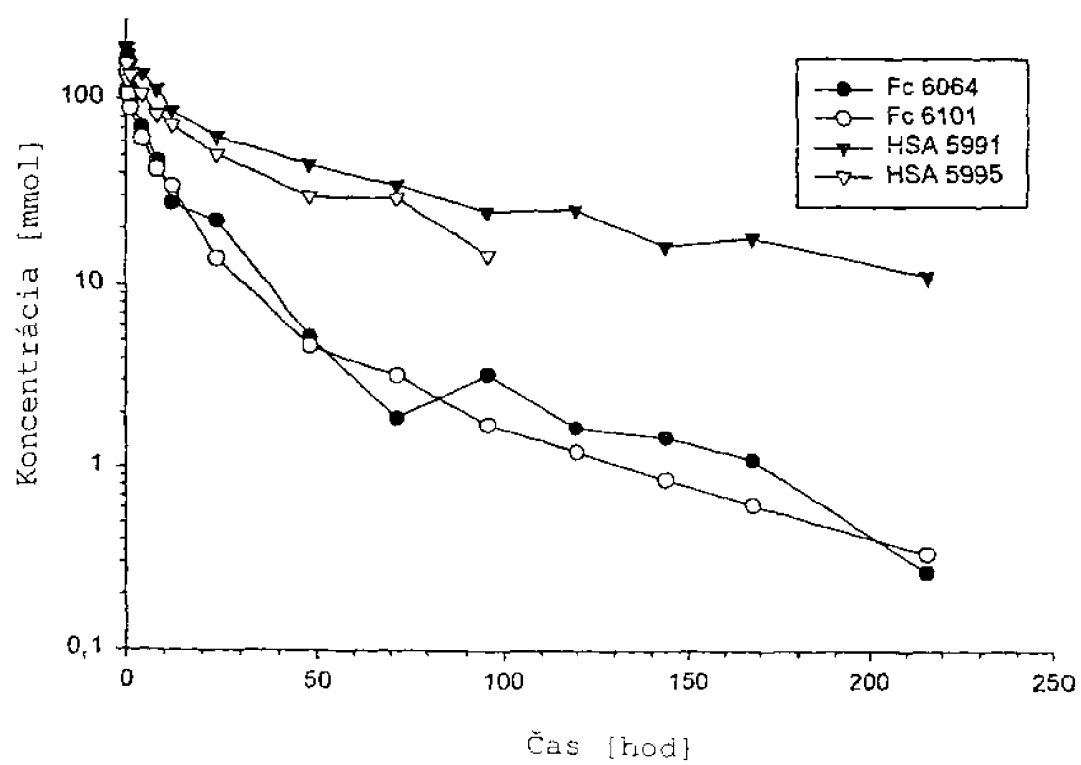
9/17

Obr. 8



10/17

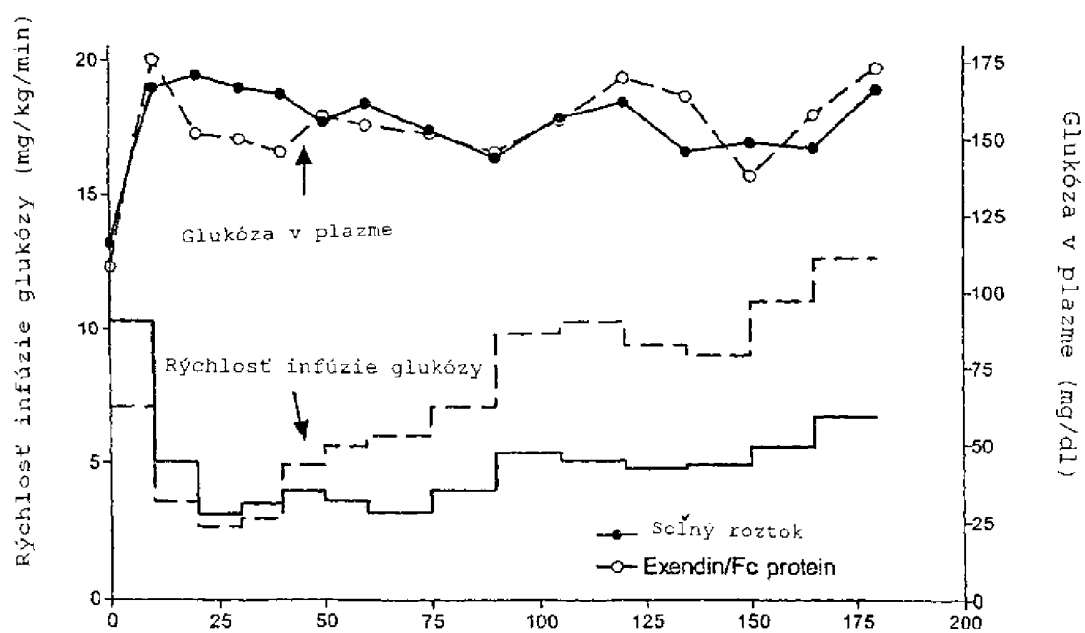
Obr. 9



11/17

Obr. 10

A.

