



(51) МПК

C07K 14/47 (2006.01)*C12N 15/12* (2006.01)*A61K 38/21* (2006.01)*A61P 5/50* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2005103396/13**, **11.07.2003**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.07.2003(30) Конвенционный приоритет:
12.07.2002 US 60/395,738(43) Дата публикации заявки: **20.09.2005**(45) Опубликовано: **10.07.2009** Бюл. № 19(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **GOURLET P. et al. Biochem. Pharmacol. 1997, 54 (4), 509-515. GOURLET P. et al. Eur. J. Pharmacol. 1998, 348 (1), 95-99. NICOLE P. et al. J. Biol. Chem. 2000, 275 (31), 24003-24012. WO 01/23420, 05.04.2001.**(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **14.02.2005**(86) Заявка РСТ:
US 03/21761 (11.07.2003)(87) Публикация РСТ:
WO 2004/006839 (22.01.2004)

Адрес для переписки:
**105064, Москва, а/я 88, ООО "Патентные
поверенные Квашнин, Сапельников и
партнеры", пат.пов. Д.А.Сапельникову**

(72) Автор(ы):

**ФРОЛАНД Уэйн А. (US),
КЕЛНЕР Дрю Н. (US),
ДЬЮМАС Майкл Л. (US),
ПЭН Кларк (US),
УИЛЭН Джеймс (US),
ВАНГ Ю-чанг Джон (US),
ВАНГ Вэй (US)**

(73) Патентообладатель(и):

БАЙЕР ХЕЛСКЕР ЛЛСш (US)**(54) АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА (VPAC2) ГИПОФИЗАРНОГО ПЕПТИДА, АКТИВИРУЮЩЕГО АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ (РАСАР), И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биохимии и биотехнологии и может быть использовано в производстве препаратов для лечения преддиабетических состояний, диабета 2 типа и нарушений переносимости глюкозы. Получены новые пептиды, проявляющие свойства селективных агонистов рецептора VPAC2, в частности способность стимулировать синтез инсулина и высвобождение его из β -клеток

поджелудочной железы глюкозозависимым способом, а также последующее снижение уровня глюкозы в плазме. Предлагаемые пептиды обладают повышенной эффективностью действия и стабильностью в сравнении с природными пептидами, что определяет возможность их успешного применения при лечении заболеваний и состояний, которые могут быть облегчены с помощью агентов с активностью агониста рецептора VPAC2. 13 с. и 1 з.п.ф-лы, 18 ил., 1

RU 2360922 C2

RU 2360922 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)*C12N 15/12* (2006.01)*A61K 38/21* (2006.01)*A61P 5/50* (2006.01)*A61P 3/10* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005103396/13, 11.07.2003**(24) Effective date for property rights:
11.07.2003(30) Priority:
12.07.2002 US 60/395,738(43) Application published: **20.09.2005**(45) Date of publication: **10.07.2009 Bull. 19**(85) Commencement of national phase: **14.02.2005**(86) PCT application:
US 03/21761 (11.07.2003)(87) PCT publication:
WO 2004/006839 (22.01.2004)

Mail address:
**105064, Moskva, a/ja 88, OOO "Patentnye
poverennye Kvashnin, Sapel'nikov i partnery",
pat.pov. D.A.Sapel'nikovu**

(72) Inventor(s):

**FROLAND Uehjn A. (US),
KELNER Drju N. (US),
D'JuMAS Majkl L. (US),
PEhN Klark (US),
UILEhN Dzhejms (US),
VANG Ju-chang Dzhon (US),
VANG Vehj (US)**

(73) Proprietor(s):

BAJER KhELSKER LLSi (US)**(54) AGONISTS OF RECEPTOR (VPAC2) OF HYPOPHYSIAL PEPTIDE, ACTIVATING ADENYLATCYCLASE (PACAP), AND PHARMACOLOGICAL METHODS OF THEIR APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; medicine.

SUBSTANCE: invention can be used in production of preparations for treatment of pre-diabetic states, type 2 diabetes and glucose tolerance disturbances. Novel peptides, demonstrating properties of selective receptor VPAC2 agonists, in particular ability to stimulate insulin synthesis and

its release from β -cells of pancreas by glucose-depending method, as well as following reduction of glucose level in plasma.

EFFECT: increased efficiency of action and stability in comparison with natural peptides, possibility of their successful application in treatment of diseases.

14 cl, 18 dwg, 1 tbl, 10 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область техники

Настоящее изобретение относится к впервые идентифицированным полипептидам и применению этих полипептидов для терапевтических целей. В частности, полипептиды настоящего изобретения пригодны для стимулирования высвобождения инсулина из β -клеток поджелудочной железы зависимым от глюкозы способом, таким образом обеспечивается возможность лечения пациентов с нарушениями обмена веществ, такими как диабет или нарушенная переносимость глюкозы, преддиабетическое состояние.

Предшествующий уровень техники

Диабет характеризуется нарушением метаболизма глюкозы, проявляющимся, среди прочего, в повышении уровня глюкозы в крови у пациентов с диабетом. В зависимости от дефекта диабет классифицируют на две основные группы: диабет 1 типа, или инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД, IDDM), возникающий, если у пациентов не хватает β -клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин, и диабет 2 типа, или инсулинонезависимый сахарный диабет (ИНСД, NIDDM), возникающий у пациентов с нарушением функций β -клеток или изменениями в действии инсулина.

В настоящее время лечение пациентов с диабетом 1 типа проводят инсулином, а большинство пациентов с диабетом 2 типа лечат агентами, стимулирующими функцию β -клеток, или агентами, повышающими чувствительность тканей пациентов к инсулину. С течением времени почти половина пациентов с диабетом 2 типа теряют восприимчивость к этим агентам и переходят на инсулиновую терапию. Ниже описаны препараты, применяемые в настоящее время для лечения диабета 2 типа.

Ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, Precose®, Voglibose® и Miglitol®) снижают колебания уровня глюкозы после еды путем задержки адсорбции глюкозы в кишечнике. Эти препараты безопасны и обеспечивают лечение пациентов со слабой или умеренной степенью диабета. Однако, в литературе сообщалось о побочных эффектах со стороны желудочно-кишечного тракта.

Инсулиновые сенситизаторы – это лекарства, усиливающие ответ организма на инсулин. Тиозолидиндионы, такие как Avandia™ (розиглитазон) и Actos™, активируют рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором (PPAR), подтипа гамма и модулируют активность набора генов, еще не описанных достаточно хорошо. От использования Rezulin™ (троглитазона), первого лекарства в этом классе, отказались из-за повышенного уровня ферментов печени и гепатотоксичности, индуцированной лекарством. Такие эффекты со стороны печени не являются значительной проблемой у пациентов, применяющих Avandia™ и Actos™. Даже в этом случае рекомендуется проверять уровень ферментов печени каждые 2 месяца в течение первого года лечения и периодически потом. Возможно, применение Avandia™ и Actos™ связано с задержкой жидкости и отеками. Применение Avandia™ не показано вместе с инсулином из-за возможности застойной сердечной недостаточности.

Стимуляторы секреции инсулина (например, производные сульфонилмочевины (SFU) и другие агенты, действующие через АТФ-зависимый канал K^+) представляют собой другой тип лекарств, применяемых в настоящее время для лечения диабета 2 типа. SFU являются стандартным лечением для пациентов с диабетом 2 типа с умеренной или средней голодной гликемией. Применение SFU имеет ряд ограничений, включающих возможность индуцирования гипогликемии, увеличения веса и высокий уровень первичных и вторичных отказов. У 10-20% пациентов, получающих лечение впервые, обнаруживается отсутствие значительного терапевтического эффекта (первичный отказ). Вторичный отказ выражается в потере терапевтического эффекта еще у 20-30% пациентов после 6 месяцев применения SFU. Через 5-7 лет лечения SFU 50% пациентов требуется инсулиновая терапия (Scheen, et al., Diabetes Res. Clin. Pract. 6:533-543, 1989).

Glucophage™ (метформин HCl) – это бигуанид, снижающий уровень глюкозы в крови путем снижения высвобождения глюкозы из печени и увеличения поглощения и утилизации периферической глюкозы. Это лекарство эффективно для снижения уровня глюкозы в крови пациентов с умеренной и средней степенью заболевания и не имеет побочных эффектов прибавки веса или возможного индуцирования гипогликемии. Однако, Glucophage™ обладает рядом побочных эффектов, включающих нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта и лактоцидоз. Glucophage™ противопоказан пациентам старше 70 лет и пациентам с нарушениями функций почек или печени. Кроме того, Glucophage™ обладает тем же уровнем первичных и вторичных отказов, что и SFU.

Инсулиновую терапию назначают в случае, если диета, упражнения и оральные препараты не позволяют адекватно контролировать уровень глюкозы в крови. Это лечение имеет ряд недостатков: его нужно вводить в инъекциях, оно может вызвать гипогликемию и приводит к увеличению веса.

Ввиду проблем, возникающих при существующих на данный момент способах лечения, существует потребность в новых способах лечения диабета 2 типа. В частности, нужны новые способы лечения для поддержания нормальной (зависимой от глюкозы) секреции инсулина. Такие новые препараты должны обладать следующими характеристиками: зависимое от глюкозы усиление секреции инсулина (т.е., усиление секреции инсулина только при повышении уровня глюкозы в крови); низкий уровень первичных и вторичных отказов; сохранение функций инсулоцитов (островковых клеток). Изложенная здесь стратегия разработки новых лекарств базируется на механизме передачи сигналов циклическим аденозин монофосфатом (цАМФ) и его влиянии на секрецию инсулина.

Циклический АМФ является основным регулятором процесса секреции инсулина. Повышение уровня этой сигнальной молекулы вызывает закрытие каналов K^+ вслед за активацией каскада протеинкиназы А. Закрытие каналов K^+ вызывает деполяризацию клеток и последующее открытие каналов Ca^{++} , что, в свою очередь, приводит к экзоцитозу гранул инсулина. В отсутствие низкой концентрации глюкозы не оказывается или оказывается очень небольшое влияние на секрецию инсулина (Weinhaus,

et al., Diabetes 47:1426-1435, 1998). Стимуляторы секреции типа гипоталамического пептида, активирующего аденилатциклазу (PACAP), и GLP-1 (глюкагон-подобный пептид 1) используют систему цАМФ для регуляции секреции инсулина зависимым от глюкозы способом (Komatsu, et al., Diabetes 46:1928-1938, 1997; Filipsson, et al., Diabetes 50:1959-1969, 2001; Drucker, Endocrinology 142:521-527, 2001). Стимуляторы секреции инсулина, действующие через повышение уровня цАМФ, такие как GLP-1 и PACAP, также могут усиливать синтез инсулина, помимо высвобождения инсулина (Skoglund, et al., Diabetes 49:1156-1164, 2000; Borboni, et al., Endocrinology 140:5530-5537, 1999).

PACAP является мощным стимулятором зависимой от глюкозы секреции инсулина из панкреатических β -клеток. Были описаны три разных типа рецепторов PACAP (PAC1, VPAC1 и VPAC2) (Harmar, et al., Pharmacol. Reviews 50:265-270, 1998; Vaudry, et al., Pharmacol. Reviews 52:269-324, 2000). PACAP не обладает селективностью по отношению к рецепторам, его активность и сила сравнимы для всех трех рецепторов. Рецепторы PAC1 расположены преимущественно в центральной нервной системе (ЦНС), в то время как VPAC1 и VPAC2 распространены более широко. Рецепторы VPAC1 расположены как в ЦНС, так и в печени, легких и кишечнике. Рецепторы VPAC2 расположены в ЦНС, поджелудочной железе, скелетных мышцах, сердце, почках, жировой ткани, яичках и желудке. Недавняя работа подтверждает тот факт, что VPAC2 отвечает за секрецию инсулина из β -клеток (Inagaki, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2679-2683, 1994; Tsutsumi, et al., Diabetes 51:1453-1460, 2002). Инсулинотропное действие PACAP опосредуется белком Gs, связывающим ГТФ. В свою очередь, накопление клеточного цАМФ активирует неселективные катионные каналы в β -клетках, повышая концентрацию $[Ca^{++}]$, и усиливает экзоцитоз секреторных гранул, содержащих инсулин.

PACAP является новейшим членом суперсемейства метаболических нейроэндокринных и нейротрансмиттерных пептидных гормонов, действующих через опосредованный цАМФ путь передачи сигнала (Arimura, Regul. Peptides 37:287-303, 1992). Биологически активные пептиды высвобождаются из биосинтетических предшественников в двух молекулярных формах, либо в виде пептида из 38 аминокислот

(PACAP-38), либо/и в виде пептида из 27 аминокислот (PACAP-27) с амидированным карбоксильным концом (Arimura, см. выше).

Самые высокие концентрации двух форм пептида обнаруживают в мозге и яичках (Arimura, см. выше). Более короткая форма пептида, PACAP-27, обладает 68% структурной гомологией с вазоактивным интестинальным полипептидом (VIP). Однако, распределение PACAP и VIP по центральной нервной системе предполагает выраженные нейротрансмиттерные функции этих структурно связанных полипептидов (Koves, et al., *Neuroendocrinology* 54:159-169, 1991).

Недавние исследования выявили разнообразные биологические свойства PACAP-38, от роли в репродукции (McArdle, *Endocrinology* 135:815-817, 1994) до способности стимулировать секрецию инсулина (Yada, et al., *J. Biol. Chem.* 269:1290-1293, 1994). Кроме того, PACAP, по-видимому, играет роль в гормональной регуляции метаболизма липидов и углеводов (Gray, et al., *Mol. Endocrinol.* 15:1739-47, 2001); циркадианной функции (Harmar, et al., *Cell* 109: 497-508, 2002); и иммунной системе, росте, энергетическом гомеостазе и мужской репродуктивной функции (Asnicar, et al., *Endocrinol.* 143:3994-4006, 2002); регуляции аппетита (Tachibana, et al., *Neurosci. Lett.* 339:203-206, 2003); а также в острых и хронических воспалительных заболеваниях, септическом шоке и аутоиммунных заболеваниях (например, красной системной волчанке) (Pozo, *Trends Mol. Med.* 9:211-217, 2003).

Вазоактивный интестинальный пептид (VIP) представляет собой пептид из 28 аминокислот, впервые выделенный из верхнего отдела тонкой кишки свиньи (Said and Mutt, *Science* 169:1217-1218, 1970; U.S. Patent No. 3,879,371). Этот пептид принадлежит к семейству структурно связанных небольших полипептидов, включающему гелодермин, секретин, соматостатины и глюкагон. Биологическое действие VIP опосредуется активацией связанных с мембраной рецепторных белков, связанных с внутриклеточной сигнальной системой цАМФ. Изначально эти рецепторы были известны как VIP-R1 и VIP-R2, однако, позднее было обнаружено, что они представляют собой те же рецепторы, что и VPAC1 и VPAC2. Для VIP характерна сравнимая активность и мощность в рецепторах VPAC1 и VPAC2.

Для повышения стабильности VIP в легочной жидкости человека был создан ряд вариантов VIP, разработанных для повышения спиральности этого пептида и снижения степени протеолитического разложения (Bolin, et al., Biopolymers 37:57-66, 1995). Замены были сфокусированы в положениях 8, 12, 17 и 25-28, считающихся не важными для связывания с рецептором. Кроме того, к С-концу мутантных белков была присоединена последовательность "GGT" для более эффективного кэпширования спирали. Наконец, для дальнейшей стабилизации спирали было синтезировано несколько циклических вариантов (US. Patent No. 5,677,419). Хотя эти усилия не были направлены на селективность к рецептору, в результате были получены два аналога с более чем 100-кратной селективностью к VPAC2 (Gourlet, et al., Peptides 18:403-408, 1997; Xia, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 281:629-633, 1997).

GLP-1 высвобождается из L-клеток кишечника после еды и действует как гормон инкреции (т.е., он усиливает индуцированное глюкозой высвобождение инсулина из панкреатических β -клеток). Он представляет собой пептид из 37 аминокислот, различно экспрессируемый геном глюкагона в зависимости от типа ткани. Были получены клинические данные, подтверждающие благотворное действие GLP-1 по повышению уровня цАМФ в β -клетках. Вливание GLP-1 пациентам с плохо контролируемым диабетом 2 типа нормализовало у них уровень «голодной» глюкозы в крови (Gutniak, et al., New Eng. J. Med. 326:1316-1322, 1992), а более долгие вливания улучшали функцию β -клеток до нормального уровня (Rachman, et al., Diabetes 45:1524-1530, 1996). Последние сообщения указывают на то, что GLP-1 повышает способность β -клеток реагировать на глюкозу у пациентов с нарушениями переносимости глюкозы (Bugne, et al., Diabetes 47:1259-1265, 1998). Однако, все эти эффекты непродолжительны из-за короткого периода полураспада пептида.

Amylin Pharmaceuticals проводит испытания III фазы препарата Exendin 4TM (AC2993), пептида из 39 аминокислот, первоначально идентифицированного в ящерице Gila Monster. Amylin сообщает, что клинические испытания демонстрируют улучшение гликемического контроля у пациентов с диабетом 2 типа, получающих лечение препаратом Exendin 4TM. Однако, зафиксировано значительное количество случаев тошноты и рвоты.

В заявке WO 01/23420, описание которой включена в настоящую во всей полноте, заявителями описаны новые полипептиды, функционирующие *in vivo* в качестве агонистов рецептора VPAC2, и в частности, заявлен агонист VPAC2, обозначенный как R3P66. Однако, описанные полипептиды, включая R3P66, не подходят для коммерческого использования, учитывая проблемы со стабильностью, связанные с полипептидами в составах, а также проблемы короткого периода полураспада полипептидов.

Существует потребность в улучшенных пептидах, обладающих зависимой от глюкозы активностью стимуляции секреции PACAP, GLP-1 или Exendin 4TM, но с меньшими побочными эффектами, и предпочтительно стабильных в составах и с длинным периодом полураспада в плазме. Кроме того, более жесткий контроль уровня глюкозы в плазме может предотвратить долгосрочные диабетические осложнения. Таким образом, новые лекарства от диабета должны обеспечивать пациентам лучшее качество жизни.

Краткое содержание изобретения

Настоящее изобретение предоставляет новые полипептиды, функционирующие *in vivo* в качестве агонистов рецептора VPAC2 (далее VPAC2) и эффективные при лечении заболеваний и состояний, которые могут быть облегчены применением агентов, обладающих активностью агониста VPAC2. Предпочтительные полипептиды настоящего изобретения являются селективными агонистами VPAC2, обладающими большей мощностью по отношению к VPAC2 по сравнению с VPAC1 и PAC1. Например, но не в качестве ограничивающего примера, эти полипептиды стимулируют синтез инсулина и высвобождение из β -клеток поджелудочной железы глюкозозависимым способом и последующее снижение уровня глюкозы в плазме. Было показано, что при стимуляции глюкозой эти стимулирующие секрецию полипептиды снижают уровень глюкозы в крови *in vivo* эффективнее, чем контрольный носитель. Более предпочтительные полипептиды настоящего изобретения стабильны в составах и обладают длинным периодом полураспада в плазме и продолжительным действием *in vivo*, если они дериватизированы.

Полипептиды настоящего изобретения обеспечивают новое лечение для пациентов, например, с нарушениями обмена веществ, происходящими от снижения секреции эндогенного инсулина, в частности, с диабетом 2 типа, или для пациентов с нарушением переносимости глюкозы, преддиабетическим состоянием, характеризующимся слабым нарушением секреции инсулина. Кроме того, полипептиды настоящего изобретения можно применять для предотвращения и/или лечения диабета 1 типа, гестационного диабета, диабета взрослого типа у молодых (MODY), латентного аутоиммунного диабета взрослых (LADA), и ассоциированной диабетической дислипидемии и других диабетических осложнений, а также гипергликемии, гиперинсулинемии, нарушенной переносимости глюкозы, нарушенного уровня «голодной» глюкозы (impaired fasting glucose), дислипидемии, гипертриглицеридемии, синдрома X и резистентности к инсулину.

Полипептиды настоящего изобретения также можно применять для предотвращения и/или лечения ожирения (например, регуляция аппетита и потребления пищи), атеросклеротического заболевания, гиперлипидемии, гиперхолестеремии, низких уровней ЛВП (липопротеин высокой плотности), гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний (включая атеросклероз, коронарную болезнь сердца, болезнь коронарной артерии и гипертензию), заболеваний сосудов головного мозга и заболеваний периферических сосудов; а также для предотвращения и/или лечения волчанки, синдрома поликистоза яичника, канцерогенеза и гиперплазии, астмы, проблем репродукции у мужчин, язвы, нарушений сна, нарушений метаболизма липидов и углеводов, циркадианной дисфункции, нарушений роста, нарушений гомеостаза энергии, иммунных заболеваний, включая аутоиммунные заболевания (например, системную красную волчанку), а также острых и хронических воспалительных заболеваний, септического шока и других состояний, указанных здесь или описанных ниже.

В частности, одним из аспектов изобретения является полипептид, выбираемый из группы, включающей последовательности с номерами SEQ ID с 1 по 152, и их фрагменты, производные и варианты, обладающие, по крайней мере, одним биологическим свойством, по существу одинаковым со свойством полипептидов, кодируемых этими последовательностями (в общем, «полипептидов настоящего изобретения»), включая функциональные эквиваленты этих полипептидов. Предпочтительным ва-

риантом осуществления настоящего изобретения является полипептид, выбираемый из группы, включающей последовательности с номерами SEQ ID с 1 по 38 и SEQ ID с 115 по 152, и их фрагменты, производные и варианты, обладающие, по крайней мере, одним биологическим свойством, по существу одинаковым со свойством полипептидов, кодируемых этими последовательностями. Более предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является полипептид, выбираемый из группы, включающей последовательности с номерами SEQ ID с 1 по 5 и SEQ ID с 115 по 119, и их фрагменты, производные и варианты, обладающие, по крайней мере, одним биологическим свойством, по существу одинаковым со свойством полипептидов, кодируемых этими последовательностями. Наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является полипептид, выбираемый из группы, включающей последовательности с номерами SEQ ID 1, 2, 115 и 116, и их фрагменты, производные и варианты, обладающие, по крайней мере, одним биологическим свойством, по существу одинаковым со свойством полипептидов, кодируемых этими последовательностями.

Другим вариантом осуществления изобретения является полинуклеотид, кодирующий полипептиды настоящего изобретения, и сопутствующие векторы и клетки-хозяева, необходимые для рекомбинантной экспрессии полипептидов изобретения. Эти полинуклеотидные последовательности представлены под номерами SEQ ID 154-264.

Также включены антитела и фрагменты антител, селективно связывающиеся с полипептидами изобретения. Такие антитела применимы при обнаружении полипептидов настоящего изобретения и могут быть идентифицированы и созданы методами, хорошо известными в данной области техники. Были созданы поликлональное N-концевое антитело IgG и моноклональное C-концевое антитело Fab, узнающие полипептиды настоящего изобретения.

Настоящее изобретение направлено также на способ лечения диабета, заболеваний, связанных с диабетом, и/или других заболеваний или состояний у млекопитающих, на которые влияют полипептиды настоящего изобретения, предпочтительно – функции агониста VPAC2, присущие полипептидам настоящего изобретения; способ

включает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества любого из полипептидов настоящего изобретения или любого полипептида с активностью в рецепторе VPAC2, такого как SEQ ID Nos: 1 - 152.

Также описаны способы получения полипептидов настоящего изобретения, как рекомбинантный, так и синтетический.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1a-1d приведены аминокислотные последовательности полипептидов с номерами SEQ ID Nos: 1 - 152. Последовательности SEQ ID Nos: 115 - 152 относятся к пептидам, пэгилированным по С-концевому цистеину через малеимидную связь. Полиэтиленгликоль может быть линейным, 22 кДа, или разветвленным, 43 кДа.

На Фиг.2 приведена последовательность ДНК (SEQ ID NO: 153), клонированная в вектор pGEX-6P-1 для получения аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. Подчеркнутые сайты ферментов рестрикции BamHI и XhoI позволяют клонирование «в рамку» в экспрессионный вектор pGEX-6P-1. Жирным шрифтом выделены 12-членная последовательность ДНК, кодирующая сайт узнавания Фактора Ха и 2 стоп-кодона. Невыделенная последовательность в середине кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Кодоны, измененные по сравнению с VIP, указаны малыми заглавными буквами.

На Фиг. 3a-3h приведены последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NOs: 154-264. Эти последовательности кодируют полипептиды настоящего изобретения.

На Фиг. 4 приведена диаграмма, иллюстрирующая секрецию инсулина диспергированными островковыми клетками крыс после воздействия пэгилированного пептида настоящего изобретения.

На Фиг. 5 приведена диаграмма, демонстрирующая усиление усвоения глюкозы у крыс при подкожном (SC) введении пэгилированного пептида настоящего изобретения.

На Фиг. 6 приведена стабильность трех аналогов VPAC2 (P5, P7 и контроль, R3P66) при концентрации 1 мг/мл в водном растворе, содержащем 150 mM NaCl и 20 mM фосфата, при pH 8,0 при инкубировании при 40°C. Для определения чистоты пептида образцы анализировали методом капиллярного электрофореза. Чистоту в моменты времени 2 и 4 недели выражали в процентах по отношению к исходной чистоте.

На Фиг. 7 приведена стабильность трех аналогов VPAC2 (P5, P7 и контроль, R3P66) при концентрации 2 мг/мл в диметилсульфоксиде (ДМСО) при инкубировании при 40°C. Для определения чистоты пептида образцы анализировали методом капиллярного электрофореза. Чистоту в моменты времени 2 и 4 недели выражали в процентах по отношению к исходной чистоте.

Фиг. 8 иллюстрирует селективное узнавание полноразмерного пэгилированного пептида по сравнению с аналогичным пэгилированным пептидом с делецией одной аминокислоты на N-конце.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предоставляет новые полипептиды и их фрагменты, производные и варианты, обладающие, по крайней мере, одним биологическим свойством, по существу одинаковым со свойством полипептидов, приведенных на Фиг. 1a-1d (в общем, «полипептидов настоящего изобретения»). Полипептиды настоящего изобретения *in vivo* функционируют в качестве агонистов VPAC2, иначе, для предотвращения и/или лечения таких заболеваний и состояний, как диабет, включая диабет как 1, так и 2 типа, гестационный диабет, диабет взрослого типа у молодых (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994); и ассоциированная диабетическая дислипидемия и другие диабетические осложнения, а также гипергликемия, гиперинсулинемия, нарушенная переносимость глюкозы, нарушенный уровень «голодной» глюкозы, дислипидемия, гипертриглицеридемия, Синдром X и резистентность к инсулину.

Кроме того, полипептиды настоящего изобретения также можно применять для предотвращения и/или лечения ожирения (например, регуляция аппетита и потребления

пищи), атеросклеротического заболевания, гиперлипидемии, гиперхолестеремии, низких уровней ЛВП, гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний (включая атеросклероз, коронарную болезнь сердца, болезнь коронарной артерии и гипертензию), заболеваний сосудов головного мозга и заболеваний периферических сосудов; а также для предотвращения и/или лечения волчанки, синдрома поликистоза яичника, канцерогенеза и гиперплазии, астмы, проблем репродукции у мужчин, включая подвижность спермы, язвы, нарушений сна и других состояний, указанных здесь, или эти полипептиды могут функционировать иначе, как описано ниже.

Предпочтительно, полипептиды настоящего изобретения стимулируют высвобождение инсулина из β -клеток поджелудочной железы глюкозозависимым способом. Более предпочтительно, полипептиды настоящего изобретения стабильны как в водных, так и в неводных составах и характеризуются периодом полураспада в плазме большим, чем один час.

Полипептиды настоящего изобретения являются агонистами VPAC2. Предпочтительно, они являются селективными агонистами VPAC2, с, по крайней мере, 10-кратной селективностью по отношению к VPAC2 по сравнению с VPAC1 и/или PAC1. Более предпочтительно, эти полипептиды являются селективными агонистами VPAC2, с, по крайней мере, 100-кратной селективностью по отношению к VPAC2 по сравнению с VPAC1 и/или PAC1. Наиболее предпочтительно, они стимулируют высвобождение инсулина в плазму глюкозозависимым способом без индуцирования стаза или повышения уровня глюкозы в плазме, что приводит к обратным результатам при лечении, например, диабета 2 типа. Кроме того, предпочтительно, чтобы полипептиды настоящего изобретения были селективными агонистами рецептора VPAC2, вызывая, например, усиление высвобождения инсулина в плазму, не взаимодействуя с другими рецепторами, отвечающими за такие неприятные или опасные побочные эффекты, как задержка воды в желудочно-кишечном тракте, и/или нежелательные сердечно-сосудистые эффекты, такие как повышение сердечного ритма.

Полипептиды настоящего изобретения также стабильны в водных и неводных составах. Предпочтительно, полипептиды настоящего изобретения демонстрируют менее

10% деградации при 37-40°C в течение одной недели при растворении в воде (рН между 7-8) или неводном органическом растворителе. Более предпочтительно, полипептиды настоящего изобретения демонстрируют менее 5% деградации при 37-40°C в течение одной недели при растворении в воде (рН между 7-8) или неводном органическом растворителе. Кроме того, композиции и составы согласно настоящему изобретению могут содержать полипептиды настоящего изобретения и от около 2% до около 30% ДМСО (диметилсульфоксид). В другом варианте осуществления изобретения композиции и составы по настоящему изобретению могут по желанию содержать от около 0,2% до около 3% (масса/объем) дополнительных растворителей, таких как пропиленгликоль, диметилформамид, пропилен карбонат, полиэтиленгликоль и триглицериды.

Наконец, предпочтительно, чтобы дериватизированные полипептиды настоящего изобретения обладали периодом полураспада в плазме, по крайней мере, один час у крыс после IV инъекции, более предпочтительно период полураспада в плазме составляет, по крайней мере, 2 часа, еще более предпочтительно – по крайней мере, 3 часа.

Полипептиды настоящего изобретения обеспечивают новый способ лечения пациентов с пониженной секрецией эндогенного инсулина или нарушенной переносимостью глюкозы, в частности, с диабетом 2 типа. Так, полипептиды настоящего изобретения являются агонистами VPAC2 продолженного действия и могут применяться для поддержания, улучшения и восстановления секреции инсулина, стимулируемой глюкозой. Более того, селективный пептидный агонист рецептора VPAC2 усиливает глюкозозависимую секрецию инсулина в поджелудочной железе, не вызывая побочных эффектов, связанных с неселективной активацией других рецепторов PACAP.

Далее приведены определения некоторых терминов, используемых в данном описании, другие термины пояснены по мере появления. Однобуквенные сокращения аминокислот, соответствующие аминокислоты и трехбуквенные сокращения следующие: А, аланин (ala); С, цистеин (cys); D, аспарагиновая кислота (asp); Е, глутаминовая кислота (glu); F, фенилаланин (phe); G, глицин (gly); H, гистидин (his); I,

изолейцин (ile); K, лизин (lys); L, лейцин (leu); M, метионин (met); N, аспарагин (asn); P, пролин (pro); Q, глутамин (gln); R, аргинин (arg); S, серин (ser); T, треонин (thr); V, валин (val); W, триптофан (trp); Y, тирозин (tyr).

Термин «полинуклеотид, кодирующий полипептид» означает как полинуклеотид, содержащий только кодирующую последовательность для полипептида, так и полинуклеотид, содержащий дополнительные кодирующие и/или некодирующие последовательности. Кроме того, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, которые гибридизуются с вышеуказанными последовательностями, если последовательности идентичны, по крайней мере, на 70%, предпочтительно – по крайней мере, на 90%, наиболее предпочтительно – по крайней мере, на 95%. Настоящее изобретение в частности относится к кодирующим полипептиды полинуклеотидам, которые гибридизуются в жестких условиях с вышеуказанными полинуклеотидами. В настоящем документе термин «жесткие условия» означает «жесткие условия гибридизации». Предпочтительно, гибридизация происходит только в случае, если последовательности идентичны, по крайней мере, на 90%, предпочтительно – примерно на 95-97%. Полинуклеотиды, гибридизующиеся с вышеуказанными полинуклеотидами, в предпочтительном варианте осуществления изобретения кодируют полипептиды, сохраняющие по существу такую же биологическую функцию или активность, что и зрелый полипептид, кодируемый кДНК.

Каждый из терминов «функциональный эквивалент» и «по существу такая же биологическая функция или активность» означает, что степень биологической активности составляет приблизительно от 30% до 100% или более от активности полипептида сравнения, при условии, что биологическую активность каждого полипептида определяют одним способом. Например, полипептидом, функционально эквивалентным полипептиду Фиг. 1, является тот, который при исследовании в сцинтилляционном анализе SPA Примера 7 демонстрирует аккумуляцию цАМФ в линии клеток СНО, экспрессирующих рецептор VPAC2 человека.

Полипептид настоящего изобретения, являющийся агонистом VPAC2 – это полипептид, который демонстрирует приблизительно от 30% до 100% или более максимальной активности агониста VPAC2 PACAP-27 при исследовании согласно прото-

колу Примера 7. Предпочтительные полипептиды настоящего изобретения, являющиеся селективными агонистами рецептора VPAC2 по сравнению с рецепторами PACAP, VPAC1, и PAC1 – это полипептиды, которые демонстрируют отношение активности агониста VPAC2 к активности VPAC1 приблизительно 10:1 или более, и более предпочтительно - около 100:1 или более, и/или демонстрируют отношение активности агониста VPAC2 к активности в рецепторе PAC1 приблизительно 10:1 или более, и более предпочтительно – около 100:1 или более, при исследовании полипептида согласно протоколу Примера 7, при использовании клеток, экспрессирующих соответствующие рецепторы.

Термин "жесткие условия гибридизации" означает ночную инкубацию двух подлежащих гибридизации полинуклеотидов (или фрагментов) при 42°C в растворе, содержащем 50%-ый формамид, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM цитрата натрия), 50 mM фосфата натрия (pH 7,6), 5x раствор Денхардта, 10%-ый декстран сульфат и 20 мкг/мл денатурированной порезанной ДНК спермы лосося, с последующей отмывкой фильтров в 0,1x SSC при температуре около 65°C.

Термины "фрагмент", "производное" и "вариант" по отношению к полипептидам Фиг. 1 означают фрагменты, производные и варианты полипептидов, которые сохраняют в основном ту же самую биологическую функцию или активность, что и полипептиды, как описано далее.

Аналог содержит прополипептид, который содержит в себе аминокислотную последовательность полипептида настоящего изобретения. Активный полипептид настоящего изобретения может быть отщеплен от дополнительных аминокислот, которые составляют прополипептидную молекулу, естественными, *in vivo* процессами или методами, хорошо известными в данной области техники, таких как ферментативное или химическое расщепление. Например, нативный пептид VIP из 28 аминокислот в природе экспрессируется в виде намного большего полипептида, который затем подвергается процессингу *in vivo*, с образованием активного зрелого пептида из 28 аминокислот.

Фрагмент - это часть полипептида, которая сохраняет в основном сходную функциональную активность, как описано здесь на моделях *in vivo*.

5 Производное включает все модификации полипептида, которые в основном сохраняют функции, описанные здесь, и включают дополнительную структуру и сопутствующую функцию (например, пэгилированные полипептиды, которые имеют боль-
10 ший период полураспада), слитые полипептиды (фьюжн-полипептиды), которые придают специфику направленности или дополнительную активность типа токсичность к предназначенной цели, как описано далее.

15 Полипептиды настоящего изобретения могут быть рекомбинантными полипептидами, очищенными природными полипептидами или синтетическими полипептидами.

20 Фрагмент, производное или вариант полипептидов настоящего изобретения могут представлять собой (i) фрагмент, производное, или вариант, в котором один или более аминокислотных остатков замещены на консервативный или неконсервативный
25 аминокислотный остаток (предпочтительно, консервативный аминокислотный остаток) и такой замещенный аминокислотный остаток может быть или не быть остатком, кодируемым генетическим кодом, или (ii) фрагмент, производное или вариант, в котором один или более аминокислотных остатков содержит замещающую группу,
30 или (iii) фрагмент, производное или вариант, в котором зрелый полипептид соединен с другим соединением, таким как соединение для увеличения периода полураспада полипептида (например, полиэтиленгликоль), или (iv) фрагмент, производное, или
35 вариант, в котором к зрелому полипептидному присоединены дополнительные аминокислоты, такие как лидерная или секреторная последовательности или последовательность, используемая для очистки зрелого полипептида или прополипептидной
40 последовательности, или (v) фрагмент, производное, или вариант, в котором полипептидная последовательность соединена с большим полипептидом (например, альбумин человека, антитело или Fc, для увеличения продолжительности эффекта). Та-
45 кие фрагменты, производные и варианты и аналоги находятся в пределах квалификации специалиста в данной области техники и ясны из приведенных здесь сведений.

Предпочтительно, производные настоящего изобретения содержат консервативные аминокислотные замены (определенный ниже), сделанный по одному или более предсказанным, предпочтительно заменимым (неэссенциальным) аминокислотным остаткам. "Заменимый" (неэссенциальный) аминокислотный остаток – это остаток, который может быть изменен по сравнению с последовательностью белка дикого типа без изменения биологической активности, тогда как "незаменимый" (эссенциальный) остаток аминокислоты требуется для биологической активности. "Консервативная аминокислотная замена" – это замена, при которой аминокислотный остаток заменен остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, известны в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Неконсервативные замены не следует делать для консервативных аминокислотных остатков или для остатков, находящихся в пределах консервативного домена белка, таких как остатки 19 и 27, которые являются существенными для активности белка, такой как активность VPAC2 и/или селективность к VPAC2. Фрагменты или биологически активные части содержат полипептидные фрагменты, пригодные для использования в качестве лекарственных средств, для получения антител, в качестве реактива для исследования и подобных целей. Фрагменты содержат пептиды, включающие аминокислотные последовательности, достаточно сходные или производные от аминокислотных последовательностей полипептида настоящего изобретения, и обладающие, по крайней мере, одной активностью этого полипептида, но содержащие меньше аминокислот, чем полноразмерные полипептиды, описанные здесь. Как правило, биологически активные части включают домен или часть, по крайней мере, с одной активностью полипептида. Биологически активной частью полипептида может быть пептид, который, например, содержит пять или более аминокислот. Такие биологически активные части могут быть получены синтетически или рекомбинационными методами и могут быть оценены по одной или более функ-

циональным активностям полипептида настоящего изобретения способом, описанным здесь и/или известным в данной области техники.

Кроме того, предпочтительные производные настоящего изобретения включают зрелые полипептиды, соединенные с другим соединением, таким как соединение для увеличения периода полураспада полипептида и/или снижения потенциальной иммуногенности полипептида (например, полиэтиленгликоль, ПЭГ). В случае пэгилирования соединение полипептида с полиэтиленгликолем может быть осуществлено любым способом, известным в данной области техники. Например, для пэгилирования можно сначала ввести мутацию цистеина в полипептид для получения линкера, через который присоединяется ПЭГ, а затем провести сайт-специфическую дериватизацию с ПЭГ-малеимидом. Цистеин может быть добавлен к С-концу пептидов, и этот сайт является предпочтительным в настоящем изобретении. (см., например, Tsutsumi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (15):8548-53, 2000; Veronese, Biomaterials 22:405-417, 2001; Goodsoon & Katre, Bio/Technology 8:343-346, 1990). Варианты полипептидов настоящего изобретения включают полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, достаточно сходную с аминокислотными последовательностями SEQ ID NOs на Фиг. 1 или их доменов. Термин “достаточно сходный” означает, что первая аминокислотная последовательность содержит достаточное или минимальное число идентичных или эквивалентных аминокислотных остатков по сравнению со второй последовательностью так, что первая и вторая аминокислотные последовательности имеют общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, здесь как достаточно сходные рассматриваются аминокислотные последовательности, содержащие общий структурный домен, который является, по крайней мере, приблизительно на 45%, предпочтительно - приблизительно на 75% - 98% идентичным. Предпочтительно, чтобы варианты были достаточно сходны с аминокислотными последовательностями предпочтительных полипептидов настоящего изобретения. Варианты включают варианты полипептидов, кодируемых полинуклеотидом, который гибридизуется с полинуклеотидом настоящего изобретения или комплементарным полинуклеотидом в жестких условиях. Такие варианты обычно сохраняют функциональную активность полипептидов настоящего изобретения. Для создания разнородной совокупности фрагментов для скрининга и последующего отбора можно использовать библиотеки фрагментов по-

линуклеотидов. Например, библиотеку фрагментов можно создать обработкой двухцепочечного ПЦР-фрагмента полинуклеотида нуклеазой в условиях, при которых одноцепочечный разрыв случается только один раз на молекулу, денатурацией двухцепочечной ДНК, восстановлением ДНК с образованием двухцепочечной ДНК, которая может содержать смысловые/несмысловые пары от различных продуктов разрыва, удалением одноцепочечных частей из преобразованных дуплексов обработкой нуклеазой S1, и лигированием получившейся библиотеки фрагментов в вектор экспрессии. Этим методом можно получить экспрессионную библиотеку, кодирующую N-концевые и внутренние фрагменты полипептидов настоящего изобретения различных размеров.

Варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Варианты, которые функционируют как агонисты VPAC2, могут быть идентифицированы скринингом комбинаторных библиотек мутантов, например усеченных мутантов, полипептидов этого изобретения на наличие активности агониста VPAC2.

В одном варианте осуществления изобретения разнородная библиотека аналогов получена комбинаторным мутагенезом на уровне нуклеиновой кислоты, и она кодируется разнородной библиотекой генов. Разнородную библиотеку вариантов можно получить, например, ферментативным лигированием смеси синтетических олигонуклеотидов в последовательности генов, так чтобы вырожденный набор потенциальных вариантных аминокислотных последовательностей экспрессировался в виде индивидуальных полипептидов, или, альтернативно, в виде набора больших слитых белков (например, для фагового дисплея), содержащих в себе набор последовательностей. Для получения библиотек потенциальных вариантов из вырожденной олигонуклеотидной последовательности можно использовать различные методы. Химический синтез вырожденной последовательности гена можно осуществить в автоматическом синтезаторе ДНК, а синтетический ген затем лигируют в соответствующий вектор экспрессии. Использование вырожденного набора генов позволяет получить в одной смеси все последовательности, кодирующие требуемый набор потенциальных вариантных последовательностей. Методы синтеза вырожденных олигонуклеотидов известны в данной области техники (см, например, Narang, Tetrahedron 39:3, 1983;

Itakura, et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; Itakura, et al., Science 198:1056, 1984; Ike, et al., Nucleic Acid Res. 11:477, 1983).

В данной области техники известно несколько методов для скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, полученных точечными мутациями или усечением, и для скрининга библиотек кДНК на наличие генных продуктов, обладающих выбранным свойством. Такие методы можно адаптировать для быстрого скрининга генных библиотек, полученных комбинаторным мутагенезом полипептидов R-агонистов. Наиболее широко применимые методы, подходящие для высокопроизводительного анализа для скрининга больших генных библиотек обычно включают клонирование библиотеки генов в реплицирующиеся векторы экспрессии, трансформацию подходящих клеток полученной библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, при которых обнаружение желательной активности способствует выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. Для идентификации требуемых вариантов в комбинации со скринингом можно применять рекурсивный множественный мутагенез (REM), методику, которая повышает частоту функциональных мутантов в библиотеках.

Изобретение также обеспечивает химерные полипептиды или слитые полипептиды. Для локализации доставки полипептида в поджелудочную железу с целью минимизации потенциальных побочных эффектов используют последовательность для нацеливания (targeting sequence). Полипептиды настоящего изобретения могут состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями (т.е., изостеры пептида), и могут содержать аминокислоты, отличные от 20 кодируемых геном аминокислот. Полипептиды могут быть модифицированы либо естественными процессами, такими как посттрансляционный процессинг, либо химическими методами модификации, хорошо известными в данной области техники. Такие модификации подробно описаны в основных текстах и в более детальных монографиях, а также в широкой исследовательской литературе. Модификации могут встречаться в любом месте полипептида, включая основу пептида, боковые цепи аминокислот и амино- или карбокси-концы. Следует понимать, что модификация одного типа может присутствовать в той же или различных степенях в нескольких сайтах в данном полипептиде. Также, данный полипеп-

тид может содержать модификации нескольких типов. Полипептиды могут быть разветвленными, например, в результате убиквитинирования, и они могут быть циклическими, с разветвлением или без. Циклические, разветвленные, и разветвленные циклические полипептиды могут являться результатом естественных посттрансляционных процессов или могут быть получены синтетическими методами. Модификации включают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование якоря GPI (гликозилфосфатидилинозитол), гидроксилирование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пэггилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, добавление аминокислот к белкам посредством транспортной РНК, такое как аргинилирование и убиквитинирование (см., например, *Proteins, Structure and Molecular Properties*, 2nd ed., T. E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter, et al., *Meth. Enzymol* 182:626-646, 1990; Rattan, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62, 1992).

Полипептиды настоящего изобретения включают полипептиды Фиг. 1 (SEQ ID NOs: 1 - 152), а также те последовательности, которые содержат несущественные вариации по сравнению с ними. Термин “несущественная вариация” означает любой вариант вследствие добавления, замены или делеции в последовательности, который сохраняет в основном, по крайней мере, одну биологическую функцию полипептидов настоящего изобретения, предпочтительно активность агониста VPAC2, и более предпочтительно - активность селективного агониста VPAC2, и наиболее предпочтительно - активность секреции инсулина, описанную здесь. Эти функциональные эквиваленты могут предпочтительно включать полипептиды, которые характеризуются, по крайней мере, приблизительно 90%-ной идентичностью с полипептидами

Фиг. 1, более предпочтительно - по крайней мере, 95%-ной идентичностью, и наиболее предпочтительно - по крайней мере, 97%-ной идентичностью с полипептидами Фиг. 1, и также могут включать части таких полипептидов, обладающие в основном ту же самую биологическую активность. В любом случае, любой полипептид, имеющий несущественную вариацию в аминокислотной последовательности по сравнению с полипептидами Фиг. 1, который демонстрирует функциональную эквивалентность как описано здесь и далее, включен в описание настоящего изобретения.

Как известно в данной области техники, "сходство" между двумя полипептидами определяют сравнением аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных замен одного полипептида с последовательностью второго полипептида. Такие консервативные подстановки включают замены, описанные выше, и в Dayhoff (*The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5, 1978), и в Argos (*EMBO J.* 8:779-785, 1989). Например, аминокислоты, принадлежащие к одной из следующих групп, представляют консервативные замены:

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;

- cys, ser, tyr, thr;

- val, ile, leu, met, ala, phe;

- lys, arg, his;

- phe, tyr, trp, his; and

- asp, glu.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим полипептиды этого изобретения, а также векторам, содержащим эти полинуклеотиды, клеткам-хозяевам, генетически модифицированным векторам изобретения и получению полипептидов изобретения рекомбинантными методами. Клетки-хозяева могут быть генетически модифицированы (трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы) векторами настоящего изобретения, которые могут быть, например, вектором клонирования или вектором экспрессии. Вектор может быть, например, в форме плазмиды, вирусной частицы, фага и т.д. Модифицированные клетки-хозяева можно культивировать в подходящей питательной среде, соответственно модифицированной для активации промоторов или отбора трансформантов. Условия куль-

вирования, такие как температура, pH и т.п., аналогичны условиям, используемым ранее для клеток хозяев, выбранных для экспрессии, и будут ясны специалисту в данной области техники. Полинуклеотид настоящего изобретения можно использовать для получения полипептида рекомбинантными методами. Таким образом, например, полинуклеотидную последовательность можно включить в любой из ряда носителей экспрессии, в частности, векторов или плазмид для экспрессии полипептидов. К таким векторам относятся хромосомные, нехромосомные и синтетические последовательности ДНК (например, производные SV40); бактериальные плазмиды; фаговая ДНК; дрожжевые плазмиды; векторы, полученные от комбинации ДНК фага и плазмид; ДНК вирусов типа вируса осповакцины, аденовируса, вируса оспы домашней птицы, и псевдобешенства (инфекционного бульбарного паралича). В любом случае, можно использовать любой другой вектор или плазмиду, если они могут реплицироваться и жизнеспособны в хозяине.

Соответствующую последовательность ДНК можно вставлять в вектор различными способами. В общем, последовательность ДНК вставляют по сайтам соответствующих рестрикционных эндонуклеаз в соответствии с методами, известными в данной области техники. Эти методы, а также другие находятся в компетенции специалиста в данной области техники. Последовательность ДНК в векторе экспрессии оперативно связана с соответствующей последовательностью(ями), контролирующей экспрессию (промотором), для направления синтеза мРНК. К представительным примерам таких промоторов относятся, без ограничения, LTR или промотор SV40, lac или trp E. coli, промотор PL фага лямбда, и другие известные промоторы, контролирующие экспрессию генов в прокариотических или эукариотических клетках или их вирусах. Вектор экспрессии может также содержать сайт связывания с рибосомой для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор может также содержать соответствующие последовательности для усиления экспрессии. Кроме того, предпочтительно, чтобы векторы экспрессии содержали ген, обеспечивающий фенотипическую особенность для отбора трансформированных клеток хозяев, такой как ген дигидрофолат редуктазы или устойчивости к неомицину для эукариотической клеточной культуры, или такой как ген устойчивости к тетрациклину или ампициллину в E. coli. Вектор, содержащий соответствующую последовательность ДНК, описанную выше, а также соответствующие промоторные или контрольные последователь-

ности, можно использовать для трансформации соответствующего хозяина, для того, чтобы хозяин экспрессировал белок. Представительными примерами подходящих хозяев являются, без ограничения, бактериальные клетки, такие как *E. coli*,
5 *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; клетки грибов, такие как дрожжи; клетки насекомых, такие как *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как CHO, COS или меланомы Боу (*Bowes melanoma*); аденовирусы; растительные клетки, и т.д.
10 Выбор соответствующего хозяина находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники и понятен из приведенных здесь сведений.