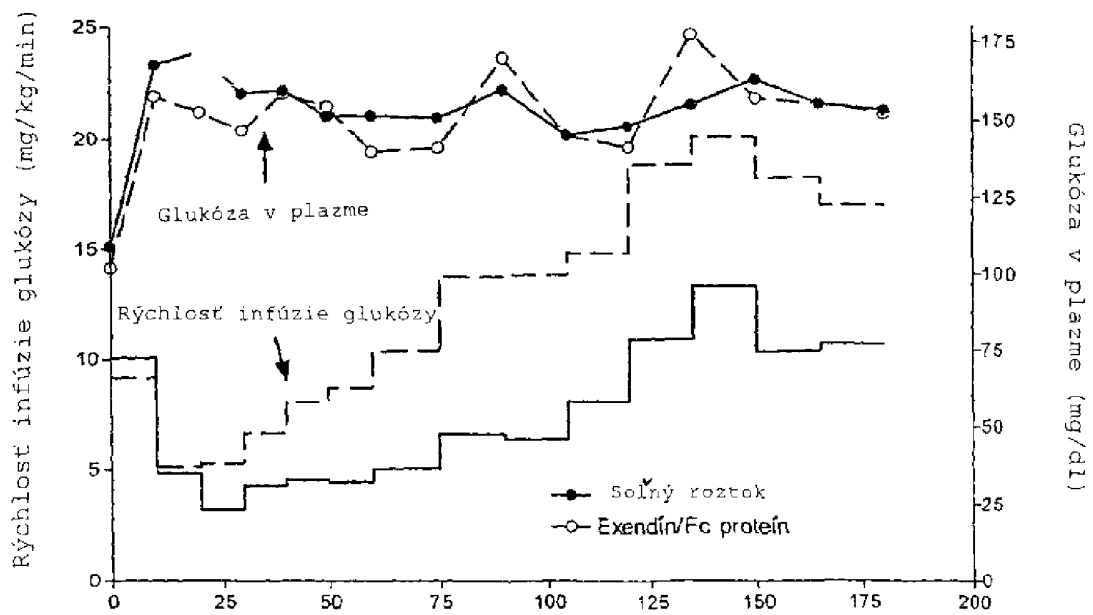


Čas od počiatku nastavenia svorky (min), injekcia fúzných proteínov 2 hodiny pred nastavením svorky

12/17

Obr. 10

B.

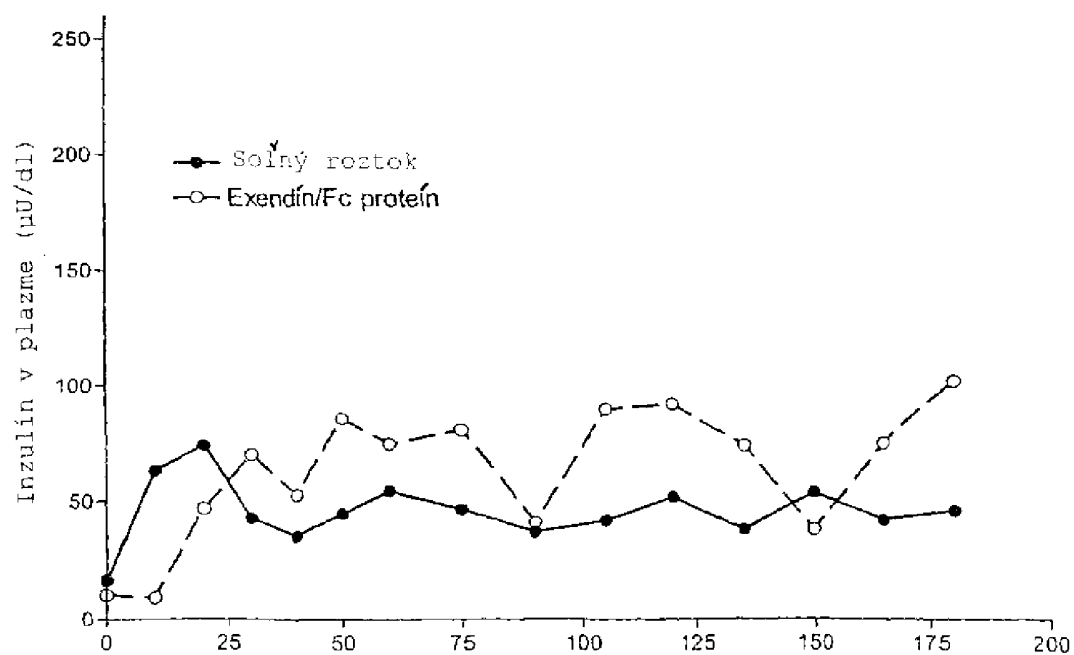


Čas od počiatku nastavenia svorky (min), injekcia
fúzných proteínov 2 hodiny pred nastavením svorky

13/17

Obr. 11

A.