Настоящее изобретение также включает рекомбинантные конструкции, содержащие одну или более последовательностей, подробно описанных выше. Конструкции включают вектор, такой как плаزمид или вирусный вектор, в который вставлена последовательность по настоящему изобретению в прямой или обратной ориентации.
15 В предпочтительном аспекте этого варианта осуществления изобретения, конструкция далее включает регуляторные последовательности, например, промотор, оперативно связанные с последовательностью. Специалистам в данной области техники известно большое число коммерчески доступных соответствующих векторов и промоторов. В качестве примера приведены следующие векторы. Бактериальные: pQE70, pQE60, pQE-9, pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a,
20 pNH16a, pNH18a, pNH46a, pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, и PRIT5. Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG и PSVL. Однако, можно использовать любую другую плазмиду или вектор, которые реплицируются и жизнеспособны в хозяине. Промоторные области можно брать от любого гена при использовании векторов с CAT (хлорамфеникол трансфераза) или других векторов с селективными маркерами. Двумя подходящими векторами являются pKK232-8 и pCM7. Конкретные бактериальные промоторы включают *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, PR, PL и *trp* фага лямбда. Эукариотические промоторы включают непосредственно ранний CMV, тимидин киназы HSV, ранний и поздний SV40, LTR ретровирусов и металлотионеина-I мыши. Выбор подходящего вектора и промотора находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.
35
40
45

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим вышеописанную конструкцию. Клетка-хозяин может быть клеткой высших эукариот, та-
50

кой как клетка млекопитающего, или низших эукариот, такой как клетка дрожжей, или клетка-хозяин может быть прокариотической, например, бактериальной клеткой. Введение конструкции в клетку хозяина можно осуществить трансфекцией с фосфатом кальция, трансфекцией с DEAE-декстраном или электропорацией (Davis, et al., Basic Methods in Molecular Biology, 1986). Конструкции в клетках-хозяевах можно использовать традиционным способом для получения продукта гена, кодируемого рекомбинантной последовательностью. Альтернативно, полипептиды изобретения можно получить синтетически при помощи традиционных пептидных синтезаторов.

Зрелые белки могут экспрессироваться в клетках млекопитающих, дрожжах, бактериях, или других клетках под контролем соответствующих промоторов. Для получения этих белков также можно применять бесклеточные системы трансляции при использовании РНК, полученных с конструкций ДНК настоящего изобретения. Векторы, подходящие для клонирования и экспрессии для использования с прокариотическими и эукариотическими хозяевами описаны в руководстве Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Транскрипция ДНК, кодирующей полипептиды настоящего изобретения, в высших эукариотах усиливается при вставке в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно приблизительно от 10 до 300 пар оснований (п.о.), влияющие на промотор в сторону усиления транскрипции. Примерами являются энхансер SV40 на поздней стороне сайта начала репликации (100-270 п.о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомавируса на поздней стороне сайта начала репликации и энхансеры аденовирусов. В общем, рекомбинантные векторы экспрессии включают сайты начала репликации и селективные маркеры, разрешающие трансформацию клетки хозяина (например, ген устойчивости к ампициллину *E. coli* или ген TRP1 *S. cerevisiae*), и промотор, полученный из сильно экспрессирующегося гена, для направления транскрипции последующей структурной последовательности. Такие промоторы можно получить, среди прочих, из оперонов, кодирующих гликолитические ферменты, такие как 3-фосфоглицераткиназа (PGK), α фактор, кислотная фосфатаза, или белки

теплового шока. Гетерологичная структурная последовательность собирается в соответствующей фазе с последовательностями трансляции, инициации и терминации, и, предпочтительно, лидерной последовательностью способной направлять секрецию транслированного белка в периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Как вариант, гетерологичная последовательность может кодировать слитый белок, включая N-концевой идентификационный пептид, придающий желательные характеристики (например, стабилизацию или упрощенную очистку экспрессированного рекомбинантного продукта).

Векторы экспрессии, пригодные для применения в бактериях, можно сконструировать вставкой структурной последовательности ДНК, кодирующей требуемый белок, вместе с соответствующими сигналами трансляции, инициации и терминации в операбельной фазе с функциональным промотором. Вектор может содержать один или более фенотипических селективных маркеров и сайт начала репликации для обеспечения поддержания вектора, и, при желании, для обеспечения амплификации в хозяине. К прокариотическим хозяевам, подходящим для трансформации, относятся, например, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, и различные виды в пределах родов *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*, хотя по выбору можно использовать и другие. Векторы экспрессии, пригодные для применения в бактериях, могут содержать селективный маркер и бактериальный сайт начала репликации, полученный из коммерчески доступных плазмид, включающих генетические элементы известного вектора клонирования pBR322 (ATCC 37017). К таким коммерческим векторам относятся, например, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega, Madison, Wis., USA). Эти участки «остова» pBR322 можно комбинировать с соответствующим промотором и структурной последовательностью, которая должна быть экспрессирована.

После трансформации подходящего штамма хозяина и выращивания его до соответствующей плотности клеток, активность выбранного промотора подавляют соответствующим способом (например, температурным сдвигом или химической индукцией) и клетки культивируют в течение дополнительного времени. Клетки обычно собирают центрифугированием, разрушают физическим или химическим способом, и полученный неочищенный экстракт сохраняют для дальнейшей очистки. Микроб-

ные клетки, используемые для экспрессии белков, можно разрушать любым традиционным методом, включая циклическое замораживание-оттаивание, разрушение ультразвуком, механическое разрушение или использование агентов, лизирующих клетки.

Для экспрессии рекомбинантного белка можно также использовать различные системы клеток млекопитающих. Примерами систем экспрессии млекопитающих являются линии COS-7 фибробластов почки обезьян, описанные Gluzman (Cell 23:175, 1981), и другие клеточные линии, способные экспрессировать совместимый вектор, например, линии C127, 3T3, CHO, HeLa и ВНК. Векторы экспрессии млекопитающих могут включать сайт начала репликации, соответствующий промотор и энхансер, а также любые необходимые последовательности сайта связывания с рибосомой, сайта полиаденилирования, сайтов доноров и акцепторов сплайсинга, терминации транскрипции и 5' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности. В качестве необходимых нетранскрибируемых генетических элементов можно использовать последовательности ДНК, полученные из генома вируса SV40, например, сайт начала репликации, ранний промотор, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования вируса SV40.

Полипептиды настоящего изобретения можно выделить и очистить из рекомбинантных клеточных культур методами, используемыми до настоящего времени, включая осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анион- или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, афинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите, и хроматографию на лектине. При необходимости можно применять этапы повторного сворачивания белка для формирования конфигурации зрелого белка. Наконец, на этапе окончательной очистки можно применять высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Полипептиды этого изобретения могут быть продуктом химических синтетических методов, или могут быть получены рекомбинантными методами из прокариотического или эукариотического хозяина (например, клеток бактерий, дрожжей, высшего растения, насекомого и млекопитающих). В зависимости от хозяина, используемого

в методе рекомбинантного получения, полипептиды настоящего изобретения могут быть гликозилированы углеводами млекопитающих или других эукариот, или могут быть негликозилированными. Полипептиды этого изобретения могут также вклю-
5 чить начальный остаток метионина. Выделенный или очищенный полипептид настоящего изобретения, или его биологически активная часть по существу не содержит другой клеточный материал или культуральную среду, если получен рекомби-
10 нантными методами, или не содержит химические предшественники или другие химические вещества, если синтезирован химически. Предпочтительно, выделенный полипептид по настоящему изобретению по существу не содержит клеточный мате-
15 риал и содержит менее 30 % (сухого веса) неполипептидного, или контаминирующе-го, материала. Если полипептид настоящего изобретения или его биологически активная часть получены рекомбинантно, то предпочтительно, чтобы культуральная среда составляла менее 30 % объема препарата полипептида. Если изобретение осу-
20 ществлено химическим синтезом, то предпочтительно, чтобы препараты содержали менее 30 % сухого веса химических предшественников или химических веществ, не относящихся к изобретению.

Полипептиды этого изобретения удобно выделять как описано ниже в специфиче-ских примерах. Чистота препарата очищенного полипептида составляет, по крайней
30 мере, приблизительно 70%; предпочтительно - приблизительно от 85% до 99%. Чистоту препаратов можно оценить любым способом, известным в данной области тех-ники, таких как электрофорез в SDS-полиакриламидном геле и масс-
35 спектрометрия/жидкостная хроматография.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды настоящего изобретения, можно синтезировать, полностью или частично, используя химические
40 методы, известные в данной области техники (см., например, Caruthers, et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Horn, et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980). Полинуклеотид, кодирующий полипептид, можно затем клонировать в вектор
45 экспрессии, чтобы экспрессировать полипептид.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что может быть выгодно по-
50 лучить кодирующие полипептид нуклеотидные последовательности, содержащие

кодоны, не встречающиеся в природе. Например, для повышения степени экспрессии полипептида или для получения РНК-транскрипта с требуемыми свойствами, такими как время полураспада, большее, чем у транскрипта, полученного с природной последовательности, можно использовать кодоны, предпочитаемые конкретным прокариотическим или эукариотическим хозяином.

Описанные здесь нуклеотидные последовательности могут быть сконструированы при помощи общеизвестных в данной области техники методов для изменения последовательностей, кодирующих полипептид, с различными целями, включая, без ограничения, изменения, которые модифицируют закрытие, процессинг и/или экспрессию полипептидного продукта или продукта мРНК. Для конструирования нуклеотидных последовательностей можно использовать «перетасовку» ДНК случайной фрагментацией и повторную сборку фрагментов гена и синтетических олигонуклеотидов методом ПЦР. Например, для вставки новых сайтов рестрикции, изменения способа гликозилирования, изменения предпочтения кодонов, получения сплайс-вариантов, получения мутаций и т.д. можно использовать сайт-направленный мутагенез.

Также рассматриваются взаимосвязанные соединения, понятные специалисту в данной области техники, такие как химические миметики, органоиметики или пептидомиметики. В настоящем документе термины "миметик", "пептидный миметик", "пептидомиметик", "органоиметик" и "химический миметик" охватывают производные пептида, аналоги пептида и химические соединения, имеющие расположение атомов в трехмерной ориентации, эквивалентное расположению атомов пептида настоящего изобретения. Следует понимать, что в настоящем документе термин "эквивалентный" предназначен, чтобы охватить соединения, имеющие замену(ы) некоторых атомов или химических фрагментов в указанном пептиде, причем длины связей, углы связей и расположение в миметическом соединении создают такое же или достаточно подобное расположение или ориентацию указанных атомов и фрагментов, чтобы обладать биологической функцией пептидов изобретения. В пептидных миметиках изобретения трехмерное расположение химических компонентов структурно и/или функционально эквивалентно трехмерному расположению остова пептида и аминокислотных боковых цепей в пептиде, что приводит к тому, что такие пептидо-,

органо- и химические миметики пептидов изобретения обладают достаточной биологической активностью. Эти термины используются согласно пониманию в данной области техники, как указано, например, в Fauchere, (Adv. Drug Res. 15:29, 1986);
5 Veber & Freidinger, (TINS p.392, 1985); и Evans, et al., (J. Med. Chem. 30:1229, 1987), включенных в настоящий документ посредством ссылки.

10 Понимается, что для биологической активности каждого пептида изобретения существует фармакофор. В данной области техники под фармакофором понимают идеализированное, трехмерное определение требований к структуре, необходимых для
15 биологической активности. При помощи современного программного обеспечения для компьютерного моделирования (компьютерная разработка лекарств) пептидо-, органо-, и химические миметики можно разрабатывать так, чтобы соответствовать
каждому фармакофору. Указанные миметики могут быть получены в результате
20 анализа "структура-функция", основанного на позиционной информации о замещающих атомах в пептидах изобретения.

25 Как предусмотрено изобретением, пептиды удобно синтезировать любым из методов химического синтеза, известных в данной области техники, в частности методами синтеза в твердой фазе, например, используя коммерчески доступные автоматизированные пептидные синтезаторы. Миметики настоящего изобретения могут быть синтезированы методами синтеза в твердой фазе или в растворе, традиционно используемыми для синтеза пептидов (см., например, Merrifield, J. Amer. Chem. Soc.
30 85:2149-54, 1963; Carpino, Acc. Chem. Res. 6:191-98, 1973; Birr, Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis, Springer-Verlag: Heidelberg, 1978; The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vols. 1, 2, 3, and 5, (Gross & Meinhofer, eds.), Academic Press: New York, 1979; Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.:
35 Rockford, Ill., 1984; Kent, Ann. Rev. Biochem. 57:957-89, 1988; и Gregg, et al., Int. J. Peptide Protein Res. 55:161-214, 1990), которые включены в настоящий документ в своей полноте посредством ссылки.

45 Предпочтительным является использование твердофазной методологии. Кратко, N-защищенный C-концевой аминокислотный остаток связывают с нерастворимой подложкой, такой как полистирол, поперечно сшитый дивинилбензолом, полиакрила-
50

мидная смола, кизельгур/полиамид (пепсин К), стекло с известным размером пор, целлюлоза, полипропиленовые мембраны, полиэтиленовые стержни, покрытые акриловой кислотой, или подобные. Для связывания аминокислот, начиная с С-конца, в соответствии с аминокислотной последовательностью применяют циклы снятия защиты, нейтрализации, и присоединения очередного защищенного производного аминокислоты. Для некоторых синтетических пептидов можно применять стратегию FMOC, используя чувствительную к кислоте смолу. В этом случае предпочтительными твердыми подложками являются полистирольные смолы, поперечно сшитые дивинилбензолом, коммерчески доступные в различных функционализированных формах, включая хлорометиловую смолу, гидроксиметиловую смолу, параацетамидометиловую смолу, бензгидриламиновую (ВНА) смолу, 4-метилбензгидриламиновую (МВНА) смолу, оксимные смолы, смолу 4-алкоксибензилового спирта (смола Wang), 4-(2',4'-диметоксифениламинометил)-феноксиметиловую смолу, 2,4-диметоксибензгидрил-аминовую смолу и смолу 4-(2',4'-диметоксифенил-FMOC-аминометил)-феноксиацетамидонорлейцил-МВНА (амидную смолу МВНА Ринка). Кроме того, при необходимости чувствительные к кислоте смолы также обеспечивают С-концевые кислоты. Особенно предпочтительной защитной группой для альфа-аминокислот является 9-фторфенилметоксикарбонильная (FMOC), лабильная в основании.

Походящие защитные группы для функциональных групп боковой цепи аминокислот, химически совместимые с группами ВОС (т-бутоксикарбонил) и FMOC, хорошо известны в данной области техники. При использовании химии FMOC предпочтительными являются следующие защищенные производные аминокислот: FMOC-Cys(Trit), FMOC-Ser(But), FMOC-Asn(Trit), FMOC-Leu, FMOC-Thr(Trit), FMOC-Val, FMOC-Gly, FMOC-Lys(Boc), FMOC-Gln(Trit), FMOC-Glu(OBut), FMOC-His(Trit), FMOC-Tyr(But), FMOC-Arg(PMC (2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил)), FMOC-Arg(BOC)₂, FMOC-Pro и FMOC-Trp(BOC). Аминокислотные остатки могут быть соединены при использовании различных агентов присоединения и способов, известных в данной области техники, таких как прямое присоединение с DIC (диизопропил-карбодиимид), DCC (дициклогексилкарбодиимид), ВОР (гексафторофосфат бензотриазолил-N-окситрисдиметиламинофосфония), Р_уВОР (гексафторофосфат бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидинофосфония), Р_уBrOP (гексафторофос-

фат бром-трис-пирролидинофосфония); посредством симметричных ангидридов; посредством активных сложных эфиров, таких как пентафторфениловые сложные эфиры; или посредством сложных эфиров HOBt (1-гидроксibenзотриазол) или при использовании FMOC-фторида и хлоридов аминокислоты или FMOC-N-карбокси ангидридоаминокислоты. Предпочтительной является активация HBTU (гексафторфосфатом 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония) или HATU (гексафторфосфатом 2-(1H-7-аза-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония) в присутствии HOBt или HOAt (7-азагидроксibenзотриазола).

Твердофазный метод может быть осуществлен вручную, хотя предпочтительным является автоматизированный синтез на коммерчески доступном пептидном синтезаторе (например, Applied Biosystems 431A или подобном; Applied Biosystems, Foster City, CA). При типичном синтезе первую (C-концевую) аминокислоту прикрепляют к хлортритиловой смоле. Для получения последовательности пептида можно применять последовательно циклы снятия защиты (20% пиперидин/NMP (N-метилпирролидон)) и присоединения согласно протоколам ABI FastMoc (Applied Biosystems). Также можно применять двойное или тройное присоединение с кэппированием уксусным ангидридом.

Синтетический миметический пептид можно отщепить от смолы и снять защиту обработкой ТФУ (трифторуксусной кислотой), содержащей соответствующие поглотители. Можно использовать множество реактивов отщепления, таких как Реагент К (0,75 г кристаллический фенол, 0,25 мл этандитиол, 0,5 мл тиоанизол, 0,5 мл деионизованная вода, 10 мл ТФУ) и другие. Пептид отделяют от смолы фильтрованием и выделяют осаждением эфиром. Дальнейшую очистку можно осуществлять традиционными методами, такими как гель-фильтрация и обращенно-фазовая ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография). Синтетические миметики согласно настоящему изобретению могут быть в форме фармацевтически приемлемых солей, особенно основных солей присоединения, включая соли органических и неорганических оснований. Основные соли присоединения кислых аминокислотных остатков получают обработкой пептида соответствующим основанием или неорганическим основанием, согласно методам, известным специалистам в данной области техники,

или требуемую соль можно получить прямо лиофилизацией соответствующего ос-
нования.

В общем, специалисту в данной области техники будет понятно, что описанные
здесь пептиды могут быть модифицированы рядом химических методов для получе-
ния пептидов, обладающих по существу той же активностью, что и немодифициро-
ванный пептид, и возможно имеющих другие требуемые свойства. Например, кар-
боксильные кислые группы пептида могут быть в форме соли фармацевтически при-
емлемого катиона. Аминогруппы в пептиде могут быть в форме фармацевтически
приемлемой кислой соли присоединения, такой как соль HCl, HBr, уксусной, бен-
зойной, толуолсульфоновой, малеиновой, винной и других органических кислот, или
могут быть преобразованы в амид. Тиолы могут быть защищены любой из множест-
ва известных защитных групп, таких как ацетамидные группы. Специалисту в дан-
ной области техники также будут ясны методы введения циклических структур в
пептиды настоящего изобретения так, чтобы наиболее приблизиться к нативной
конфигурации связывания. Например, к пептиду можно добавить карбокси- или
амино-концевой остаток цистеина, так, чтобы при окислении пептид содержал ди-
сульфидную связь, таким образом создавая циклический пептид. Другой метод цик-
лизации пептида включает образование тиоэфиров и карбокси - и аминоконцевых
амидов и сложных эфиров.

Конкретно, для получения производных и аналогов пептида с той же или подобной
требуемой биологической активностью, что и соответствующий пептид, но с более
благоприятной активностью по сравнению с пептидом относительно растворимости,
стабильности и восприимчивости к гидролизу и протеолизу, доступны несколько
методов. Такие производные и аналоги включают пептиды, модифицированные по
N-концевой аминогруппе, C-концевой карбоксильной группе и/или замену одной
или более амидных связей в пептиде на неамидные. Следует понимать, что в одной
пептидной миметической структуре могут быть две и более таких модификаций
(например, модификация в C-концевой карбоксильной группе и включение -CH₂-
карбаматной связи между двумя аминокислотами в пептиде).

Модификации amino-конца включают алкилирование, ацетилирование, присоединение карбобензоильной группы и образование сукцинимидной группы. Конкретно, N-концевая аминогруппа может вступать в реакцию с образованием амидной группы формулы $RC(O)NH-$, где R означает алкил, предпочтительно низший алкил, и присоединяется реакцией с галоидангидридом, $RC(O)Cl$ или ангидрид кислоты. Как правило, реакцию можно проводить добавлением приблизительно эквимоларных или избыточных количеств (например, около 5 экв.) галоидангидрида к пептиду в инертном растворителе (например, дихлорметане) предпочтительно содержащем избыток (например, около 10 экв.) третичного амина, такого как диизопропилэтиламин, для удаления кислоты, получающейся в ходе реакции. В остальных условиях реакции традиционны (например, комнатная температура, в течение 30 минут). Алкилированием конечной amino-группы для замещения N низшим алкилом и последующей реакцией с галоидангидридом, как описано выше, получают N-алкиламидную группу формулы $RC(O)NR-$. Иначе, amino-конец может быть ковалентно связан с сукцинимидной группой по реакции с янтарным ангидридом. Используют приблизительно эквимоларное или избыточное количество янтарного ангидрида (например, около 5 экв.), и концевую аминогруппу преобразуют в сукцинимид методами, известными в данной области техники, включая использование избытка (например, 10 экв.) третичного амина типа диизопропилэтиламина в соответствующем инертном растворителе (например, дихлорметане), как описано в патенте Wollenberg, et al., (Патент США № 4,612,132), включенном в настоящий документ в своей полноте посредством ссылки. Также следует понимать, что янтарная группа может иметь заместители, C_2-C_6 -алкил или -SR заместители, которые получают традиционными методами для получения замещенного сукцинимиды на N-конце пептида. Такие алкильные заместители могут быть получены реакцией низшего олефина (C_2-C_6 -алкила) с малеиновым ангидридом способом, описанным Wollenberg, et al., см. выше, а -SR заместители могут быть получены реакцией RSH с малеиновым ангидридом, где R соответствует определению выше. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения amino-конец может быть дериватизирован с образованием бензилоксикарбонил- $NH-$ или замещенной бензилоксикарбонил- $NH-$ группы. Это производное может быть получено реакцией с приблизительно эквивалентным количеством или избытком бензилоксикарбонил хлорида ($CBZ-Cl$), или замещенного $CBZ-Cl$ в соответствующем инертном растворителе (например, дихлор-

метане), предпочтительно содержащем третичный амин для нейтрализации кислоты, образующейся в ходе реакции. В еще одном производном в N-конец включают сульфаниламидную группу реакцией с эквивалентным количеством или избытком (например, 5 экв.) $R-S(O)_2Cl$ в соответствующем инертном растворителе (дихлорметане) для превращения конечного амина в сульфаниламид, где R означает алкил и предпочтительно - низший алкил. Предпочтительно инертный разбавитель содержит избыток третичного амина (например, 10 экв.) типа диизопропилэтиламина для удаления кислоты, образующейся в ходе реакции. В остальном условия реакции традиционны (например, комнатная температура, в течение 30 минут). Карбаматные группы можно получить на амино-конце реакцией с эквивалентным количеством или избытком (например, 5 экв.) $R-OC(O)Cl$ или $R-OC(O)OC_6H_4-p-NO_2$ в соответствующем инертном растворителе (например, дихлорметане) для превращения конечного амина в карбамат, где R - алкил, предпочтительно - низший алкил. Предпочтительно инертный разбавитель содержит избыток третичного амина (например, 10 экв.) типа диизопропилэтиламина для нейтрализации кислоты, образующейся в ходе реакции. В остальном условия реакции традиционны (например, комнатная температура, в течение 30 минут). На амино-конце могут быть образованы карбамидные группы реакцией с эквивалентным количеством или избытком (например, 5 экв.) $R-N=C=O$ в соответствующем инертном растворителе (например, дихлорметане) для превращения конечного амина в карбамидную группу (то есть $RNHC(O)NH-$), где R соответствует определениям выше. Предпочтительно инертный разбавитель содержит избыток третичного амина (например, 10 экв.) типа диизопропилэтиламина. В остальном условия реакции традиционны (например, комнатная температура, в течение 30 минут).

При получении пептидных миметиков, в которых C-концевая карбоксильная группа может быть заменена сложным эфиром (например, $-C(O)OR$, где R означает алкил и предпочтительно - низший алкил), можно использовать смолы, используемые для получения кислот пептида, а защищенный по боковой цепи пептид может быть отщеплен основанием и соответствующим спиртом (например, метанолом). Защитные группы боковой цепи можно удалить обычным способом обработкой фтороводородом, чтобы получить требуемый сложный эфир. При получении пептидных миметиков, в которых C-концевая карбоксильная группа заменена амидом $-C(O)NR^3R^4$, в

качестве твердой подложки для пептидного синтеза используется бензгидриламиновая смола. После завершения синтеза в результате обработки фтороводородом для освобождения пептида от подложки получают непосредственно к свободному пептидному амиду (то есть, С-конец представляет собой $-C(O)NH_2$). Иначе, использование хлорометилированной смолы при синтезе пептида вместе с реакцией с аммиаком для отщепления от подложки пептида с защищенной боковой цепью приводит к свободному пептидному амиду, а реакция с алкиламином или диалкиламином приводит к алкиламиду или диалкиламиду с защищенной боковой цепью (то есть, С-конец представляет собой $-C(O)NRR^1$, где R и R^1 представляют собой алкил и предпочтительно - низший алкил). Затем защиту боковой цепи удаляют обычным способом обработкой фтороводородом, получают свободные амиды, алкиламиды или диалкиламиды.

В другом альтернативном варианте осуществления изобретения может быть индуцирована циклизация С-концевой карбоксильной группы или С-концевой эфирной группы заменой $-OH$ или эфирного фрагмента ($-OR$) карбоксильной группы или сложного эфира, соответственно, на N-концевую аминогруппу с образованием циклического пептида. Например, после синтеза и отщепления с образованием свободной пептидной кислоты свободную кислоту превращают в растворе в активированный сложный эфир соответствующим активатором карбоксильной группы, таким как дициклогексилкарбодиимид (DCC), например, в хлористом метиле (CH_2Cl_2), диметилформамиде (ДМФ) или их смеси. Затем образуется циклический пептид заменой активированного эфира N-концевым амином. Циклизация, в большей степени чем полимеризация, может быть усилена при использовании очень разбавленных растворов согласно методам, известным в данной области техники.

Миметики пептида, как принято в данной области техники и подразумевается изобретением, структурно подобны пептиду изобретения, но имеют одну или более пептидных связей, возможно замененных связью, выбираемой из группы, включающей: $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-C=CH-$ (как в цис, так и в транс конформерах), $-COCH_2-$, $-CH(O)CH_2-$, и $-CH_2SO-$, методами, известными в данной области техники и описанными далее в следующих источниках: Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, (Weinstein, ed.), Marcel Dekker: New York, p. 267,

1983; Spatola, Peptide Backbone Modifications 1:3, 1983; Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 463-468, 1980; Hudson, et al., Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185, 1979; Spatola, et al., Life Sci. 38:1243-1249, 1986; Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314, 1982; Almquist, et al., J. Med. Chem. 23:1392-1398, 1980; Jennings-White, et al., Tetrahedron Lett. 23:2533, 1982; Szelke, et al., EP045665A; Holladay, et al., Tetrahedron Lett. 24:4401-4404, 1983; и Hruby, Life Sci. 31:189-199, 1982; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Такие пептидные миметики могут иметь значительные преимущества перед полипептидами, описанными в вариантах осуществления изобретения, включая, например, большую экономичность получения, большую химическую стабильность или усиленные фармакологические свойства (таких как период полураспада, адсорбция, мощность, эффективность, и т.д.), сниженная антигенность, и другие свойства.

Миметические аналоги пептидов изобретения также можно получить, используя принципы традиционного или рационального дизайна лекарственных средств (см., например, Andrews, et al., Proc. Alfred Benzon Symp. 28:145-165, 1990; McPherson, Eur. J. Biochem. 189:1-24, 1990; Hol, et al., in Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems, (Roberts, ed.); Royal Society of Chemistry; pp. 84-93, 1989a; Hol, Arzneim-Forsch. 39:1016-1018, 1989b; Hol, Agnew Chem. Int. Ed. Engl. 25:767-778, 1986; включенные в настоящий документ посредством ссылки).

В соответствии с методами традиционного конструирования лекарственных средств, желательные миметические молекулы можно получить случайным перебором молекул, структуры которых имеют общие свойства со структурой "нативного" пептида. Количественный вклад, который следует из изменения определенной группы связывающей молекулы, можно определить, измеряя биологическую активность предполагаемого миметика по сравнению с активностью пептида. В предпочтительном варианте осуществления рационального дизайна лекарственных средств миметик разрабатывают таким образом, чтобы он сохранял свойство наиболее стабильной трехмерной конформации пептида. Таким образом, например, может быть разработан миметик, содержащий химические группы в ориентации, достаточной, чтобы вызывать ионные, гидрофобные, или Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, сходные с взаимодействиями в пептидах изобретения, описанных здесь.

В предпочтительном методе осуществления рационального конструирования миметиков используется вычислительная система, способная осуществлять представление трехмерной структуры пептида, например, представленная в Hol, 1989a; Hol, 1989b; и Hol, 1986. Молекулярные структуры пептидо-, органо- и химических миметиков пептидов изобретения можно получить, используя коммерчески доступные программы компьютерного дизайна. Примеры таких программ включают sybyl 6.5®, hqsar™ и alchemy 2000™ (Tripos); galaxy™ и am2000™ (AM Technologies, Inc., San Antonio, TX); catalyst™ и cerius™ (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA); cache products™, tsar™, amber™ и chem-x™ (Oxford Molecular Products, Oxford, CA) и chembuilder3d™ (Interactive Simulations, Inc., San Diego, CA).

Пептидо-, органо- и химические, полученные при использовании описанных здесь пептидов при помощи, например, программ молекулярного моделирования, известных в данной области техники, можно получить, используя традиционные химические синтетические методы, наиболее подходящие для широкомасштабного скрининга, включая методы комбинаторной химии. Комбинаторные методы, применимые для получения пептидо-, органо- и химических миметиков изобретения, включают наборы для фагового дисплея, твердофазного синтеза и комбинаторной химии, поставляемые, например, SIDDCO (Tuscon, Arizona); Tripos, Inc.; Calbiochem/Novabiochem (San Diego, CA); Symyx Technologies, Inc. (Santa Clara, CA); Medichem Research, Inc. (Lemont, IL); Pharm-Eco Laboratories, Inc. (Bethlehem, PA); или N.V. Organon (Oss, Netherlands). Получение пептидо-, органо- и химических миметиков изобретения методами комбинаторной химии можно осуществлять согласно способам, известным в данной области техники, включая, без ограничения, методы, описанные в Terrett, (Combinatorial Chemistry, Oxford University Press, London, 1998); Gallop, et al., J. Med. Chem. 37:1233-51, 1994; Gordon, et al., J. Med. Chem. 37:1385-1401, 1994; Look, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 6:707-12, 1996; Ruhland, et al., J. Amer. Chem. Soc. 118: 253-4, 1996; Gordon, et al., Acc. Chem. Res. 29:144-54, 1996; Thompson & Ellman, Chem. Rev. 96:555-600, 1996; Fruchtel & Jung, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35:17-42, 1996; Pavia, "The Chemical Generation of Molecular Diversity", Network Science Center, www.netsci.org, 1995; Adnan, et al., "Solid Support Combinatorial Chemistry in Lead Discovery and SAR Optimization," Id., 1995; Davies

and Briant, "Combinatorial Chemistry Library Design using Pharmacophore Diversity," Id., 1995; Pavia, "Chemically Generated Screening Libraries: Present and Future," Id., 1996; и U.S. Patents, Nos. 5,880,972; 5,463,564; 5,331,573; and 5,573,905.

Вновь синтезированные полипептиды можно очистить препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (см., например, Creighton, *Proteins: Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). Состав синтетического полипептида настоящего изобретения может быть подтвержден аминокислотным анализом или секвенированием, например, способом деградации Эдмана (Edman) (Creighton, выше). Дополнительно, любая часть аминокислотной последовательности полипептида может быть изменена в процессе непосредственного синтеза и/или соединена химическими методами с последовательностями других белков, для получения варианта полипептида или слитого полипептида.

Полипептид изобретения также может применяться в соответствии с настоящим изобретением посредством экспрессии такого полипептида *in vivo*, что часто называют "генной терапией". Так, например, клетки могут быть модифицированы полинуклеотидом (ДНК или РНК), кодирующим полипептид, *ex vivo*, модифицированные клетки затем могут быть введены пациенту, подлежащему лечению полипептидом. Такие методы хорошо известны в данной области техники. Например, клетки могут быть модифицированы способами, известными в данной области техники, при помощи ретровирусной частицы, содержащей РНК, кодирующую полипептид настоящего изобретения.

Местная доставка стимуляторов секреции инсулина при использовании генной терапии может обеспечить наличие терапевтического агента в целевой области (например, поджелудочной железе). Например, для создания мышинной модели β -клеточной опухоли поджелудочной железы использовали промотор, специфический для поджелудочной железы (Hanahan, *Nature* 315(6015):115-22, 1985).

Рассматриваются как "*in vitro*", так и "*in vivo*" методологии генной терапии. Известны несколько способов для доставки потенциальных терапевтических генов в опре-

деленные клеточные популяции (см., например, Mulligan, Science 260:926-31, 1993).

Эти способы включают, например:

5 1) Прямую доставку гена (см., например, Wolff, et al., Science 247:1465-68, 1990);

2) Доставку ДНК посредством липосом (см., например, Caplen, et al., Nature Med. 3:39-46, 1995; Crystal, Nature Med. 1:15-17, 1995; Gao and Huang, Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:280-85 1991);

3) Доставку ДНК посредством ретровируса (см., например, Kay, et al., Science 262:117-19, 1993; Anderson, Science 256:808-13, 1992).

15 4) Доставку ДНК посредством ДНК-содержащего вируса. Такие ДНК-содержащие вирусы включают, например, аденовирусы (предпочтительно векторы на основе Ad2 и Ad5), вирусы герпеса (предпочтительно векторы на основе вируса простого герпеса), и парвовирусы (предпочтительно векторы на основе "дефектных" или неавтономных парвовирусов, более предпочтительно - векторы на основе аденоассоциированного вируса, наиболее предпочтительно - векторы на основе AAV-2) (см., например, Ali, et al., Gene Therapy 1:367-84, 1994; патент США № 4,797,368; патент США 5,139,941; включенные в настоящий документ посредством ссылки).

30 Выбор специфической векторной системы для доставки требуемого гена зависит от ряда факторов. Одним из важных факторов является природа популяции клеток - мишеней. Хотя ретровирусные векторы широко изучались и использовались в различных применениях генной терапии, эти векторы в общем не подходят для инфицирования неделящихся клеток. Кроме того, ретровирусы обладают потенциальной онкогенностью. Однако, последние исследования в области лентивирусных векторов могут позволить обойти некоторые из этих ограничений (см., например, Naldini, et al., Science 272:263-67, 1996).

40 К ретровирусам, из которых можно получить ретровирусные плазмидные векторы, включают, без ограничения, вирус лейкоза мышей Молони, вирус некроза селезенки, ретровирусы, такие как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус лейкоза птиц, вирус лейкоза обезьян гиббонов, вирус иммунодефицита человека, аденовирус, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы.

Аденовирусы имеют то преимущество, что у них широкий круг хозяев, они могут инфицировать покоящиеся или окончательно дифференцированные клетки, такие как нейроны или гепатоциты и они, по-видимому, по существу неонкогенны (см., например, Ali, et al., 1994). Аденовирусы не интегрируют в геном хозяина. Поскольку они существуют экстрахромосомно, риск инсерционного мутагенеза значительно снижен. Ali, et al., 1994.

Адено-ассоциированные вирусы обладают преимуществами, сходными с преимуществами векторов на основе аденовирусов. Однако, для AAV характерна сайт-специфическая интеграция в 19 хромосому человека (см., например, Ali, et al., 1994).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения ДНК, кодирующая полипептидные стимуляторы секреции инсулина настоящего изобретения, используется в генной терапии таких заболеваний, как диабет и связанные с диабетом заболевания.

Согласно этому варианту осуществления изобретения, генную терапию ДНК, кодирующей полипептидные стимуляторы секреции инсулина или мутантные белки настоящего изобретения, проводят пациенту совместно с или сразу после установления диагноза.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что согласно этому варианту осуществления изобретения можно использовать любой подходящий для генной терапии вектор, содержащий полипептидные стимуляторы секреции инсулина, ДНК или фрагменты ДНК, производные или варианты полипептидных стимуляторов секреции инсулина. Методы конструирования таких векторов известны в данной области техники (см., например, Anderson, Nature 392:25-30, 1998; Verma, et al., Nature 389:239-242, 1998). Введение вектора, содержащего ДНК полипептидных стимуляторов секреции инсулина, к месту назначения можно осуществить, используя известные методы.

Вектор может содержать один или более промоторов. Соответствующие промоторы включают, без ограничения, ретровирусный LTR, промотор SV40; и промотор цитомегаловируса человека (CMV) (Miller, et al., Biotechniques 7(9):980-990, 1989), или

любой другой промотор (например, клеточные промоторы, такие как промоторы эукариотических клеток, включая, без ограничения, промоторы гистона, ρ 1 III и β -актина). Другие вирусные промоторы, которые можно использовать, включают, без

5 ограничения, аденовирусные промоторы, промоторы тимидинкиназы (ТК) и В19 парвовирусные промоторы. Выбор подходящего промотора находится в компетенции специалиста в данной области техники с учетом приведенных здесь сведений.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид настоящего изобретения, находится под контролем соответствующего промотора. Соответст-

15 вующие промоторы, которые можно использовать, включают, без ограничения, аденовирусные промоторы, такие как аденовирусный главный поздний промотор; или герпетологичные промоторы, такие как промотор цитомегаловируса (CMV); промотор респираторного синцитиального вируса (RSV); индуцибельные промоторы, такие

20 как промотор MMT (металлотионеина); промоторы теплового шока; альбуминовый промотор; промотор AroAI; промоторы глобина человека; вирусные тимидинкиназные промоторы, такие как промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ретровирусные LTR (включая модифицированные ретровирусные LTR, описанные вы-

25 ше); промотор β -актина и промоторы гормона роста человека. Промотор также может быть нативным промотором, контролирующим ген, кодирующий полипептид.

Для трансформации клеточных линий, способных к упаковке, можно использовать ретровирусный плазмидный вектор с целью получения продуцирующих клеточных

35 линий. Примерами клеток, способных к упаковке, которые можно трансфицировать, являются, без ограничения, линии PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 и DAN, описанные в работе Miller (Hum. Gene Ther. 1:5-14, 1990), включенной в настоящий документ в своей полноте

40 посредством ссылки. Вектор может преобразовывать клетки, способные к упаковке, любым способом, известным в данной области техники. Такие способы включают, без ограничения, электропорацию, использование липосом и преципитацию с CaPO_4 .

45 В одном из вариантов ретровирусный плазмидный вектор может быть заключен в липосому или присоединен к липиду, а затем введен хозяину. Продуцирующая клеточная линия производит инфекционные ретровирусные векторные частицы, содержащие последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептиды.

50

Такие ретровирусные векторные частицы затем можно использовать для преобразования эукариотических клеток, или "*in vitro*" или "*in vivo*". Преобразованные эукариотические клетки будут экспрессировать последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид. Эукариотические клетки, которые могут быть преобразованы, включают, без ограничения, эмбриональные стволовые клетки, эмбриональные раковые клетки, а также гемопоэтические стволовые клетки, гепатоциты, фибробласты, миобласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки и бронхиальные эпителиальные клетки.

Другим подходом к генной терапии является "транскариотическая терапия", при которой клетки пациента обрабатывают *ex vivo*, чтобы индуцировать "спящие" хромосомные гены для продуцирования требуемого белка после обратного введения пациенту. Транскариотическая терапия предполагает, что пациент имеет нормальный набор генов, необходимых для активации. Транскариотическая терапия включает введение *ex vivo* в хромосомную ДНК клеток пациента промотора или другой экзогенной регуляторной последовательности, способной активировать образующиеся гены, культивирование и отбор клеток, продуцирующих активный белок, и затем обратное введение активированных клеток пациенту с тем, чтобы они у него полностью прижились. "Генно активированные" клетки затем продуцируют требуемый белок в течение некоторого значительного времени, возможно в течение жизни пациента (см., например, патенты США 5,641,670 и 5,733,761, включенные в настоящий документ в своей полноте посредством ссылки).

Также в настоящее изобретение включены антитела и фрагменты антител, селективно связывающие полипептиды настоящего изобретения. Методами, известными в данной области техники, может быть создано антитело любого типа, известного в данной области техники. Например, антитело может быть создано для специфического связывания с эпитопом полипептида настоящего изобретения. Используемый в настоящем документе термин "антитело" включает интактные молекулы иммуноглобулина, а также их фрагменты, такие как Fab, F(ab')₂ и Fv, способные связывать эпитоп полипептида настоящего изобретения. Как правило, для образования эпитопа требуется, по крайней мере, 6, 8, 10 или 12 смежных аминокислот. Однако, эпи-

топы, содержащие несмежные аминокислоты, могут требовать большего количества аминокислот, например, по крайней мере, 15, 25 или 50 аминокислот.

Антитело, которое специфически связывается с эпитопом полипептида настоящего изобретения, может использоваться терапевтически, а также в иммунохимических анализах, таких как Вестерн-блоттинг, ELISA, радиоиммуноанализ, иммуногисто-химический анализ, иммунопреципитация или другие иммунохимические анализы, известные в данной области техники. Для идентификации антител, обладающих требуемой специфичностью, можно использовать различные иммунологические анализы. В данной области техники известны многочисленные протоколы конкурентного связывания или иммунорадиометрического анализа. Такие иммунологические анализы обычно включают измерение комплексообразования между иммуногеном и антителом, специфически связывающимся с иммуногеном.

Как правило, в иммунохимическом анализе антитело, специфически связывающееся с полипептидом настоящего изобретения, дает сигнал обнаружения, по крайней мере, в 5, 10 или 20 раз выше, чем сигнал обнаружения других белков. Предпочтительно, антитела, специфически связывающиеся с полипептидом настоящего изобретения, не обнаруживают другие белки в иммунохимических анализах и могут иммунопреципитировать полипептид настоящего изобретения из раствора.

Полипептиды настоящего изобретения можно использовать для иммунизации млекопитающих, таких как мышь, крыса, кролик, морская свинка, обезьяна или человек, для получения поликлональных антител. При желании, полипептид настоящего изобретения можно конъюгировать с белком-носителем, таким как бычий сывороточный альбумин, тиреоглобулин, и гемоцианин моллюска Keyhole Limpet. В зависимости от вида хозяина для усиления иммунологического ответа можно использовать различные адъюванты. Такие адъюванты включают, без ограничения, адъювант Фрейнда, минеральные гели (например, гидроксид алюминия), и поверхностно-активные вещества (например, лизолецитин, полиолы плуроника, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин моллюска Keyhole Limpet и динитрофенол). Среди адъювантов, используемых для людей, особенно применимы BCG (бациллы Кальметта-Герена) и *Corynebacterium parvum*.

Моноклональные антитела, специфически связывающиеся с полипептидом настоящего изобретения, можно получить, используя любую методику, предусматривающую продуцирование молекул антитела перевиваемыми линиями клеток в культуре. Эти методики включают, без ограничения, гибридомную методику, методику гибридом В-клеток человека и методику гибридомы EBV (Kohler, et al., Nature 256:495-97, 1985; Kozbor, et al., J. Immunol. Methods 81:3142, 1985; Cote, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-30, 1983; Cole, et al., Mol. Cell Biol. 62:109-20, 1984).

Кроме того, можно использовать методы, разработанные для получения "химерных антител", соединение генов антитела мыши с генами антитела человека для получения молекулы с соответствующей антигенной специфичностью и биологической активностью (Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55, 1984; Neuberger, et al., Nature 312:604-08, 1984; Takeda, et al., Nature 314:452-54, 1985). Моноклональные и другие антитела можно также "гуманизировать", чтобы предотвратить у пациента возникновение иммунной реакции против антитела при использовании его в терапевтических целях. Такие антитела могут быть достаточно сходны по последовательности с человеческими антителами и могут непосредственно использоваться в терапии, или может требоваться изменение нескольких ключевых остатков. Разность в последовательности между антителами грызуна и человека можно минимизировать, заменяя остатки, которые отличаются от остатков в последовательностях человека, сайт-направленным мутагенезом отдельных остатков или заимствованием целых областей, определяющих комплементарность. Альтернативно, адаптированные антитела можно получить при использовании рекомбинантных методов (см., например, GB2188638B). Антитела, специфически связывающиеся с полипептидом настоящего изобретения, могут содержать сайты связывания с антигеном, которые частично или полностью адаптированы к человеку, как описано в патенте США № 5,565,332.

Альтернативно, методы, описанные для получения одноцепочечных антител, можно адаптировать, используя методы, известные в данной области техники, для получения одноцепочечных антител, специфически связывающихся с полипептидом настоящего изобретения. Антитела со взаимосвязанной спецификой, но определенного

идиотипического состава, можно получить перестановкой цепей из случайных комбинаторных иммуноглобулиновых библиотек (Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-23, 1991).

Одноцепочечные антитела также можно сконструировать при использовании метода амплификации ДНК, такого как ПЦР, используя гибридную кДНК в качестве матрицы (Thirion, et al., Eur. J. Cancer Prev. 5:507-11, 1996). Одноцепочечные антитела могут быть моно- или биспецифическими, и могут быть бивалентными или четырехвалентными. Конструирование четырехвалентных, биспецифических одноцепочечных антител описано, например, в Coloma & Morrison (Nat. Biotechnol. 15:159-63, 1997). Конструирование бивалентных, биспецифических одноцепочечных антител описано в Mallender & Voss (J. Biol. Chem. 269:199-206, 1994).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая одноцепочечное антитело, может быть сконструирована при использовании ручного или автоматизированного нуклеотидного синтеза, клонирована в конструкцию экспрессии при использовании стандартных методов рекомбинантных ДНК, и введена в клетку для экспрессии кодирующей последовательности, как описано ниже. Иначе, одноцепочечные антитела можно получить непосредственно, при использовании, например, методики нитчатого фага (Verhaar, et al., Int. J. Cancer 61:497-501, 1995; Nicholls, et al., J. Immunol. Meth. 165:81-91, 1993).

Антитела, специфически связывающиеся с полипептидом настоящего изобретения, можно также получить индуцированием продукции *in vivo* в популяции лимфоцитов или скринингом иммуноглобулиновых библиотек или панелей высокоспецифичных связывающих реагентов, как описано в литературе (Orlandi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:38333-37, 1989; Winter, et al., Nature 349:293-99, 1991).

Другие типы антител могут быть сконструированы и использоваться терапевтически в способах согласно изобретению. Например, химерные антитела могут быть созданы, как описано в публикации WO 93/03151. Также могут быть получены связывающие белки, полученные из иммуноглобулинов и являющиеся мультивалентными

и мультиспецифическими, таких как “диатела” (diabodies) (см., например, WO 94/13804).

5 Человеческие антитела со способностью связываться с полипептидами настоящего изобретения могут также быть идентифицированы из библиотеки MorphoSys
HuCAL® следующим образом. Полипептидом настоящего изобретения можно по-
10 крыть планшет для микротитрования и культивировать его с фаговой библиотекой MorphoSys HuCAL® Fab. Связанные с фагом антитела Fab, не связавшиеся с полипептидом настоящего изобретения, можно смыть с планшета, оставляя только фаг,
15 прочно связанный с полипептидом настоящего изобретения. Связанный фаг можно элюировать, например, изменением pH или элюированием с *E. coli* и накопить инфицированием хозяев *E. coli*. Этот процесс пэннинга (отбора) можно повторить один или два раза для обогащения популяции антител, прочно связывающихся с полипеп-
20 тидом настоящего изобретения. Антитела Fab из обогащенной популяции затем экспрессируют, очищают и скринируют в исследовании ELISA.

25 Антитела согласно изобретению можно очистить методами, известными в данной области техники. Например, антитела могут быть аффинно очищены пропусканием через колонку, с которой связан полипептид настоящего изобретения. Связавшиеся антитела затем можно элюировать с колонки, используя буфер с высокой концен-
30 трацией соли.

35 Благодаря способности стимулировать секрецию инсулина из островковых клеток поджелудочной железы *"in vitro"* и вызывать снижение уровня глюкозы в крови *"in vivo"*, полипептиды настоящего изобретения можно использовать при лечении диабе-
40 бета, включая диабет типа 1 и типа 2 (инсулинонезависимый сахарный диабет). Такое лечение может также задержать начало диабета и диабетических осложнений. Полипептиды можно использовать для предотвращения развития диабета 2 типа у пациентов с нарушенной переносимостью глюкозы. Другие заболевания и состоя-
45 ния, которые можно лечить или предотвращать при использовании соединений изобретения в методах изобретения, включают: диабет взрослого типа у молодых (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994); нарушенная переноси-
50

мость глюкозы (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999); нарушенный уровень "голодной" глюкозы (IFG - Impaired Fasting Glucose) (Charles, et al., Diabetes 40:796, 1991); гестационный диабет (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); и метаболический синдром X.

Полипептиды настоящего изобретения также могут быть эффективны при таких нарушениях, как ожирение, и при лечении атеросклеротического заболевания, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, низких уровней ЛВП, гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний (включая атеросклероз, коронарную болезнь сердца, болезнь коронарной артерии и гипертензию), заболеваний сосудов головного мозга и заболеваний периферических сосудов; а также при лечении волчанки, синдрома поликистоза яичника, канцерогенеза и гиперплазии, астмы, проблем репродукции у мужчин, язвы, нарушений сна, нарушений метаболизма липидов и углеводов, циркадианной дисфункции, нарушений роста, нарушений гомеостаза энергии, иммунных заболеваний, включая аутоиммунные заболевания (например, системную красную волчанку), а также острых и хронических воспалительных заболеваний и септического шока.

Соединения настоящего изобретения могут также быть полезны при лечении физиологических нарушений, связанных, например, с клеточной дифференцировкой для продуцирования клеток, накапливающих липид, регулировкой чувствительности к инсулину и уровней глюкозы в крови, которые задействованы, например, в ненормальном функционировании β -клеток поджелудочной железы, опухолях, секретирующих инсулин и/или аутоиммунной гипогликемии из-за аутоантител к инсулину, аутоантител к инсулиновому рецептору, или аутоантител, являющихся стимулирующими для β -клеток поджелудочной железы), с дифференцировкой макрофагов, ведущей к образованию атеросклеротических бляшек, с воспалительной реакцией, канцерогенезом, гиперплазией, экспрессией гена адипоцита, дифференцировкой адипоцитов, снижением массы β -клеток поджелудочной железы, секрецией инсулина, чувствительностью ткани к инсулину, ростом клеток липосаркомы, поликистозным заболеванием яичников, хронической ановуляцией, гиперандрогенизмом, продукцией прогестерона, стероидогенезом, окислительно-восстановительным потенциалом и окислительным стрессом в клетках, продуцированием синтазы оксида

азота (NOS), повышенными уровнями гамма-глутамил транспептидазы, каталазы, триглицеридов плазмы, холестерина ЛВП и ЛНП, и т.п.