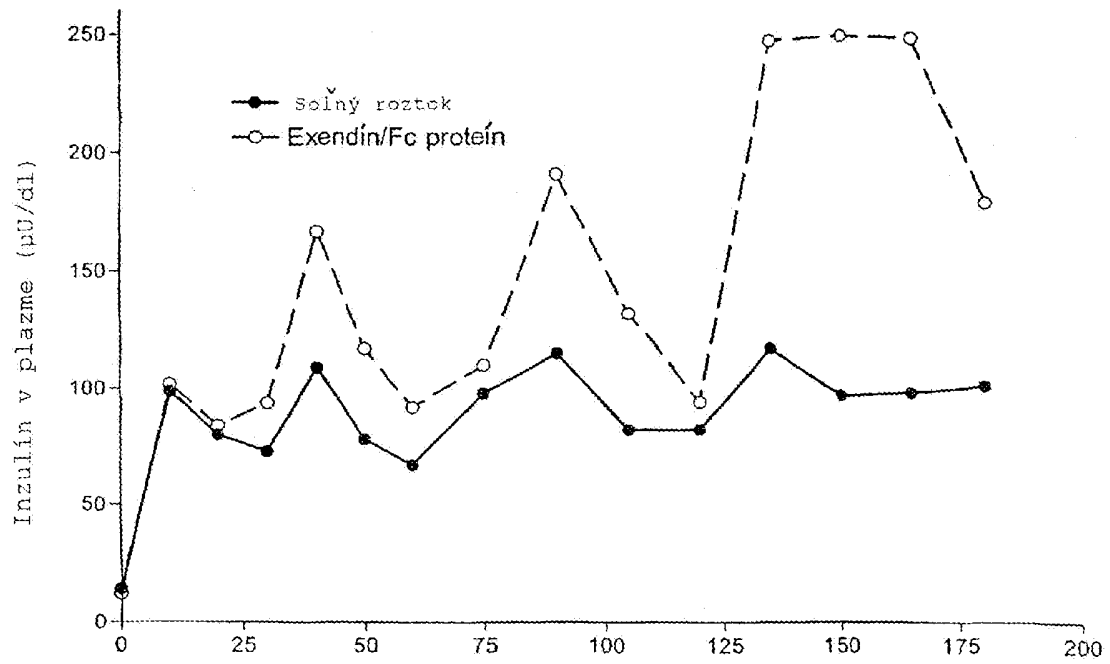


Čas od počiatku nastavenia svorky (min), injekcia
fúzných proteínov 2 hodiny pred nastavením svorky

14/17

Obr. 11

B.



Čas od počiatku nastavenia svorky (min), injekcia
fúzných proteínov 2 hodiny pred nastavením svorky

15/17

Obr. 12

1
GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCC
50
TGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGG
100
ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC
150
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
200
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
250
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
300
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
350
CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
400
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTG
450
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
500
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
550
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
600
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
650
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAT
700
AGT [SEQ ID NO: 33]

16/17

Obr. 13

1
GATGCGCACAAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTGGGAGAAGA
50
AAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGT
100
GTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCA
150
AAAACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCA
200
TACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT
250
ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAA
300
TGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAG
350
ACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACAT
400
TTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT
450
GCCCCGGAACCTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGA
500
ATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAGCTCGATG
550
AACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGT
600
GCCAGTCTCCAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGC
650
TCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGT
700
TAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTG
750
CTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAA
800
TCAAGATTCGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGT
850
TGGA AAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGA AAAATGATGAGATGCCTGCT
900
GACTTGCCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTTGAAAGTAAGGATGTTTGCAA
950
AAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAAT
1000
ATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTGCTGCTGCTGAGACTTGCC

17/17

Obr. 13 pokračovanie

1050
AAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCA
1100
TGAATGCTATGCCAAAGTGTTGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGC
1150
CTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAG
1200
TACAAATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCA
1250
AGTGTCAACTCCAACCTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGG
1300
GCAGCAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAA
1350
GACTATCTATCCGTGGTCCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAAC
1400
GCCAGTAAGTGACAGAGTCACCAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACA
1450
GGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAA
1500
GAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTTC
1550
TGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACTTGTTGAGCTCGTGA
1600
AACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGAT
1650
TTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTG
1700
CTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTAG
1750
GCTTATAATGAC [SEQ ID NO: 35]

Koniec dokumentu