Соединения изобретения также можно использовать в способах изобретения для лечения вторичных причин диабета (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999). Такие вторичные причины включают избыток глюкокортикоида, избыток гормона роста, феохромоцитому и лекарственный диабет. К лекарствам, которые могут вызвать диабет, относятся, без ограничения, пириминил, никотиновая кислота, глюкокортикоиды, фенитоин, тиреоидный гормон, β -адренергические агенты, α -интерферон и лекарства, применяемые при лечении ВИЧ инфекции.

Кроме того, полипептиды изобретения можно использовать для лечения астмы (Bolin, et al., Biopolymer 37:57-66, 1995; патент США № 5,677,419, где показано, что полипептид R3P0 активен в расслабленной гладкой мышце трахеи морской свинки); индукции гипотонии (VIP вызывает гипотонию, тахикардию и гиперемию лица у пациентов с астмой (Morice, et al., Peptides 7:279-280, 1986; Morice, et al., Lancet 2:1225-1227, 1983); репродуктивных проблем у мужчин (Siow, et al., Arch. Androl. 43(1):67-71, 1999); в качестве анти-апоптозного/нейропротективного агента (Breneman, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:207-12, 1998); для защиты сердца в течение ишемических событий (Kalfin, et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1268(2):952-8, 1994; Das, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:297-308, 1998), для манипуляции с циркадными часами и сопутствующими им заболеваниями ((Hamar, et al., Cell 109:497-508, 2002; Shen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97:11575-80, 2000), и, наконец, в качестве агента против язвы (Tuncel, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:309-22, 1998).

Полипептиды настоящего изобретения можно использовать по отдельности или в комбинации с дополнительными способами лечения и/или соединениями, известными специалистам в данной области техники для лечения диабета и связанных нарушений. Альтернативно, способы и соединения, описанные здесь, можно использовать, частично или полностью, в комбинированной терапии.

Полипептиды изобретения можно также применяться в комбинации с другими известными средствами для лечения диабета, включая агонисты PPAR, препараты сульфонилмочевины, стимуляторы секреции, не являющиеся соединениями сульфонилмочевины, ингибиторы α -глюкозидазы, агенты, повышающие чувствительность к инсулину, стимуляторы секреции инсулина, соединения, снижающие выход глюкозы из печени, инсулин и препараты против ожирения. Такие средства могут применяться до, одновременно с или после применения полипептидов изобретения. Инсулин включает как долго, так и короткодействующие формы и составы инсулина. Агонист PPAR может включать агонисты любой из субъединиц PPAR или их комбинации. Например, агонист PPAR может включать агонисты PPAR- α , PPAR- γ , PPAR- δ или любой комбинации двух или трех субъединиц PPAR. К агонистам PPAR относятся, например, розиглитазон и пиоглитазон. К препаратам сульфонилмочевины относятся, например, глибурид, глимепирид, хлорпропамид и глипизид. К ингибиторам α -глюкозидазы, которые могут быть применимы при лечении диабета вместе с полипептидами изобретения, относятся акарбоза, миглитол и воглибоз. Агенты, повышающие чувствительность к инсулину, которые могут быть применимы при лечении диабета, включают тиазолидиндионы и соединения, не являющиеся тиазолидиндионами. Соединения, снижающие выход глюкозы печени, которые могут быть полезны при лечении диабета при совместном применении с полипептидом изобретения, включают метформин, типа Glucophage и Glucophage XR. Стимуляторы секреции инсулина, которые могут быть полезны при лечении диабета при совместном применении с полипептидом изобретения, включают препараты сульфонилмочевины и препараты, не являющиеся ими: GLP-1, GIP, секретин, натеглинид, меглитинид, репаглинид, глибенкламид, глимепирид, хлорпропамид, глипизид. GLP-1 включает производные GLP-1 с более длинными периодами полураспада, чем у нативного GLP-1, такие как, например, GLP-1, дериватизированный жирной кислотой, и экзендин. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды изобретения используют в комбинации со стимуляторами секреции инсулина, чтобы повысить чувствительность β -клеток поджелудочной железы к стимулятору секреции инсулина.

Полипептиды изобретения могут также использоваться в способах изобретения в комбинации с препаратами против ожирения. Препараты против ожирения включа-

ют агонисты β -3, антагонисты CB-1, средства, подавляющие аппетит, такие как, например, сибутрамин (Meridia), и ингибиторы липазы, такие как, например, орлистат (Xenical).

Полипептиды изобретения могут также использоваться в способах изобретения в комбинации с препаратами, обычно применяемыми при лечении липидных нарушений у пациентов с диабетом. Такие препараты включают, без ограничения, ингибиторы HMG-CoA редуктазы, никотиновую кислоту, вещества, усиливающие экскрецию (секвестранты) желчной кислоты, и производные фибровой кислоты. Полипептиды изобретения могут также использоваться в комбинации с гипотензивными препаратами, такими как, например, β -блокаторы и ингибиторы ACE.

Такую совместную терапию можно применять в любой комбинации двух или более препаратов (например, соединение изобретения в комбинации с инсулиновым сенситизатором и препаратом против ожирения). Таковую совместную терапию можно применять в форме фармацевтических композиций, как описано выше.

В настоящем документе используются определяемые ниже термины.

При представлении элементов настоящего изобретения или предпочтительного варианта(ов) его осуществления артикли английского языка "a", "an", "the" и термин "указанный" означают, что существует один или более элементов. Термины "включать", "содержать" и "иметь" являются включающими и подразумевают возможность наличия дополнительные элементов помимо указанных в списке.

Термин "субъект" в настоящем документе относится к млекопитающим (например, людям и животным).

Термин "лечение" включает любой процесс, действие, применение, терапию, или подобное, когда субъект, включая человека, получает медицинскую помощь с целью улучшения его состояния, прямо или косвенно, или замедления прогрессии состояния или заболевания субъекта.

Термин “комбинированная терапия” или “совместная терапия” означает введение двух или более терапевтических агентов для лечения диабетического состояния и/или нарушения. Такой способ введения охватывает совместное введение двух или более терапевтических агентов по существу одновременно, например, в одной капсуле, содержащей активные ингредиенты в определенном соотношении, или в нескольких отдельных капсулах для каждого ингибирующего агента. Кроме того, такой способ введения подразумевает применение каждого типа терапевтического агента последовательно.

Фраза “терапевтически эффективное” означает количество каждого вводимого агента, ведущее к достижению цели улучшения диабетического состояния или выраженности нарушения, при отсутствии или минимизации неблагоприятных побочных эффектов, связанных с лечением.

Термин “фармацевтически приемлемый” означает, что объект подходит для применения в фармацевтическом продукте.

Эффективную дозу полипептидов настоящего изобретения для каждого случая можно легко определить, основываясь на известных способах определения эффективности лечения указанных выше состояний млекопитающих и сравнивая эти результаты с результатами известных медикаментов, применяемых для лечения этих состояний. Количество активного ингредиента (например, полипептидов) для введения при лечении одного из этих состояний может сильно изменяться в зависимости от таких параметров, как конкретное соединение и используемый тип дозировки, способ введения, период лечения, возраст и пол пациента и природа и степень состояния.

Общее количество вводимого активного ингредиента в общем может находиться в пределах приблизительно от 0,0001 мг/кг до 200 мг/кг, предпочтительно - приблизительно от 0,01 мг/кг до 200 мг/кг веса тела в сутки. Дозировочная единица может содержать приблизительно от 0,05 мг до 1500 мг активного ингредиента, и может применяться один или более раз в сутки. Дневная доза для введения в инъекции, включая внутривенную, внутримышечную, подкожную, и парентеральную инъекции и использование методов вливания, может составлять приблизительно от 0,01 до 200

мг/кг. Дневная ректальная доза может составлять от 0,01 до 200 мг/кг общего веса тела. Трансдермальная концентрация может быть такой, какая требуется для поддержания суточной дозы от 0,01 до 200 мг/кг.

Конечно, конкретная начальная и поддерживающая дозировка для каждого пациента изменяется в зависимости от природы и серьезности состояния, определяемых лечащим врачом, активности конкретного применяемого полипептида, возраста пациента, его диеты, времени введения, способа введения, скорости выделения лекарственного средства, комбинаций лекарственных средств и подобных факторов. Требуемый способ лечения и число доз полипептида настоящего изобретения могут быть установлены специалистом в данной области техники при использовании традиционных методов анализа лечения.

Полипептиды настоящего изобретения могут использоваться для достижения желательного фармакологического эффекта путем введения пациенту в соответственно составленной фармацевтической композиции. Пациентом в настоящем изобретении является млекопитающее, включая человека, нуждающееся в лечении конкретного состояния или заболевания. Таким образом, настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, состоящие из фармацевтически приемлемого носителя и терапевтически эффективного количества полипептида. Фармацевтически приемлемым носителем является любой носитель, который является относительно нетоксичным и безвредным для пациента в концентрациях, соответствующих эффективной активности активного ингредиента так, чтобы любые побочные эффекты, приписываемые носителю, не искажали благоприятных воздействий активного ингредиента. Терапевтически эффективным количеством полипептида является количество, дающее результат или оказывает влияние на специфическое состояние, подлежащее лечению. Описанные здесь полипептиды могут применяться с фармацевтически приемлемым носителем при использовании любых эффективных традиционных форм дозировки, включая, например, препараты немедленного действия или с задержанным высвобождением, перорально, парентерально, местно или подобным способом.

Для перорального применения полипептиды могут находиться в форме твердых или жидких препаратов, таких как, например, капсулы, пилюли, таблетки, лепешки, рас-

плавы, порошки, растворы, суспензии или эмульсии, и могут быть получены согласно методам, известным в данной области техники для производства фармацевтических композиций. Твердые дозировочные формы могут представлять собой капсулу, имеющую оболочку из обыкновенного твердого или мягкого желатина, содержащую например, поверхностно-активные вещества, смазочные вещества и инертные наполнители, такие как лактоза, сахароза, фосфат кальция и кукурузный крахмал.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды настоящего изобретения могут быть таблетированы с традиционными основами для таблеток, такими как лактоза, сахароза и кукурузный крахмал, в комбинации со связующими компонентами, такими как гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатин; дезинтегрирующими агентами, предназначенными для облегчения разрушения и растворения таблетки после введения, такими как картофельный крахмал, альгиновая кислота, кукурузный крахмал и гуаровая камедь; смазочными агентами, предназначенными для облегчения грануляции таблетки и предотвращения прилипания материала таблетки к поверхностям матриц и пуансонов для таблетирования, такими как тальк, стеариновая кислота или стеарат магния, кальция или цинка; красителями; пигментами; и вкусовыми добавками, предназначенными для улучшения эстетических качеств таблеток и их большей приемлемости для пациента. Наполнители, подходящие для использования в пероральных жидких формах дозировки, включают разбавители, такие как вода и спирты, например, этанол, бензиловый спирт, и полиэтиленовые спирты, с или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, суспендирующего агента, или эмульгатора. Другие различные материалы могут применяться в качестве покрытия или для иной модификации физической формы дозировочной единицы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или обоими компонентами.

Диспергируемые порошки и гранулы подходят для получения водной суспензии. Они содержат активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом, и одним или более консервантами. Примерами подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов являются упомянутые выше вещества. Также могут присутствовать дополнительные

наполнители, например, подсластители, вкусовые добавки и красители, описанные выше.

5 Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут также быть в форме эмульсий типа "масло в воде". Масляная фаза может представлять собой минеральное масло, такое как вазелиновое масло, или смесь растительных масел. Соответствующие эмульгаторы могут представлять собой (1) природные смолы, такие как
10 гуммиарабик и трагакантовая камедь, (2) природные фосфатиды, такие как соевый и лецитин, (3) сложные эфиры или неполные эфиры, производные жирных кислот и ангидридов гексита, например, сорбитмоноолеат, и (4) продукты конденсации указанных неполных эфиров этиленоксидом, например, полиоксиэтилен сорбитмоноолеат. Эмульсии могут также содержать подсластители и вкусовые добавки.

20 Масляные суспензии могут быть получены суспендированием активного ингредиента в растительном масле, таком как, например, арахисовое масло, оливковое масло, кунжутное масло или кокосовое масло; или в минеральном масле, таком как вазелиновое масло. Масляные суспензии могут содержать загуститель, такой как, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Суспензии могут также
25 содержать один или более консервантов, например, этил или н-пропил п-гидроксibenзоат; один или более красителей; одну или более вкусовых добавок; и один или более подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

35 Сиропы и эликсиры могут быть приготовлены с подсластителями, такими как, например, глицерин, пропиленгликоль, сорбит или сахароза. Такие составы могут также содержать смягчающий агент, и консервант, вкусовые добавки и красители.

40 Полипептиды настоящего изобретения могут также применяться парентерально, то есть подкожно, внутривенно, внутримышечно или внутривнутрибрюшинно, в виде дозированных форм для инъекций, содержащих соединение в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой
45 стерильную жидкость или смесь жидкостей, таких как вода, физиологический раствор, водные растворы декстрозы и связанных сахаров; спирт, такой как этанол, изопропанол или гексадеканол; гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленг-

50

5 ликолю; кетали глицерина, такие как 2,2-диметил-1,1-диоксолан-4-метанол; эфиры, такие как поли(этиленгликоль) 400; масло; жирная кислота; сложный эфир жирной кислоты или глицерид; или ацетилованный глицерид жирной кислоты, с или без
10 добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, суспендирующего агента, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгатора и других фармацевтических адъювантов.

15 Примерами масел, которые могут использоваться в парентеральных составах настоящего изобретения, являются масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, кунжутное масло, хлопковое масло, кукурузное масло, оливковое масло, вазелин и минеральное масло. Подходящие жирные кислоты включают олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Подходящими эфирами жирной кислоты являются, например, этилолеат и изопропилмиристат. Подходящие мыла включают жирные соли щелочного металла, аммония и триэтаноламина, а подходящие детергенты включают катионные детергенты, например, галиды диметил диалкил аммония, галиды алкилпиридиния и ацетаты алкиламина; анионные детергенты, например, алкил-, арил- и олефин-сульфонаты, алкил-, олефин-, эфир- и моноглицерид-сульфаты, и сульфосукцинаты; неионные детергенты, например, жирные оксиды амина, алканоламида жирной кислоты и сополимеры полиоксиэтиленполипропилена; и детергенты амфотерного типа, например, алкил-бета-аминопропионаты и соли 2-алкилимидазолина четвертичного аммония, а также смеси.

40 Парентеральные композиции настоящего изобретения обычно могут содержать от около 0,5% до около 25% по массе активного ингредиента в растворе. Также полезно использовать консерванты и буферы. С целью минимизации или исключения раздражения в месте инъекции такие композиции могут содержать неионное поверхностно-активное вещество, характеризующееся значением гидрофильно-липофильного баланса (HLB) приблизительно от 12 до 17. Количество поверхностно-активного вещества в таком составе составляет приблизительно от 5% до 15% по массе. Поверхностно-активное вещество может представлять собой один компонент с указанным выше значением HLB или смесь двух или более

выше значением HLB или смесь двух или более компонентов с желательным значением HLB.

Примерами поверхностно-активных веществ, применяемых в парентеральных составах, является класс сложных эфиров жирной кислоты и полиэтиленсорбита, например, сорбитмоноолеат и высокомолекулярные аддукты этиленоксида с гидрофобным основанием, полученные конденсацией пропиленоксида с пропиленгликолем.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильных водных суспензий для инъекций. Такие суспензии могут быть приготовлены согласно известным методам при использовании соответствующих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, таких как, например, натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметил-целлюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и гуммиарабик; диспергирующие и смачивающие агенты могут представлять собой природный фосфатид типа лецитина, продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой, например, стеарат полиоксиэтилена, продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом, например, гептадекаэтиленоксиэтанол, продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром, производным жирной кислоты и гексита, такой как полиоксиэтилен сорбитмоноолеат, или продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром, производным жирной кислоты и ангидрида гексита, например полиоксиэтилен сорбитанмоноолеат.

Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию в нетоксичном приемлемом разбавителе или растворителе, применимом парентерально. Разбавители и растворители, которые можно использовать, включают, например, воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителей или среды для суспендирования традиционно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно применять любое мягкое, нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для приготовления инъекций можно применять жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Композиция по изобретению может также применяться в форме суппозиториев для ректального введения лекарства. Эти композиции могут быть получены путем смешивания лекарства (например, полипептида) с подходящим нераздражающим наполнителем, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре, и, таким образом, будет плавиться в прямой кишке, высвобождая лекарство. Таким материалом является, например, масло какао и полиэтиленгликоль.

Другой состав, используемый в способах настоящего изобретения, задействует трансдермальные приспособления доставки ("пластыри"). Такие трансдермальные пластыри можно использовать для обеспечения непрерывного или прерывистого введения соединений настоящего изобретения в контролируемых количествах. Конструкция и использование трансдермальных пластырей для доставки фармацевтических агентов хорошо известны в данной области техники (см., например, патент США 5,023,252, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Такие пластыри могут быть созданы для непрерывной, пульсирующей доставки фармацевтических агентов или доставки по требованию.

Может быть желательно или необходимо ввести пациенту фармацевтическую композицию посредством механического устройства доставки. Конструкция и использование механических устройств для доставки фармацевтических агентов хорошо известны в данной области техники. Например, прямые методы введения лекарства непосредственно в мозг обычно включают размещение катетера для доставки лекарства в вентрикулярной системе пациента, чтобы обойти гематоэнцефалический барьер. Одна такая имплантируемая система доставки, используемая для транспорта агентов к конкретным анатомическим областям тела, описана в патенте США 5,011,472, включенном в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции по изобретению могут также содержать другие традиционные фармацевтически приемлемые ингредиенты, называемые в общем носители или разбавители, по мере необходимости или желания. Любую из композиций настоящего изобретения можно сохранять добавлением антиоксиданта типа аскорбиновой кислоты

или других подходящих консервантов. Можно применять традиционные способы получения таких композиций в соответствующих формах дозировки.

5 Обычно используемые фармацевтические ингредиенты, которые можно использо-
вать для составления композиций для определенного способа введения, включают:
подкислители, например, без ограничения, уксусную кислоту, лимонную кислоту,
10 фумаровую кислоту, соляную кислоту, азотную кислоту; и подщелачивающие аген-
ты, такие как, без ограничения, нашатырный спирт, карбонат аммония, диэтанол-
амин, моноэтаноламин, гидроксид калия, борат натрия, карбонат натрия, гидроксид
15 натрия, триэтаноламин, троламин.

Другие фармацевтические ингредиенты включают, например, без ограничения, ад-
сорбенты (например, порошковая целлюлоза и активированный уголь); аэрозольные
20 пропелленты (например, диоксид углерода, CCl_2F_2 , $\text{F}_2\text{ClC-CClF}_2$ и CClF_3); газы-
вытеснители (например, азот и аргон); противогрибковые консерванты (например,
бензойная кислота, бутилпарабен, этилпарабен, метилпарабен, пропилпарабен, бен-
25 зоат натрия); противомикробные консерванты (например, хлорид бензалкония, хло-
рид бензэтония, бензиловый спирт, хлорид цетилпиридиния, хлорбутанол, фенол,
фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути и тимеросал); антиоксиданты (например,
30 аскорбиновая кислота, аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бути-
лированный гидрокситолуол, гипофосфорная кислота, монотиоглицерин, пропил-
галлат, аскорбат натрия, бисульфит натрия, формальдегид сульфоксилат натрия, ме-
табисульфит натрия); связующие вещества (например, блок-полимеры, природные и
35 синтетические каучуки, полиакрилаты, полиуретаны, кремнийорганические соеди-
нения и сополимеры стирола-бутадиена); буферные агенты (например, метафосфат
калия, одноосновный фосфат калия, ацетат натрия, безводный цитрат натрия и ди-
40 гидрат цитрата натрия); носители (например, сироп акации, ароматический сироп,
ароматический эликсир, вишневый сироп, сироп какао, апельсиновый сироп, сироп,
кукурузное масло, минеральное масло, арахисовое масло, кунжутное масло, бакте-
45 риостатический хлористый натрий для инъекций и бактериостатическая вода для
инъекций); хелатирующие агенты (например, этилендиаминтетрауксуснокислый
двунарий и этилендиаминтетрауксусная кислота); красители (например, FD&C
Красный Номер 3, FD&C Красный Номер 20, FD&C Желтый Номер 6, FD&C Синий
50

Номер 2, D&C Зеленый Номер 5, D&C Оранжевый Номер 5, D&C Красный Номер 8, карамельный краситель и красный оксид железа); осветляющие агенты (например, бентонит); эмульгаторы (без ограничения, гуммиарабик, цетомакрогол, цетиловый спирт, глицерилмоностеарат, лецитин, сорбитмоноолеат, полиэтилен 50 стеарат); капсулирующие агенты (например, желатин и фталат ацетилцеллюлозы); вкусовые добавки (например, анисовое масло, коричное масло, какао, ментол, апельсиновое масло, масло мяты перечной и ванилин); гигроскопические вещества (например, глицерин, пропиленгликоль и сорбит); отмучивающие агенты (например, минеральное масло и глицерин); масла (например, арахисовое масло, минеральное масло, оливковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло и растительное масло); основы для мазей (например, ланолин, гидрофильная мазь, мазь полиэтиленгликоля, вазелин, гидрофильный вазелин, белая мазь, желтая мазь и розовая водная мазь); усилители впитывания (трансдермальная доставка) (например, моногидрокси- или полигидрокси-спирты, насыщенные или ненасыщенные жирные спирты, насыщенные или ненасыщенные жирные эфиры, насыщенные или ненасыщенные дикарбоновые кислоты, эфирные масла, производные фосфатидила, кефалин, терпены, амиды, эфиры, кетоны и карбамиды); пластификаторы (например, диэтилфталат и глицерин); растворители (например, спирт, кукурузное масло, хлопковое масло, глицерин, изопропиловый спирт, минеральное масло, олеиновая кислота, арахисовое масло, очищенная вода, вода для инъекций, стерильная вода для инъекций и стерильная вода для промывания); загустители (например, цетиловый спирт, воск цетиловых эфиров, микрокристаллический воск, парафин, стеариловый спирт, белый воск и желтый воск); основы для суппозиторий (например, масло какао и полиэтиленгликоли (смеси)); поверхностно-активные вещества (например, хлорид бензалкония, ноноксинол 10, октоксинол 9, полисорбат 80, лаурилсульфат натрия и сорбитмонопальмитат); суспендирующие агенты (например, агар, бентонит, карбомеры, натрий карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, каолин, метилцеллюлоза, трагакант и Veegum); подсластители (например, аспартам, декстроза, глицерин, маннит, пропиленгликоль, натрия сахарин, сорбит и сахароза); агенты против прилипания таблеток (например, стеарат магния и тальк); связующие компоненты таблетки (например, гуммиарабик, альгинатная кислота, натрий карбоксиметилцеллюлоза, сжимаемый сахар, этилцеллюлоза, желатин, раствор глюкозы, метилцеллюлоза, повидон и предварительно желатини-

5 зированный крахмал); разбавители для таблеток и капсул (например, двуосновный фосфат кальция, каолин, лактоза, маннит, микрокристаллическая целлюлоза, порош-
ковая целлюлоза, осажденный карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат натрия,
10 сорбит и крахмал); вещества для покрытия таблеток (например, раствор глюкозы, гидроксиэтилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллю-
лоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, фталат ацетата целлюлозы и шеллак); напол-
15 нители для прессования таблеток (например, двухосновный фосфат кальция); дезин-
тегрирующие агенты для таблеток (например, альгиновая кислота, кальций карбок-
симетилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, калий полакриллин, альги-
нат натрия, крахмальный гликолят натрия и крахмал); скользящие вещества для таб-
20 леток (например, коллоидная окись кремния, кукурузный крахмал и тальк); смазоч-
ные вещества таблеток (например, стеарат кальция, стеарат магния, минеральное
масло, стеариновая кислота и стеарат цинка); загустители для таблеток/капсул (на-
25 пример, двуокись титана); полирующие компоненты для таблеток (например, карна-
убский воск и белый воск); загустители (например, пчелиный воск, цетиловый спирт
и парафин); агенты для тоничности (например, декстроза и хлористый натрий); аген-
30 ты, повышающие вязкость (например, альгиновая кислота, бентонит, карбомеры, на-
трий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, повидон, альгинат натрия и трага-
кант); и смачивающие вещества (например, гептадекаэтилен оксиэтанол, лецитины,
полиэтилен сорбитмоноолеат, полиоксиэтилен сорбитмоноолеат и полиоксиэтилен
стеарат).

35 Описанные здесь полипептиды можно вводить как единственный фармацевтический
агент или в комбинации с одним или более другими фармацевтическими агентами,
причем комбинация не вызывает никаких недопустимых неблагоприятных эффек-
тов. Например, полипептиды настоящего изобретения можно комбинировать с из-
40 известными препаратами против ожирения, или с известными препаратами против
диабета или для других показаний и т.п., а также с их смесями и комбинациями.

45 Описанные здесь полипептиды можно также применять в основной свободной фор-
ме или в композициях, в исследованиях и диагностике или как аналитические стан-
дарты, и т.п. Таким образом, настоящее изобретение включает композиции, которые
состоят из инертного носителя и эффективного количества соединения, идентифи-
50

цированного в описанных здесь методах, или его соль или сложный эфир. Инертный носитель представляет собой любой материал, который не взаимодействует с соединением, которое он переносит, и который предоставляет поддержку, способ перемещения, массу, следовой материал, и т.п. для соединения, которое переносится. Эффективное количество соединения - это то количество, которое дает результат или оказывает влияние на конкретную осуществляемую процедуру.

Известно, что в водной и неводной среде полипептиды подвергаются гидролизу, дезамидированию, окислению, рацемизации и изомеризации. Деградацию типа гидролиза, дезамидирования или окисления можно легко обнаружить методом капиллярного электрофореза. Несмотря на ферментативную деградацию полипептиды, обладающие длительным периодом полураспада в плазме или биологическим резидентным временем, как минимум, должны быть стабильны в водном растворе. Важно, чтобы полипептиды деградировали менее чем на 10% в течение одного дня при температуре тела. Более предпочтительно, чтобы полипептиды деградировали менее чем на 5% в течение одного дня при температуре тела. Так как пациентам с хроническим диабетом требуется лечение на всем протяжении жизни, весьма предпочтительно, чтобы терапевтические агенты были удобны в применении, кроме того, в случае парентерального введения, характеризовались нечастыми приемами. Стабильность (то есть, деграция менее чем на несколько процентов) в течение недель при температуре тела позволяет менее частый прием доз. Стабильность в течение лет при температуре холодильника позволяет изготовителю представлять жидкий состав, таким образом, избегая неудобства восстановления. Кроме того, стабильность в органическом растворителе обеспечивает возможность заключать полипептиды в новые формы дозирования, такие как имплантат.

Составы, пригодные для подкожного, внутривенного, внутримышечного и подобного способов введения; подходящие фармацевтические носители; и методы для составления и введения могут осуществляться любыми из методов, известных в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 20th edition, 2000).

Следующие примеры представлены для пояснения описанного здесь изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие область охвата изобретения никаким способом.

Состав капсулы

В состав капсулы входят:

Полипептид настоящего изобретения	10 мг
Крахмал	109 мг
Стеарат магния	1 мг

Компоненты смешивают, пропускают через соответствующее сито и помещают в твердые желатиновые капсулы.

Состав таблетки

В состав таблетки входят:

Полипептид настоящего изобретения	25 мг
Целлюлоза микрокристаллическая	200 мг
Коллоидный диоксид кремния	10 мг
Стеариновая кислота	5,0 мг

Ингредиенты смешивают и прессуют в форме таблеток. Для улучшения вкуса, формы и стабильности или задержки адсорбции можно применять соответствующие покрытия на водной и неводной основе.

Стерильный внутривенный раствор

Раствор (мг/мл) требуемого соединения настоящего изобретения готовят, используя стерильную воду для инъекций, и при необходимости регулируют значение pH. Для введения раствор разбавляют стерильной 5% декстрозой и применяют как внутривенное вливание.

Внутримышечная суспензия

Готовят следующую внутримышечную суспензию:

5	Полипептид настоящего изобретения	50 мкг/мл
	Натрий карбоксиметилцеллюлоза	5 мг/мл
	Твин 80	4 мг/мл
10	Хлорид натрия	9 мг/мл
	Бензиловый спирт	9 мг/мл

15 Суспензия применяется внутримышечно.

Капсулы в твердой оболочке

20 Получают большое количество отдельных капсул, заполняя каждую из стандартных состоящих из двух частей твердых желатиновых капсул активным ингредиентом в виде порошка, 150 мг лактозы, 50 мг целлюлозы и 6 мг стеарата магния.

Мягкие желатиновые капсулы

25 Готовят смесь активного ингредиента в перевариваемом масле, таком как соевое, хлопковое или оливковое масло, и посредством поршневого насоса вводят в расплавленный желатин, формируя мягкие желатиновые капсулы, содержащие активный ингредиент. Капсулы промывают и сушат. Активный ингредиент может быть
30 растворен в смеси полиэтиленгликоля, глицерина и сорбита для получения лекарственной смеси, смешиваемой с водой.

35

Таблетки/капсулы немедленного высвобождения

Представляют собой твердые пероральные дозировочные формы, полученные традиционными и новыми способами. Эти формы принимают перорально без воды для
40 немедленного растворения и доставки лекарства. Активный ингредиент смешивают с жидкостью, содержащей ингредиенты типа сахара, желатина, пектина и подсластителей. Эти жидкости отверждают в форму твердых таблеток или каплет методами
45 лиофильной сушки экстракции твердого состояния. Лекарственные соединения лекарственного средства можно спрессовать с вязкоупругими и термоэластичными са-

50

харами и полимерами или шипучими компонентами для получения пористых матриц, предназначенных для немедленного высвобождения без потребности в воде.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что в настоящее изобретение могут быть внесены изменения и модификации, не выступающие за рамки сущности и объема изобретения, указанных в настоящем документе.

Примеры

Для лучшего понимания настоящего изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры служат только цели иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения никаким способом. Все упомянутые здесь публикации включены в своей полноте посредством ссылки.

Пример 1. Методология пептидного синтеза

Полипептиды настоящего изобретения были разработаны с целью повышения стабильности и увеличения периода полураспада этих пептидов. Конкретно, для немутированной формы этих пептидов (см., например, WO 01/23420, включенную в настоящий документ в своей полноте) продемонстрированы N-концевой гидролиз, дезамидирование, а также димеризация и тримеризация в водных и неводных средах. Для повышения стабильности и минимизации гидролиз, дезамидирование и димеризации/тримеризации остатки аспарагина (положения 9 и 28) были заменены на остатки глутамина. Кроме того, были также мутированы валин в положении 17, аланин в положении 19, лизин в положении 29, аргинин в положении 30 и тирозин в положении 31. Далее, как описано ниже, полипептиды настоящего изобретения были пэгилированы для продления периода полураспада.

Для синтеза некоторых полипептидов изобретения применяют следующий способ:

Пептидный синтез проводят согласно стратегии FMOC/т-бутил (Pennington & Dunn, Peptide Synthesis Protocols, Volume 35, 1994) в условиях непрерывного потока, используя смолы ПЭГ-полистирол Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tübingen, Germany). По окончании синтеза пептиды отщепляют от смолы и снимают защиту, используя ТФУ/ДТТ (дитиотрейтол)/H₂O/триизопропилсилан (88/5/5/2). Пептиды осаждают из

смеси для отщепления, используя холодный диэтиловый эфир. Осадок промывают три раза холодным эфиром, а затем растворяют в 5% уксусной кислоте до лиофилизации. Пептиды проверяют обращенно-фазовой хроматографией на колонке YMC-Pack ODS-AQ (YMC, Inc., Wilmington, NC) на системе Waters ALLIANCE® system (Waters Corporation, Milford, MA), используя смесь воды/ацетонитрила с 3% ТФУ в виде градиента от 0% до 100% ацетонитрила, и масс-спектрометрией MALDI на масс-спектрометре VOYAGER DETM MALDI Mass Spectrometer (модель 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Образец пептида добавляют к матричному буферу (50/50 dH₂O/ацетонитрил с 3% ТФУ) в соотношении 1/1 отношении. Пептиды, не соответствующие критерию чистоты >95% очищают обращенно-фазовой хроматографией на системе ВЭЖХ Waters Delta Prep 4000 HPLC System (Waters Corporation, Milford, MA).

Пример 2. Пэгилирование пептида

Период полураспада пептида *"in vivo"* можно увеличить путем присоединения к пептиду фрагмента полиэтиленгликоля (ПЭГ), уменьшая таким образом клиренс пептида почками и снижая разложение пептида протеазами. Использование пептида агониста рецептора VPAC2 сильно ограничено его очень коротким периодом полураспада *"in vivo"*; однако, присоединение фрагмента полиэтиленгликоля к пептиду (ПЭГилирование) продлевает период полураспада пептида достаточно для применения его один раз в день - один раз в неделю.

Пэгилирование можно осуществлять любым методом, известным специалистам в данной области техники. Однако, в этом примере, пэгилирование проводят введением в пептид уникальной цистеиновой мутации с последующим пэгилированием цистеина через устойчивую тиоэфирную связь между сульфгидрильной группой пептида и малеимидной группой реактива метокси-ПЭГ-малеимида (Nektar (Inhale/Shearwater), San Carlos, CA). Предпочтительно вводить уникальный цистеин в С-конец пептида, чтобы минимизировать возможное снижение активности после пэгилирования.

Конкретно, 2-кратный молярный избыток реагента mPEG-mal (мол. масса 22 кДа и 43 кДа) добавляют к 1 мг пептида (например, SEQ ID NO:1, с цистеиновой мутацией

на С-конце пептида) и растворяют в реакционном буфере при pH 6 (0,1М фосфат натрия / 0,1М NaCl/0,1М ЭДТУ). После 0,5 часа при комнатной температуре реакцию останавливают добавлением 2-кратного молярного избытка ДТТ по отношению к mPEG-mal . Реакционную смесь пептид-ПЭГ-mal наносят на катионообменную колонку для удаления остаточных реактивов ПЭГ, а затем наносят на колонку для гель-фильтрации для удаления остаточного свободного пептида. Чистоту, массу и число мест пэгилирования определяют электрофорезом в SDS-полиакриламидном геле и масс-спектрометрией MALDI-TOF. При присоединении к пептидам настоящего изобретения 22 кД ПЭГ способность к активации рецептора VPAC2 сохраняется. Кроме того, сохраняется также селективность активации рецептора VPAC2 по сравнению с VPAC1 и PAC1. Возможно что пэгилирование меньшим полиэтиленгликолем (например, линейным 22 кДа ПЭГ) с меньшей вероятностью снизит активность пептида, тогда как больший полиэтиленгликоль (например, разветвленный 43 кДа ПЭГ) более вероятно снизит активность. Однако, больший ПЭГ увеличивает период полураспада в плазме настолько, что возможна одна инъекция в неделю (Harris, et al., Clin. Pharmacokinet. 40:539-551, 2001).

Пример 3. Клонирование пептида

Для рекомбинантной экспрессии этих пептидов последовательность ДНК, кодирующую пептид, клонируют на С-конец к глутатион S-трансферазе (GST) так, что мономерный пептид и GST разделяет один сайт узнавания Фактора Ха. Ген, кодирующий сайт узнавания Фактора Ха, слитый с нуклеотидной последовательностью пептида, который получают, синтезируют гибридизацией двух перекрывающихся одноцепочечных фрагментов ДНК (70-90-членных), содержащих сайты ферментов рестрикции Bam HI или Xho I непосредственно на 5' последовательности ДНК клонируемого гена, с последующим синтезом противоположных цепей большим фрагментом ДНК-полимеразы I (Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD). Последовательность ДНК, выбранная для каждого гена, основана на обратной трансляции аминокислотной последовательности, разработанной для каждого пептида. В некоторых случаях ген, кодирующий пептид, получают ПЦР-мутagenезом (Picard, et al., Nucleic Acids Res 22:2587-91, 1994; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) гена, уже полученного описанным выше методом. Двухцепочечный продукт затем расщепляют Bam HI и Xho I

и лигируют в pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), также расщепленный Bam HI и Xho I. Например, чтобы экспрессировать последовательность SEQ ID NO:1 как слитую с GST, сконструированную последовательность ДНК (Фиг. 2) клонируют в pGEX-6P-1.

Пример 4. Рекомбинантная экспрессия и очистка пептида

Клетки BL21 (Stratagene, La Jolla, CA), трансформированные плазмидами, содержащими слитый GST-пептид, выращивают при 37°C до достижения показателя оптической плотности OD₆₀₀ 0,6 - 1,0, а затем клетки инкубируют с 1 mM ИПТГ (изопропил-бета-D-тиогалактозид) (Life Technologies, Carlsbad, CA) в течение 2 часов при 37°C. Клетки (2 л) центрифугируют при 7700 g 15 мин, взвешивают и выдерживают при -20°C в течение, по крайней мере, 3 часов. Замороженный осадок клеток ресуспендируют в 100 мл ледяного PBS (фосфатно-солевого буфера), содержащего 250 мкл смеси ингибитора протеаз (Sigma Chemical, St. Louis, MO) на грамм клеток, клетки разрушают ультразвуком 3 x 1 мин с интервалами 15 сек. Затем клетки центрифугируют 20 минут при 10000 g. Супернатант смешивают с 2 мл 50% смолы Глутатион Сефароза 4B (Glutathione Sepharose 4B) (Pharmacia) на шейкере в течение ночи при 4°C. Смесь супернатант/смола центрифугируют при 1500 g 15 мин, загружают в пустые хроматографические колонки Poly-Prep (Bio-Rad, Hercules, CA), промывают 30 мл PBS, затем 10 мл буфера Фактора Ха (1 mM CaCl₂, 100 mM NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Пептиды отщепляют от колонки добавлением 60 единиц Фактора Ха (Pharmacia) в 1 мл буфера Фактора Ха, инкубируют в течение ночи при 4°C и отделяют ВЭЖХ C18 HPLC (Beckman System Gold), используя петлю 2 мл и скорость потока 2 мл/мин по следующей программе: 10 мин Буфер А (0,1% ТФУ/H₂O), 30 мин градиент до буфера В (0,1% ТФУ/ACN (ацетонитрил)), 10 мин Буфер А, 10 мин градиент и 10 мин Буфер А. Собирают пиковые фракции (1 мл каждая) и исследуют их электрофорезом в 10-20% трицин-SDS геле. Фракции, содержащие пептиды Фиг.1, объединяют и высушивают. Типичные выходы составляют несколько сотен микрограммов свободных пептидов на литр культуры *E.coli*. Было показано, что рекомбинантные пептиды обладают той же активностью, что и их синтетические версии.

Пример 5. Секреция инсулина диспергированными островковыми клетками крыс

Секрецию инсулина диспергированными островками крыс, опосредованную рядом пептидов настоящего изобретения, измеряют следующим образом. Островки Лангерганса, полученные от крыс SD (200-250 г), переваривают, используя коллагеназу. Диспергированные клетки островка обрабатывают трипсином, помещают в 96-луночные планшеты с V-образным дном и осаждают. Затем клетки культивируют в течение ночи в среде с пептидами настоящего изобретения или без них. Среду отбирают и клетки предварительно инкубируют 30 минут при 37°C с буфером Кребса-Рингера-HEPES, содержащим 3 мМ глюкозы. Буфер для предварительной инкубации удаляют и клетки инкубируют в течение соответствующего времени при 37°C с буфером Кребса-Рингера-HEPES, содержащим подходящую концентрацию глюкозы (например, 8 мМ) с пептидами или без. В некоторых исследованиях также добавляют GLP-1 в соответствующей концентрации. Часть супернатанта удаляют и измеряют содержание в ней инсулина методом сцинтилляционного анализа SPA. Результаты выражают как “превышение по отношению к контролю” (FOC). В концентрации 300 нМ полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1+cys+PEG (43 кДа) повышает секрецию инсулина в диспергированных островковых клетках приблизительно в 1,7 раза (Фиг. 3).

В этом анализе увеличение секреции инсулина в диспергированных клетках островков крыс определяют как увеличение, по крайней мере, в 1,4 раза. Компонент пептидов настоящего изобретения, являющийся агонистом рецептора VPAC2, повышает секрецию инсулина в диспергированных островковых клетках, по крайней мере, в 1,4 - 1,7 раза.

Пример 6. Влияние ПЭГилированных пептидов на внутрибрюшинную переносимость глюкозы у крыс

Активность *in vivo* ПЭГилированных пептидов настоящего изобретения при подкожном введении исследуют на крысах. Крысам, не получавшим еды в течение ночи, делают подкожную инъекцию контрольного или ПЭГилированного пептида (1-100 мкг/кг). Три часа спустя измеряют основной уровень глюкозы в крови и крысам внутрибрюшинно вводят глюкозу в количестве 2 г/кг. Уровень глюкозы в крови сно-

ва измеряют через 15, 30 и 60 минут. Представитель ПЭГилированных пептидов настоящего изобретения значительно снижает уровни глюкозы в крови по отношению к носителю в IPGTT (внутрибрюшинное исследование переносимости глюкозы),
 5 снижение показателя AUC глюкозы (Фиг. 4) составляет 17%-28%. Это указывает на то, что пэгилированный пептид пролонгирует активность по снижению уровня глюкозы *in vivo*. В дополнение к активности ПЭГилированных пептидов настоящего изобретения по снижению уровня глюкозы, это также указывает на продление периода полураспада пептида *in vivo*. PACAP-27 имеет очень короткий период полураспада *in vivo* (<10 мин). Способность ПЭГилированных пептидов изобретения
 10 снижать уровень глюкозы в крови через 3 часа после введения пептида ясно указывает на то, что пептид присутствует в кровообращении в этот момент времени и, следовательно, имеет пролонгированный период полураспада по сравнению с PACAP-27.
 20

Пример 7. Сцинтилляционный анализ SPA циклического АМФ

Клетки СНО, экспрессирующие пептид VPAC2, вносят в 96-луночные планшеты с плотностью 8×10^4 клеток/лунку и выращивают при 37°C в течение 24 часов в среде (αMEM, нуклеозиды, глутамин (Gibco/BRL, Rockville, MD), 5% БЭС (бычья эмбриональная сыворотка), 100 мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 0,4 мг/мл гигромицин и
 25 1,5 мг/мл генетицин (Geneticin) (Gibco/BRL). Среда удаляют, и планшеты промывают PBS. Клетки инкубируют с пептидом (в 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃ (pH 7,4) с 1% БЭС и 100 мкМ IBMX (изобутилметилксантин)) 15 мин при 37°C. Содержание циклического АМФ в клеточных экстрактах определяют при использовании системы прямого сцинтилляционного скрининга цАМФ SPA (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). Количество цАМФ в лизатах определяют согласно инструкции к этому
 30 набору. Количество цАМФ (в пмоль), продуцируемого при каждой концентрации пептида наносят на график и анализируют нелинейной регрессией, используя программу Prism, для определения величины EC₅₀ для каждого пептида.
 35

Полипептиды настоящего изобретения разработаны на основе VIP, для которого показана недостаточная активность в PAC1 (Vaudry, et al., Pharmacol. Rev. 52:269-324,
 40

2000). Поэтому полагают, что полипептиды настоящего изобретения не обладают заметной активностью в PAC1.

Результаты этого анализа с представителями полипептидов настоящего изобретения приведены ниже в Таблице 1. Все пептиды, обозначенные как P5, P7, P8, P12 и P12+ПЭГ, представляют собой сильные агонисты рецептора VPAC2, они активируют рецептор на 100% максимального уровня активации рецептора, достигаемой эндогенным пептидом, PACAP-27. Кроме того, пептиды, обозначенные как P5, P7, P8, P12 и P12+ПЭГ, являются селективными агонистами рецептора VPAC2 и обладают очень слабой активностью агониста VPAC1. PACAP-27 является сильным агонистом VPAC1.

Таблица 1

Пептид	Последовательность SEQ ID NO.	VPAC2 EC ₅₀ (нМ)	VPAC1 EC ₅₀ (нМ)
PACAP-27	SEQ ID NO: 116	0,09	0,35
P5	SEQ ID NO: 1	0,33	232,5
P7	SEQ ID NO: 5	7,81	>1000
P8	SEQ ID NO: 2	0,19	130,5
P12	SEQ ID NO: 1 + Cys на С-конце	0,38	>1000
P12	плюс 22 кДа ПЭГ	1,32	>1000
P12	плюс 43 кДа ПЭГ	4,19	>1000

Пример 8. Фармацевтическая композиция - составы для внутривенного и подкожного введения

Стерильный состав для внутривенных инъекций получают из 4 мг полипептида с последовательностью SEQ ID NO: 1 или дериватизированного полипептида, эквивалентного по содержанию 4 мг полипептида, и 1л стерильного физиологического рас-

твора при использовании любого производственного процесса, известного в данной области техники. Для состава для подкожного введения можно использовать более высокие концентрации полипептида. В случае полипептида с последовательностью SEQ ID NO: 1 или дериватизированного полипептида 4 мг растворяют в 100 мл физиологического раствора или ДМСО и после стерильной фильтрации стерильные флаконы заполняют композицией.

Пример 9. Стабильность составов, включающих пептиды настоящего изобретения

Составы, описанные в Примере 8, помещают в камеру со стабильными условиями. Периодически отбирают образцы для анализа методом капиллярного электрофореза, который является самым чувствительным методом обнаружения деградации полипептида в этих составах. Суммируют площади различных пиков и площадь пика исходного полипептида делят на общую площадь пиков (Фиг. 5 и 6). Частное представляет процент чистоты. Так как в свежем полипептиде присутствуют примеси, то изменение чистоты нормализуют, деля чистоту в различные моменты времени на начальную чистоту.

Пример 10. Получение антител, специфических к пептиду и измерение пептида методом ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ)

Поликлональные антитела, специфические к полипептидам настоящего изобретения, получают, синтезируя специфический фрагмент полипептида настоящего изобретения при использовании пептидного синтезатора ABI 433A. Затем пептид отщепляют от смолы и очищают на системе ВЭЖХ Beckman System Gold Analytical and Preparative HPLC. Для идентификации нужного продукта используют масс-спектрометрическую систему Perspective MALDI. Пептид высушивают в лиофилизаторе. Затем пептид (2 мг) конъюгируют с гемоцианином моллюска Keyhole Limpet (KLH) через свободную сульфгидрильную группу на Cys.

Самок новозеландских белых кроликов иммунизируют в 0, 14, 35, 56 и 77 день. В День 0 каждому кролику подкожно вводят 250 мкг пептида и полного адъюванта Фрейнда. Для последующих иммунизаций используют 125 мкг пептида на кролика. Забор крови начинают в 21 день и продолжают далее с интервалами в 21 день. Вы-

деление антител к пептиду проводят пропусканием неочищенной сыворотки через колонку, аффинную к конкретному пептиду. Титр антител определяют в исследовании ELISA.

96-луночный планшет Immulon 4HBX покрывают С-концевым антителом Morphosys F(ab), специфическим к пептидам настоящего изобретения, и инкубируют в течение ночи при 4°C. Затем планшет блокируют для предотвращения неспецифического связывания. Затем пептидные стандарты (2500 нг/мл-160 пг/мл) разбавляют в 33% плазме и образцы разбавляют в буфере в соотношении 1:3, а затем инкубируют 1,5 часа при комнатной температуре. После промывки поликлональное N-концевое антитело, специфическое к пептидам настоящего изобретения, инкубируют в планшете в течение одного часа. Затем добавляют антитело осла к кролику, связанное с пероксидазой хрена (HRP), и образцы и стандарты инкубируют в течение часа. Детекцию проводят после инкубации с раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB), считывают оптическую плотность OD₄₅₀ (Фиг. 7).

Доказательство активности полипептидов настоящего изобретения можно осуществить в исследованиях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, хорошо известных в данной области техники. Например, для демонстрации эффективности фармацевтического агента для лечения диабета и связанных нарушений, таких как Синдром X, нарушенная переносимость глюкозы, нарушенный уровень "голодной" глюкозы и гиперинсулинемия; атеросклеротического заболевания и связанных нарушений, таких как гипертриглицеридемия и гиперхолестеринемия, и ожирения можно использовать следующие исследования.

Метод измерения уровней глюкозы в крови

У мышей db/db (полученных из лаборатории Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) отбирают кровь (из глазной или хвостовой вены) и группируют их согласно эквивалентным средним уровням глюкозы в крови. Мышам перорально вводят (через зонд в фармацевтически приемлемом носителе) исследуемый полипептид один раз в день в течение 14 дней. В этот момент времени у животных снова отбирают кровь из глазной или хвостовой вены и определяют уровни глюкозы в крови. В каждом слу-

чае уровни глюкозы измеряют глюкометром Glucometer Elite XL (Bayer Corporation, Elkhart, IN).

Метод измерения уровней триглицеридов

У мышей hApoA1 (полученных из лаборатории Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) отбирают кровь (из глазной или хвостовой вены) и группируют их согласно эквивалентным средним уровням триглицеридов в сыворотке. Мышам перорально вводят (через зонд в фармацевтически приемлемом носителе) исследуемый полипептид один раз в день в течение 8 дней. Затем у животных снова отбирают кровь из глазной или хвостовой вены и определяют уровни триглицеридов в сыворотке. В каждом случае уровни триглицеридов измеряют при помощи анализатора Technicon Axon Autoanalyzer (Bayer Corporation, Tarrytown, NY).

Метод измерения уровней ЛВП-холестерина

Для определения уровней ЛВП-холестерина в плазме у мышей hApoA1 отбирают кровь и группируют их согласно эквивалентным средним уровням ЛВП-холестерина в плазме. Мышам перорально вводят носитель или исследуемый полипептид один раз в день в течение 7 дней, и затем снова отбирают кровь на 8 день. Плазму анализируют на содержание ЛВП-холестерина при использовании клинической системы Synchron Clinical System (CX4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Метод измерения уровней общего холестерина, ЛВП-холестерина, триглицеридов и глюкозы

В другом исследовании *in vivo* у обезьян с ожирением отбирают кровь, затем перорально вводят носитель или исследуемый полипептид один раз в день в течение 4 недель, и затем снова отбирают кровь. Сыворотку анализируют на содержание общего холестерина, ЛВП-холестерина, триглицеридов и глюкозы, используя клиническую систему Synchron Clinical System (CX4) (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Анализ подклассов липопротеинов проводят спектроскопией ЯМР, как описано Oliver, et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:5306-5311, 2001).

Метод измерения влияния на сердечно-сосудистые параметры

Оценивают также сердечно-сосудистые параметры (например, частоту сердцебиений и кровяное давление). Крысам SHR перорально вводят носитель или исследуемый полипептид один раз в день в течение 2 недель. Кровяное давление и частоту сердцебиений определяют, используя метод манжеты на хвост, как описано Grinsell, et al., (Am. J. Hypertens. 13:370-375, 2000). У обезьян кровяное давление и частоту сердцебиений отслеживают, как описано Shen, et al., (J. Pharmacol. Exp. Therap. 278:1435-1443, 1996).

Оценка эффективности соединения при снижении потребления еды (подавлении аппетита) у худых крыс, голодавших в течение ночи**Острый опыт "голодание-кормление"**

Целью этого исследования является определение влияния однократной дозы неизвестного соединения на потребление пищи худыми голодными в течение ночи крысами. Модель "голодание-кормление" на крысах часто используется в области ожирения для идентификации соединений с потенциалом анорексического воздействия. Эта модель на животных успешно использовалась для идентификации и характеристики профиля эффективности соединений, которые используются или использовались в управлении весом тела страдающих ожирением людей (см., например, Balvet, et al., Gen. Pharmacol. 13:293-297, 1982; Grignaschi, et al., Br. J. Pharmacol. 127:1190-1194, 1999; McTavish and Heel, Drug 43:713-733, 1992; Rowland, et al., Life Sci. 36:2295-2300, 1985).

Типичное исследование включает 60-80 самцов крыс (n=10/группу обработки) со средним весом тела приблизительно 280 г. Крыс содержат в стандартных вивариях с управляемой температурой и влажностью и циклом "свет-темнота" 12/12. Крыс содержат по одной в подвешенных клетках с сетчатым дном. Вода и пища доступны все время, за исключением периодов голода для исследования.

Исследование носителя: Крыс группируют согласно их поведению при исследовании носителя. Испытание носителя проводят между 2 и 7 днями перед исследованием. Крыс выдерживают голодными в течение ночи в течение темной фазы (общее время - приблизительно 16-18 часов). Животным вводят 0,5 мл деионизованной во-

ды. Спустя один час после введения в клетки возвращают предварительно взвешенные кормушки с пищей. Крысам позволяют кормиться в течение одного часа. Через час в кормушки возвращают просыпавшуюся пищу и определяют количество погл

5 поглощенной пищи. Крысы делят на группы таким образом, чтобы среднее значение и стандартная ошибка среднего значения 1-часового потребления пищи были сходны между группами.

10 Исследование эффективности: Крыс выдерживают голодными в течение ночи в течение темной фазы (общее время - приблизительно 16-18 часов). Животным вводят назначенную дозу полипептида. Спустя один час после введения в клетки возвращают предварительно взвешенные кормушки с пищей. Поглощение пищи записы

15 вают через 30, 60, 90, 180 и 240 минут после возвращения пищи. В каждый момент времени в кормушку возвращают просыпавшуюся пищу и затем кормушки взвешивают. В каждый момент времени определяют количество потребленной пищи. Разность между группами, получающими лечение, определяют, используя соответствующий статистический анализ.

25 **Оценка эффективности соединения при снижении веса тела и потребления пищи и воды у страдающих ожирением крыс Zucker fa/fa**

30 Исследование постоянного кормления

Целью этого исследования является определение эффекта постоянного введения неизвестного соединения на вес тела и потребление пищи и воды у страдающих ожирением крыс Zucker fa/fa. Страдающих ожирением крыс Zucker fa/fa часто используют для определения эффективности соединений для снижения веса тела. Эта жи

35 вотная модель успешно использовалась для идентификации и исследования профиля эффективности соединений, которые используются или использовались в управлении весом тела у страдающих ожирением людей (см., например, Al-Barazanji, et al., Obes Res. 8:317-323, 2000; Assimacopoulos-Jeannet, et al., Am. J. Physiol. 260(2 Pt 2):R278-283, 1991; Dryden, et al., Horm. Metab. Res. 31:363-366, 1999; Edwards and Stevens, Pharmacol. Biochem. Behav. 47:865-872, 1994; Grinker, et al., Pharmacol. Biochem. Behav. 12:265-275, 1980).

40

45

Стандартное исследование включает 60-80 самцов Zucker fa/fa ($n=10$ /группу обработки) со средним весом тела приблизительно 550 г. Крыс содержат в стандартных вивариях с управляемой температурой и влажностью и циклом "свет-темнота" 12/12. Вода и пища доступны постоянно. Крыс содержат по одной в контейнерах типа обувных коробок с сетчатым дном. Животных адаптируют к сетчатому дну и дают ложные дозы, используя растворитель для исследования, в течение, по крайней мере, 4 дней до регистрации двухдневного базового измерения массы тела и 24-часового потребления пищи и воды. Крыс определяют в одну из 6-8 групп обработки на основании их массы тела при базовом измерении. Группы формируют так, чтобы средняя и стандартная ошибка средней массы тела были одинаковы.

Животным перорально через зонд ежедневно перед темной фазой цикла "свет-темнота" в течение определенного числа дней (обычно 6-14 дней) вводят назначенную дозу полипептида. В это время измеряют вес тела, потребление пищи и воды. В последний день животных умерщвляют ингаляцией CO_2 и измеряют вес тела.

Эффективность полипептидов настоящего изобретения по снижению или контролю веса тела можно определить в этом исследовании постоянного кормления.

Все публикации и патенты, упомянутые в описанном выше описании, включены в нее посредством ссылки. Специалистам в данной области техники будут очевидны различные модификации и вариации описанных композиций и способов изобретения, не выходящие за рамки и сущность изобретения. Несмотря на то, что изобретение было описано со специфическими предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что изобретение, как оно заявлено, не ограничивается этими конкретными способами осуществления. Действительно, предполагается, что различные модификации описанных выше вариантов осуществления изобретения, очевидные специалистам в области молекулярной биологии или смежных областей, находятся в пределах нижеследующей формулы изобретения. Специалистам в данной области техники будут понятны или могут быть установлены в ходе рутинных экспериментов множество эквивалентов специфических вариантов осуществления изобретения, описанных здесь. Такие эквиваленты следует рассматривать как охватываемые нижеследующей формулой изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Bayer Pharmaceuticals Corporation
 FROLAND, Wayne
 5 KELNER, Drew
 DUMAS, Michael
 PAN, Clark
 WHELAN, James
 WANG, John
 WANG, Wei

10 <120> АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА (VPAC2) ГИПОФИЗАРНОГО ПЕПТИДА, АКТИВИРУЮЩЕГО
 АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ (РАСАР), И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ.

<130> MSB-7295

15 <150> US 60/395,738
 <151> 2002-07-12

<160> 264

20 <170> PatentIn version 3.2

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

25 <400> 1

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

30 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 2
 <211> 31
 35 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (1)..(31)
 <223> Ас означает ацетил

<400> 2

45 Ac-His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

50 <210> 3
 <211> 31
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens
 <400> 3
 5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30
 10
 <210> 4
 <211> 29
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 4
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 20 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys
 20 25
 25 <210> 5
 <211> 31
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 30 His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30
 35 <210> 6
 <211> 31
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 6
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 45 Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr
 20 25 30
 50 <210> 7
 <211> 30
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 8
<211> 31
<212> БЕЖОК
<213> Homo sapiens

<400> 8

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 9
<211> 31
<212> БЕЖОК
<213> Homo sapiens

<400> 9

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 10
<211> 31
<212> БЕЖОК
<213> Homo sapiens

<400> 10

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 11
<211> 31
<212> БЕЖОК
<213> Homo sapiens

<400> 11

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

5
<210> 12
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 12

10
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

15
Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

20
<210> 13
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 13

25
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

30
Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

35
<210> 14
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 14

40
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

45
Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

50
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

55
Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5 <400> 16

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg
 20 25 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15 <400> 17

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

20 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Gln Lys Arg
 20 25 30

25 <210> 18
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

30 <400> 18

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

35 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Lys Arg
 20 25 30

40 <210> 19
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

45 <400> 19

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg
 20 25 30

50 <210> 20
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 5
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala
 20 25 30
 <210> 21
 <211> 30
 <212> БЕЛЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 15
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe
 20 25 30
 20
 <210> 22
 <211> 30
 <212> БЕЛЖОК
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 22
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 30
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His
 20 25 30
 <210> 23
 <211> 30
 <212> БЕЛЖОК
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 23
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 40
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile
 20 25 30
 45
 <210> 24
 <211> 30
 <212> БЕЛЖОК
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 24
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys
20 25 30

5

<210> 25
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

10

<400> 25

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu
20 25 30

20

<210> 26
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 26

25

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met
20 25 30

30

<210> 27
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

35

<400> 27

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

40

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro
20 25 30

45

<210> 28
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 28

50

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln
20 25 30

<210> 29
 <211> 30
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 29
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser
 20 25 30
 <210> 30
 <211> 30
 15 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 20 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr
 20 25 30
 25 <210> 31
 <211> 30
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 31
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 35 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val
 20 25 30
 <210> 32
 <211> 30
 40 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 45 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp
 20 25 30
 50 <210> 33
 <211> 30

<212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 33

5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr
 20 25 30

10

<210> 34
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15

<400> 34

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

20

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 35
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

25

<400> 35

30 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30

35

<210> 36
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

40

<400> 36

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

45

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

50

<400> 37

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

5 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 38
<211> 30
<212> БЕЛОК
10 <213> Homo sapiens

<400> 38

15 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile
20 25 30

20 <210> 39
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 39

25 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

30 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 40
<211> 31
<212> БЕЛОК
35 <213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
40 <223> Ac is acetyl

<400> 40

45 Ac-His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

50 <210> 41
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 41

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

5

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 42

10

<211> 29

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 42

15

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys
 20 25

20

<210> 43

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

25

<400> 43

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

30

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 44

35

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 44

40

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr
 20 25 30

45

<210> 45

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 45

50

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
20 25 30

5
<210> 46
<211> 31
<212> БЕЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 46

10
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

15
<210> 47
<211> 31
<212> БЕЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 47

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

25
Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

30
<210> 48
<211> 31
<212> БЕЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 48

35
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

40
<210> 49
<211> 31
<212> БЕЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 49

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

50
Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 50
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5

<400> 50

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
 20 25 30

15

<210> 51
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 51

20

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
 20 25 30

25

<210> 52
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

30

<400> 52

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

35

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
 20 25 30

40

<210> 53
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 53

45

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg
 20 25 30

50

<210> 54
 <211> 30

<212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg
 20 25 30
 10
 <210> 55
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 55
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 20 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Gln Lys Arg
 20 25 30
 <210> 56
 <211> 30
 25 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 30 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Lys Arg
 20 25 30
 35
 <210> 57
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 57
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 45 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg
 20 25 30
 <210> 58
 <211> 30
 50 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

5 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala
 20 25 30

<210> 59
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 59

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

15 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe
 20 25 30

20 <210> 60
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 60

25 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

30 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His
 20 25 30

35 <210> 61
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 61

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

40 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile
 20 25 30

45 <210> 62
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 62

50 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys
20 25 30

5
<210> 63
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 63

10
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu
20 25 30

15

<210> 64
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 64

20
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

25
Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met
20 25 30

30
<210> 65
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 65

35
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro
20 25 30

40

<210> 66
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 66

45
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

50
Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln
20 25 30

<210> 67
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 67
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser
 20 25 30
 <210> 68
 <211> 30
 15 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 20 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr
 20 25 30
 25 <210> 69
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 69
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 35 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val
 20 25 30
 <210> 70
 <211> 30
 40 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 45 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp
 20 25 30
 50 <210> 71
 <211> 30
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens
 <400> 71
 5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr
 20 25 30
 10
 <210> 72
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 72
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 20 Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30
 25 <210> 73
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 30 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30
 35 <210> 74
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 74
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 45 Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile
 20 25 30
 50 <210> 75
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 75

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

5 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile
20 25 30

<210> 76
<211> 30
<212> БЕЛОК
10 <213> Homo sapiens

<400> 76

15 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile
20 25 30

20 <210> 77
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 77

25 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

30 Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

<210> 78
<211> 31
<212> БЕЛОК
35 <213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(31)
40 <223> Ас означает ацетил

<400> 78

45 Ac-His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
20 25 30

50 <210> 79
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 79

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

5

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 80

10

<211> 29

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 80

15

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys
 20 25

20

<210> 81

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

25

<400> 81

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

30

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 82

35

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 82

40

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Asn Gly Gly Thr
 20 25 30

45

<210> 83

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

50

<400> 83

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

5
 <210> 84
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 84

10
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

15
 <210> 85
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 85

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

25
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

30
 <210> 86
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 86

35
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

40
 <210> 87
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 87

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

50
 Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg Tyr
 20 25 30

<210> 88
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5 <400> 88

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10 Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 89
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15 <400> 89

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

20 Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

25 <210> 90
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

30 <400> 90

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

35 Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

<210> 91
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

40 <400> 91

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

45 Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Arg
 20 25 30

50 <210> 92
 <211> 30

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 92

5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Asn Lys Arg
20 25 30

10

<210> 93
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

15

<400> 93

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

20

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Asn Lys Arg
20 25 30

<210> 94
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

25

<400> 94

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

30

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Asn Lys Arg
20 25 30

35

<210> 95
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

40

<400> 95

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

45

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Arg
20 25 30

<210> 96
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

50

<400> 96

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

5 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ala
20 25 30

<210> 97
<211> 30
<212> БЕЛОК
10 <213> Homo sapiens

<400> 97

15 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Phe
20 25 30

20 <210> 98
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 98

25 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

30 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys His
20 25 30

<210> 99
<211> 30
<212> БЕЛОК
35 <213> Homo sapiens

<400> 99

40 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ile
20 25 30

45 <210> 100
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 100

50 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Lys
20 25 30

5
<210> 101
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 101

10 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Leu
20 25 30

15
<210> 102
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 102

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

25 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Met
20 25 30

30
<210> 103
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 103

35 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Pro
20 25 30

40
<210> 104
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 104

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

50 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Gln
20 25 30

<210> 105
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5 <400> 105

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Ser
 20 25 30

15 <210> 106
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 106

20 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Thr
 20 25 30

25 <210> 107
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

30 <400> 107

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

35 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Val
 20 25 30

40 <210> 108
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 108

45 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Trp
 20 25 30

50 <210> 109
 <211> 30
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens
 <400> 109
 5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Lys Tyr
 20 25 30
 10
 <210> 110
 <211> 30
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 110
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 20 Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30
 25 <210> 111
 <211> 30
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 30 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30
 35 <210> 112
 <211> 30
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 112
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15
 45 Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Asn Arg Ile
 20 25 30
 50 <210> 113
 <211> 30
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 113

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 114
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 114

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Asn Arg Ile
 20 25 30

<210> 115
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль (ПЭГ)

<400> 115

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

<210> 116
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> Ас означает ацетил; PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 116

Ac-His Thr Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

<210> 117
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

10

<400> 117

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

20

<210> 118
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(30)
 <223> PEG is означает полиэтиленгликоль

<400> 118

30

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Cys-PEG
 20 25 30

35

<210> 119
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

45

<400> 119

His Thr Glu Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

50

Val Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

<210> 120
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

10

<400> 120

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Lys Gln Gly Gly Thr Cys-PEG
 20 25 30

20

<210> 121
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 121

30

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys-PEG
 20 25 30

35

<210> 122
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 122

45

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

50

Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

<210> 123

<211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 123

10 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

15 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

20 <210> 124
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 124

30 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala His Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

35 <210> 125
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(32)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 125

45 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys His Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Tyr Cys-PEG
 20 25 30

50 <210> 126
 <211> 31

<212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 126

5

10

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys-PEG
 20 25 30

15

<210> 127
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

25

<400> 127

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

30

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys-PEG
 20 25 30

<210> 128
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

40

<400> 128

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

45

Met Ala Arg Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys-PEG
 20 25 30

50

<210> 129
 <211> 31
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 129

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Arg Cys-PEG
20 25 30

<210> 130

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 130

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Lys Arg Cys-PEG
20 25 30

<210> 131

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 131

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Gln Gln Lys Arg Cys-PEG
20 25 30

<210> 132

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

5 <400> 132

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Lys Arg Cys-PEG
 20 25 30

<210> 133
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

20

<400> 133

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

25

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Arg Cys-PEG
 20 25 30

30

<210> 134
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

40

<400> 134

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

45

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ala Cys-PEG
 20 25 30

<210> 135
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

5 <400> 135

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Phe Cys-PEG
 20 25 30

<210> 136
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

20

<400> 136

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

25

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys His Cys-PEG
 20 25 30

30

<210> 137
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

40

<400> 137

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

45

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ile Cys-PEG
 20 25 30

<210> 138
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

5 <400> 138

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10 Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Lys Cys-PEG
 20 25 30

<210> 139
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

20

<400> 139

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

25

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Leu Cys-PEG
 20 25 30

30

<210> 140
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

40

<400> 140

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

45

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Met Cys-PEG
 20 25 30

<210> 141
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

50

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 141

5

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

10

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Pro Cys-PEG
 20 25 30

15

<210> 142
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 142

25

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Gln Cys-PEG
 20 25 30

30

<210> 143
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 143

40

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Ser Cys-PEG
 20 25 30

45

<210> 144
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 144

5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Thr Cys-PEG
 20 25 30

10

<210> 145
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

20

<400> 145

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

25

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Val Cys-PEG
 20 25 30

<210> 146
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

35

<400> 146

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

40

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Trp Cys-PEG
 20 25 30

45

<210> 147
 <211> 31
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 147

5 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Lys Tyr Cys-PEG
20 25 30

10

<210> 148

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

20

<400> 148

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

25

Met Ala Gly Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile Cys-PEG
20 25 30

30

<210> 149

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 149

40

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Lys Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile Cys-PEG
20 25 30

45

<210> 150

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

50

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 150

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

5

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Lys Gln Arg Ile Cys-PEG
 20 25 30

<210> 151

10

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

15

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 151

20

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Pro Gln Arg Ile Cys-PEG
 20 25 30

25

<210> 152

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (31)

<223> PEG означает полиэтиленгликоль

35

<400> 152

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

40

Met Ala Ser Lys Lys Tyr Leu Gln Ser Ile Arg Gln Arg Ile Cys-PEG
 20 25 30

<210> 153

45

<211> 123

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 153

ggatccatcg aaggctcgta ctccgacgct gttttcaccg accagtacac gcgtctgcgt 60

50

aaacaggttg ctgcaaagaa atacctgcag tccatcaagc agaagcggtta ctaatgactc 120

gag 123

	<210> 154		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 154		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93	
10	<210> 155		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 155		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93	
20	<210> 156		
	<211> 87		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 156		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaag	87	
30	<210> 157		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 157		
	cacaccgaag ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93	
40	<210> 158		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 158		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagct ggctgttaag	60	
	aaatacctgc aggacatcaa gcagggcggt acc	93	
50	<210> 159		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 159		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	

	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt	90
	<210> 160	
	<211> 93	
5	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 160	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagct ggctgcaaag	60
10	aaatacctgc agaccatcaa gcagaagcgt tac	93
	<210> 161	
	<211> 93	
	<212> ДНК	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 161	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
20	aaatacctgc agaccatcaa gcagaagcgt tac	93
	<210> 162	
	<211> 93	
	<212> ДНК	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 162	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcacac	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93
30	<210> 163	
	<211> 93	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 163	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	cactacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93
40	<210> 164	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 164	
45	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctggcaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt	90
	<210> 165	
	<211> 90	
50	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 165		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctaaaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt	90	
5	<210> 166		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 166		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctcgtaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt	90	
15	<210> 167		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 167		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt	90	
25	<210> 168		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 168		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatccc ccagaagcgt	90	
35	<210> 169		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 169		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcca gcagaagcgt	90	
45	<210> 170		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 170		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatccg tcagaagcgt	90	
55	<210> 171		
	<211> 90		
	<212> ДНК		

<213> Homo sapiens
 <400> 171
 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 5 aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtcgt 90
 <210> 172
 <211> 90
 <212> ДНК
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 172
 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 15 aaatacctgc agtccatcaa gcagaaggca 90
 <210> 173
 <211> 90
 <212> ДНК
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 173
 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 25 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagttc 90
 <210> 174
 <211> 90
 <212> ДНК
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 174
 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 35 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcac 90
 <210> 175
 <211> 90
 <212> ДНК
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 175
 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 45 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagatc 90
 <210> 176
 <211> 90
 <212> ДНК
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 176
 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 50 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagaag 90

	<210>	177		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
5	<400>	177		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgaccagtac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagctg	90
10	<210>	178		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
15	<400>	178		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgaccagtac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagatg	90
20	<210>	179		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
25	<400>	179		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgaccagtac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagccc	90
30	<210>	180		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
35	<400>	180		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgaccagtac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagcag	90
40	<210>	181		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
45	<400>	181		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgaccagtac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagtcc	90
50	<210>	182		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
50	<400>	182		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgaccagtac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagacc	90

	<210> 183		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 183		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagggt	90	
10	<210> 184		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 184		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagtgg	90	
20	<210> 185		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 185		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagtac	90	
30	<210> 186		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 186		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctggtaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtatc	90	
40	<210> 187		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 187		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctaaaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtatc	90	
50	<210> 188		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 188		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60	

	aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtatc	90
5	<210> 189 <211> 90 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
	<400> 189 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
10	aaatacctgc agtccatccc ccagcgtatc	90
15	<210> 190 <211> 90 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
	<400> 190 cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60
20	aaatacctgc agtccatccg tcagcgtatc	90
25	<210> 191 <211> 93 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
	<400> 191 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60
30	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93
35	<210> 192 <211> 93 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
	<400> 192 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
40	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93
45	<210> 193 <211> 87 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
	<400> 193 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60
50	aaatacctgc agtccatcaa gcagaag	87
	<210> 194 <211> 93 <212> ДНК <213> Homo sapiens	

	<400> 194		
	cacaccgaag ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93	
5	<210> 195		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 195		
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagct ggctgttaag	60	
	aaatacctgc aggacatcaa gcagggcggt acc	93	
15	<210> 196		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 196		
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt	90	
25	<210> 197		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 197		
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagct ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agaccatcaa gcagaagcgt tac	93	
35	<210> 198		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 198		
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agaccatcaa gcagaagcgt tac	93	
45	<210> 199		
	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 199		
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcacac	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac	93	
50	<210> 200		
	<211> 93		
	<212> ДНК		

<213> Homo sapiens
 <400> 200
 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 5 cactacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac 93
 <210> 201
 <211> 93
 <212> ДНК
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 201
 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 cactacctgc agtccatcaa gcagaagcgt tac 93
 15 <210> 202
 <211> 90
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 202
 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctaaaaag 60
 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt 90
 25 <210> 203
 <211> 90
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 203
 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctcgtaag 60
 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt 90
 35 <210> 204
 <211> 90
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 204
 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag 60
 aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcgt 90
 45 <210> 205
 <211> 90
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 205
 cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
 aaatacctgc agtccatccc ccagaagcgt 90
 <210> 206

	<211>	90	
	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	206	
5	cactccgacg	ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc	agtccatcca gcagaagcgt	90
	<210>	207	
10	<211>	90	
	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	207	
15	cactccgacg	ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc	agtccatccg tcagaagcgt	90
	<210>	208	
20	<211>	90	
	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	208	
25	cactccgacg	ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc	agtccatcaa gcagcgtcgt	90
	<210>	209	
30	<211>	90	
	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	209	
35	cactccgacg	ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc	agtccatcaa gcagaaggca	90
	<210>	210	
40	<211>	90	
	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	210	
45	cactccgacg	ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc	agtccatcaa gcagaagttc	90
	<210>	211	
50	<211>	90	
	<212>	ДНК	
	<213>	Homo sapiens	
	<400>	211	
50	cactccgacg	ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc	agtccatcaa gcagaagcac	90

	<210>	212		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
5	<400>	212		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgacaactac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagatc	90
10	<210>	213		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
15	<400>	213		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgacaactac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagaag	90
20	<210>	214		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
25	<400>	214		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgacaactac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagctg	90
30	<210>	215		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
35	<400>	215		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgacaactac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagatg	90
40	<210>	216		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
45	<400>	216		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgacaactac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60
	aaatacctgc	agtccatcaa	gcagaagccc	90
50	<210>	217		
	<211>	90		
	<212>	ДНК		
	<213>	Homo sapiens		
50	<400>	217		
	cactccgacg	ctgtttttcac	cgacaactac	acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag 60

	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagcag	90
	<210> 218	
	<211> 90	
5	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 218	
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
10	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagtcc	90
	<210> 219	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 219	
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagacc	90
20		
	<210> 220	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 220	
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaaggtt	90
30		
	<210> 221	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 221	
	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagtgg	90
40		
	<210> 222	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 222	
45	cactccgacg ctgtttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagaagtac	90
50		
	<210> 223	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 223	

	cactccgacg ctgttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctggtaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtatc	90
5	<210> 224 <211> 90 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
10	<400> 224 cactccgacg ctgttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctaaaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtatc	90
15	<210> 225 <211> 90 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
20	<400> 225 cactccgacg ctgttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gcagcgtatc	90
25	<210> 226 <211> 90 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
30	<400> 226 cactccgacg ctgttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatccc ccagcgtatc	90
35	<210> 227 <211> 90 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
40	<400> 227 cactccgacg ctgttttcac cgacaactac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60
	aaatacctgc agtccatccg tcagcgtatc	90
45	<210> 228 <211> 93 <212> ДНК <213> Homo sapiens	
50	<400> 228 cactccgacg ctgttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt tac	93
50	<210> 229 <211> 93 <212> ДНК <213> Homo sapiens	

	<400> 229	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt tac	93
5	<210> 230	
	<211> 87	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 230	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaag	87
15	<210> 231	
	<211> 93	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 231	
	cacaccgaag ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacaggt tgctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt tac	93
25	<210> 232	
	<211> 93	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 232	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagct ggctgttaag	60
	aaatacctgc aggacatcaa gaacggcggt acc	93
35	<210> 233	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 233	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt	90
45	<210> 234	
	<211> 93	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 234	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagct ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agaccatcaa gaacaagcgt tac	93
	<210> 235	
	<211> 93	

	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 235		
5	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agaccatcaa gaacaagcgt tac	93	
	<210> 236		
10	<211> 93		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 236		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcacac	60	
15	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt tac	93	
	<210> 237		
	<211> 93		
20	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 237		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
25	cactacctgc agtccatcaa gaacaagcgt tac	93	
	<210> 238		
	<211> 90		
30	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 238		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctggcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt	90	
35	<210> 239		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 239		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctaaaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt	90	
45	<210> 240		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 240		
50	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctcgtaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt	90	

	<210> 241		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 241		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcgt	90	
10	<210> 242		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 242		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatccc caacaagcgt	90	
20	<210> 243		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 243		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcca gaacaagcgt	90	
30	<210> 244		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 244		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatccg taacaagcgt	90	
40	<210> 245		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 245		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaaccgtcgt	90	
50	<210> 246		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 246		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaaggca	90	

	<210> 247		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 247		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagttc	90	
10	<210> 248		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 248		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcac	90	
20	<210> 249		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 249		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagatc	90	
30	<210> 250		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 250		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagaag	90	
40	<210> 251		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 251		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagctg	90	
50	<210> 252		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 252		
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	

	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagatg	90
	<210> 253	
	<211> 90	
5	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 253	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
10	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagccc	90
	<210> 254	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 254	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagcag	90
20	<210> 255	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 255	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagtcc	90
30	<210> 256	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 256	
35	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagacc	90
40	<210> 257	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 257	
	cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60
45	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagggt	90
	<210> 258	
	<211> 90	
	<212> ДНК	
50	<213> Homo sapiens	

	<400> 258		
	cactccgacg ctgttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagtgg	90	
5	<210> 259		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 259		
	cactccgacg ctgttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaacaagtac	90	
15	<210> 260		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 260		
	cactccgacg ctgttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctggtaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaaccgtatc	90	
25	<210> 261		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 261		
	cactccgacg ctgttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctaaaaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaaccgtatc	90	
35	<210> 262		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 262		
	cactccgacg ctgttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60	
	aaatacctgc agtccatcaa gaaccgtatc	90	
45	<210> 263		
	<211> 90		
	<212> ДНК		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 263		
	cactccgacg ctgttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag	60	
	aaatacctgc agtccatccc caaccgtatc	90	
50	<210> 264		
	<211> 90		
	<212> ДНК		

<213> Homo sapiens

<400> 264

cactccgacg ctgtttttcac cgaccagtag acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag 60

5 aaatacctgc agtccatccg taaccgtatc 90

Формула изобретения

1. Полипептид с активностью агониста рецептора VPAC2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбираемой из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 и 5.
2. Полинуклеотид, кодирующий полипептид с активностью агониста рецептора VPAC2 и характеризующийся нуклеотидной последовательностью, определяющей полипептид по п.1.
3. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.2.
4. Клетка-хозяин, продуцирующая полипептид с активностью агониста рецептора VPAC2, которая содержит вектор экспрессии по п.3.
5. Способ получения полипептида с активностью агониста рецептора VPAC2, включающий:
 - а) культивирование клетки-хозяина по п.4 в условиях, подходящих для экспрессии указанного полипептида; и
 - б) выделение полипептида из культуры клетки-хозяина.
6. Производное полипептида, имеющего активность агониста рецептора VPAC2, представляющее собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 и 5, где С-конец указанного полипептида связан с ПЭГ через дополнительный цистеин.
7. Фармацевтическая композиция с активностью агониста рецептора VPAC2, содержащая терапевтически эффективное количество полипептида по п.1 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.
8. Фармацевтическая композиция с активностью агониста рецептора VPAC2, содержащая терапевтически эффективное количество полипептида по п.6 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.
9. Фармацевтическая композиция по п.7 или 8, которая включает от около 2% до около 30% ДМСО и, при необходимости, растворитель, выбираемый из группы, состоящей из пропиленгликоля, диметилформамида, пропиленкарбоната, полиэтиленгликоля и триглицеридов.
10. Фармацевтическая композиция для лечения заболеваний и состояний, которые могут быть облегчены посредством агентов, обладающих активностью агониста рецептора VPAC2, содержащая терапевтически эффективное количество полипептида по п.1 или 6 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем и дополнительно одним или более фармацевтическими агентами, выбранными из группы, состоящей из агонистов PPAR, препаратов сульфонилмочевины, стимуляторов секреции, не являющихся препаратами сульфонилмочевины, ингибиторов альфа-глюкозидазы, инсулиновых сенситизаторов, стимуляторов секреции инсулина, соединений, снижающих выход глюкозы печени, инсулина, агентов против ожирения, ингибиторов HMG CoA редуктазы, никотиновой кислоты, веществ, усиливающих экскрецию (секвестрантов) желчной кислоты, производных фибровой кислоты и агентов против гипертонии.
11. Применение полипептида по п.1 или 6 для лечения заболеваний, связанных с

пониженной секрецией инсулина, предусматривающее введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида по п.1 или 6.

12. Применение полипептида по п.1 или 6 для лечения диабета 2 типа, предусматривающее введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида по п.1 или 6.

13. Применение полипептида по п.1 или 6 для лечения нарушенной переносимости глюкозы, предусматривающее введение нуждающемуся в этом субъекту полипептида по п.1 или 6.

14. Способ стимулирования высвобождения инсулина глюкозозависимым способом у нуждающегося в этом субъекта путем введения этому субъекту полипептида по п.1 или 6.

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
1	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLSIKQKRY
2	AC-HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLSIKQKRY
3	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKRY
4	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLSIKQK
5	HTEAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLSIKQKRY
6	HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLDIKQGGT
7	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKR
8	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLSIKQKRY
9	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKRY
10	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKYLSIKQKRY
11	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLSIKQKRY
12	HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLSIKQKR
13	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLSIKQKR
14	HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLSIKQKR
15	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIKQKR
16	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIPQKR
17	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIQQKR
18	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIRQKR
19	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQRR
20	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKA
21	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKF
22	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKH
23	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKI
24	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKK
25	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKL
26	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKM
27	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKP
28	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKQ
29	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKS
30	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKT
31	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKV
32	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKW
33	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKQKY
34	HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLSIKQRI
35	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLSIKQRI
36	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIKQRI
37	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIPQRI
38	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIRQRI

Фиг. 1a

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
39	HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
40	Ac-HTDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
41	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKRY
42	HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQK
43	HTEAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
44	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLDIKQGGT
45	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKR
46	HSDAVFTDNYTRLRKQLAACKYLQTIKQKRY
47	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQTIKQKRY
48	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHKYLQSIKQKRY
49	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLQSIKQKRY
50	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLQSIKQKR
51	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQKR
52	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLQSIKQKR
53	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIKQKR
54	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKR
55	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIQKKR
56	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKR
57	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQRR
58	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKA
59	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKF
60	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKH
61	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKI
62	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKK
63	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKL
64	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKM
65	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKP
66	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKQ
67	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKS
68	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKT
69	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKV
70	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKW
71	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKY
72	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLQSIKQRI
73	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLQSIKQRI
74	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIKQRI
75	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQRI
76	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIKQRI

Фиг. 1b

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
77	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRY
78	Ac-HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRY
79	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKRY
80	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKNK
81	HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRY
82	HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLQDIKNGGT
83	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKR
84	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLQTIKNKRY
85	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQTIKNKRY
86	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKRY
87	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKRY
88	HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLQSIKNKR
89	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLQSIKNKR
90	HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLQSIKNKR
91	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLQSIKNKR
92	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKR
93	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKR
94	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKR
95	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKR
96	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKA
97	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKF
98	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKH
99	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKI
100	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKK
101	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKL
102	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKM
103	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKP
104	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKQ
105	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKS
106	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKT
107	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKV
108	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKW
109	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKY
110	HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLQSIKNRI
111	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLQSIKNRI
112	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLQSIKNRI
113	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQSIKNRI
114	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKKYLQSIKNRI

Фиг. 1с

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
115	HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQKRYC-PEG
116	Ac-HTDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQKRYC-PEG
117	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKRYC-PEG
118	HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQKRC-PEG
119	HTEAVFTDQYTRLRKQVAACKYLSIKQKRYC-PEG
120	HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLDIKQGGTC-PEG
121	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKRC-PEG
122	HSDAVFTDQYTRLRKQLAACKYLQTIKQKRYC-PEG
123	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQTIKQKRYC-PEG
124	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKYLQSIKQKRYC-PEG
125	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLSIKQKRYC-PEG
126	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLSIKQKRC-PEG
127	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLSIKQKRC-PEG
128	HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLSIKQKRC-PEG
129	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIKQKRC-PEG
130	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIQKRC-PEG
131	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIQKRC-PEG
132	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIRQKRC-PEG
133	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQRRRC-PEG
134	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKAC-PEG
135	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKFC-PEG
136	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKHC-PEG
137	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKIC-PEG
138	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKCC-PEG
139	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKLC-PEG
140	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKMC-PEG
141	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKPC-PEG
142	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKQC-PEG
143	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKSC-PEG
144	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKTC-PEG
145	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKVC-PEG
146	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKWC-PEG
147	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIKQKYC-PEG
148	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLSIKQRIC-PEG
149	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLSIKQRIC-PEG
150	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIKQRIC-PEG
151	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLSIQPRIC-PEG
152	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLSIRQRIC-PEG

Фиг. 1d

BamHI **Фактор Ха**
GGATCC ATC GAA GGT CGT CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC cag TAC
ACG CGT CTG CGT AAA CAG gtt GCT gca AAG AAA TAC CTG cag TCC ATC aag
cag aag cgt tac TAA TGA CTCGAG (SEQ ID NO: 153)
стоп-кодона XhoI

Фиг. 2

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
154	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
155	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
156	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG
157	CAC ACC GAA GCT GTT TTC ACC GAC CAG TACACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
158	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG CTG GCT GTT AAG AAA TAC CTG CAG GAC ATC AAG CAG GGC GGT ACC
159	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
160	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG CTG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG ACC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
161	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG ACC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
162	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA CAC AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
163	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG CAC TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
164	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GGC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
165	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT AAA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
166	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT CGT AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
167	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT

Фиг. 3а

168	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CCC CAG AAG CGT
169	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CAG CAG AAG CGT
170	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CGT CAG AAG CGT
171	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT CGT
172	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG GCA
173	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TTC
174	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CAC
175	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG ATC
176	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG AAG
177	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CTG
178	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG ATG
179	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CCC
180	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CAG
181	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TCC

Фиг. 3b

182	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG ACC
183	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG GTT
184	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TGG
185	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TAC
186	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GGT AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT ATC
187	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT AAA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT ATC
188	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT ATC
189	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CCC CAG CGT ATC
190	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CGT CAG CGT ATC
191	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
192	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
193	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG
194	CAC ACC GAA GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
195	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG CTG GCT GTT AAG AAA TAC CTG CAG GAC ATC AAG CAG GGC GGT ACC

Фиг. 3с

196	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
197	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG CTG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG ACC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
198	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG ACC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
199	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA CAC AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
200	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG CAC TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT TAC
201	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GGC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
202	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT AAA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
203	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT CGT AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
204	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CGT
205	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CCC CAG AAG CGT
206	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CAG CAG AAG CGT
207	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CGT CAG AAG CGT
208	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT CGT
209	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG GCA

Фиг. 3d

210	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TTC
211	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CAC
212	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG ATC
213	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG AAG
214	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CTG
215	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG ATG
216	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CCC
217	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG CAG
218	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TCC
219	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG ACC
220	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG GTT
221	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TGG
222	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG AAG TAC
223	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GGT AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT ATC

Фиг. 3е

224	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT AAA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT ATC
225	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG CAG CGT ATC
226	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CCC CAG CGT ATC
227	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC AAC TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CGT CAG CGT ATC
228	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT TAC
229	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT TAC
230	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG
231	CAC ACC GAA GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG GTT GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT TAC
232	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG CTG GCT GTT AAG AAA TAC CTG CAG GAC ATC AAG AAC GGC GGT ACC
233	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT
234	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG CTG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG ACC ATC AAG AAC AAG CGT TAC
235	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG ACC ATC AAG AAC AAG CGT TAC
236	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA CAC AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT TAC
237	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG CAC TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT TAC

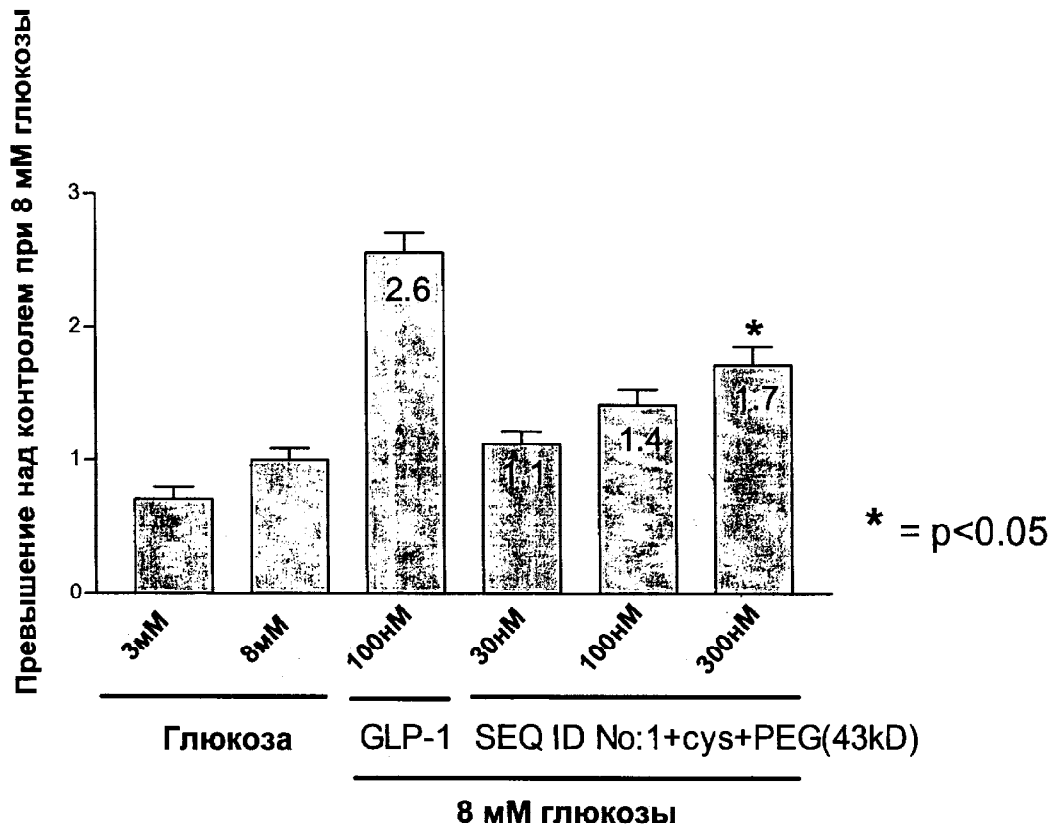
Фиг. 3f

238	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GGC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT
239	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT AAA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT
240	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT CGT AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT
241	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CGT
242	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CCC AAC AAG CGT
243	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CAG AAC AAG CGT
244	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CGT AAC AAG CGT
245	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC CGT CGT
246	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG GCA
247	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG TTC
248	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CAC
249	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG ATC
250	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG AAG
251	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CTG

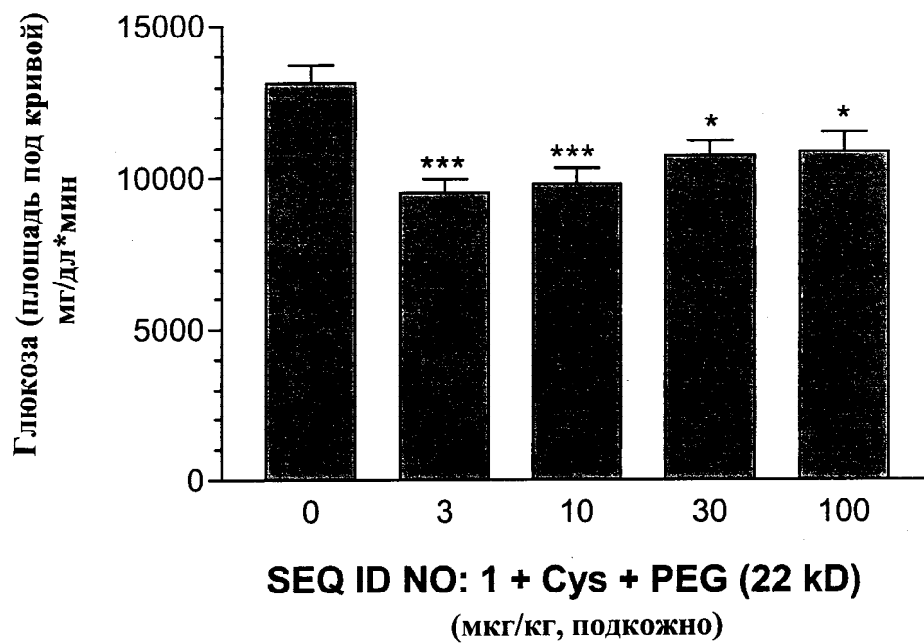
Фиг. 3g

252	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG ATG
253	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CCC
254	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG CAG
255	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG TCC
256	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG ACC
257	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG GTT
258	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG TGG
259	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC AAG TAC
260	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GGT AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC CGT ATC
261	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT AAA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC CGT ATC
262	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC AAG AAC CGT ATC
263	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT GCA AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CCC AAC CGT ATC
264	CAC TCC GAC GCT GTT TTC ACC GAC CAG TAC ACG CGT CTG CGT AAA CAG ATG GCT TCC AAG AAA TAC CTG CAG TCC ATC CGT AAC CGT ATC

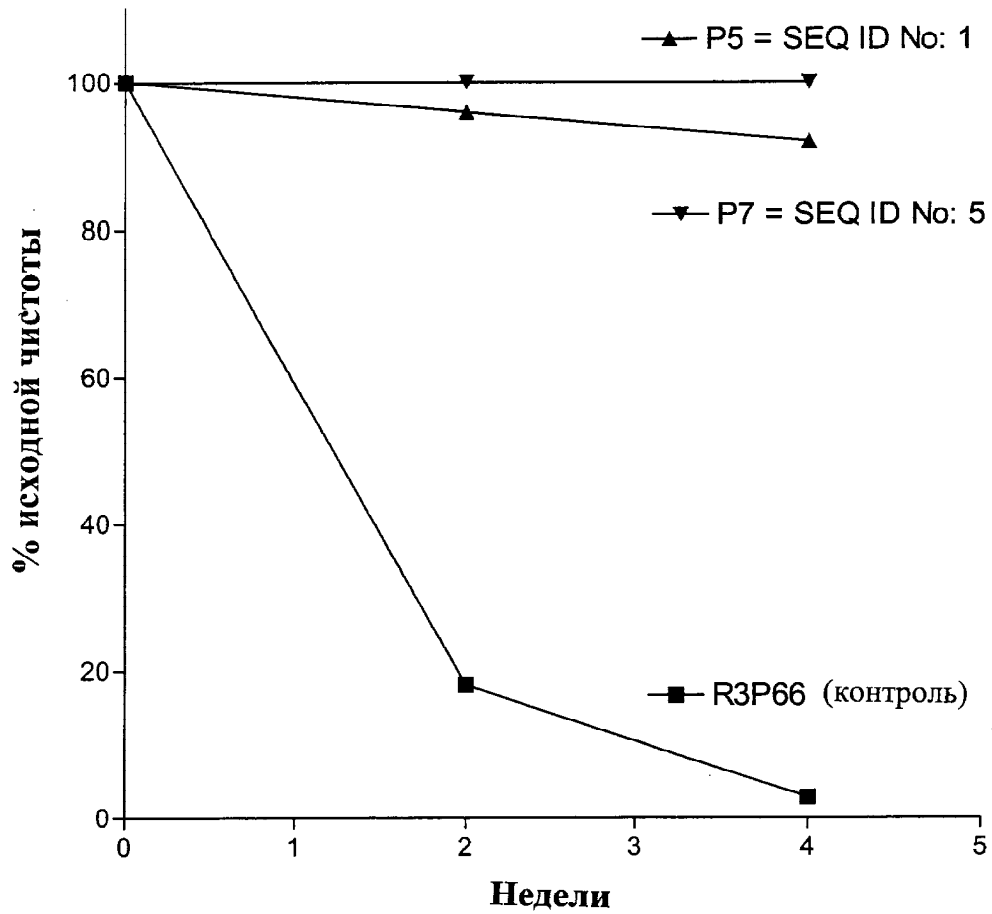
Фиг. 3h



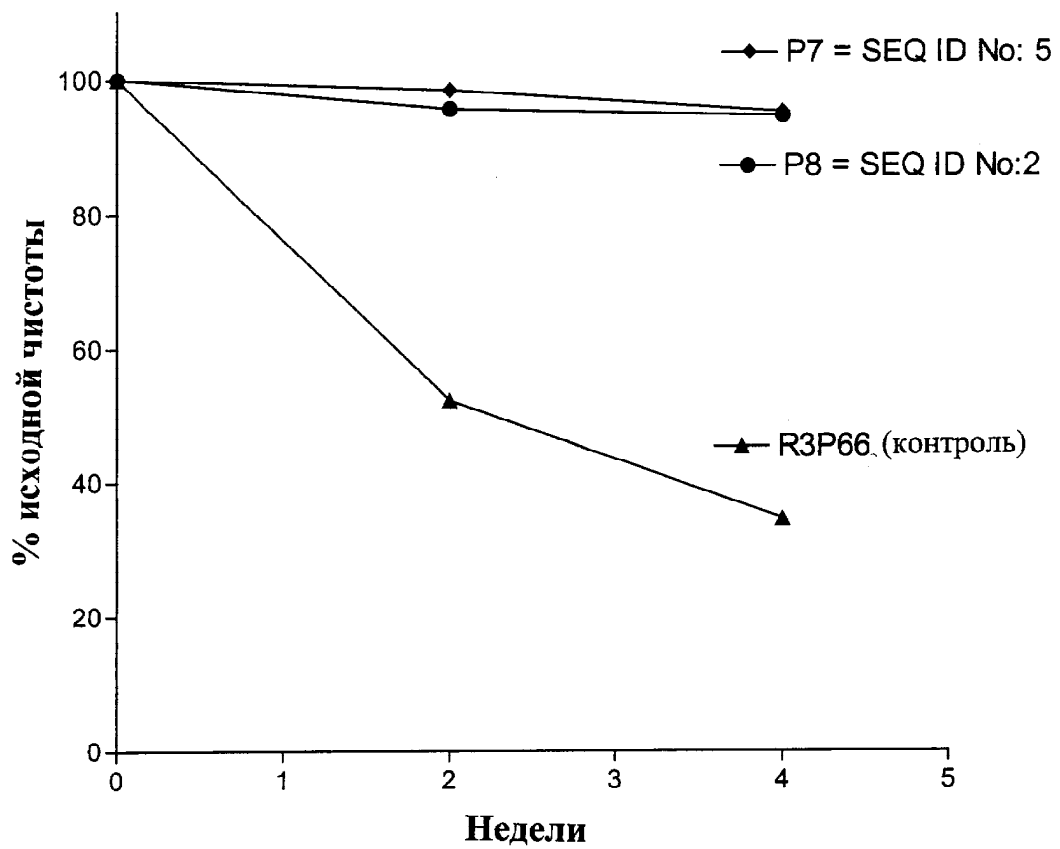
Фиг. 4



Фиг. 5

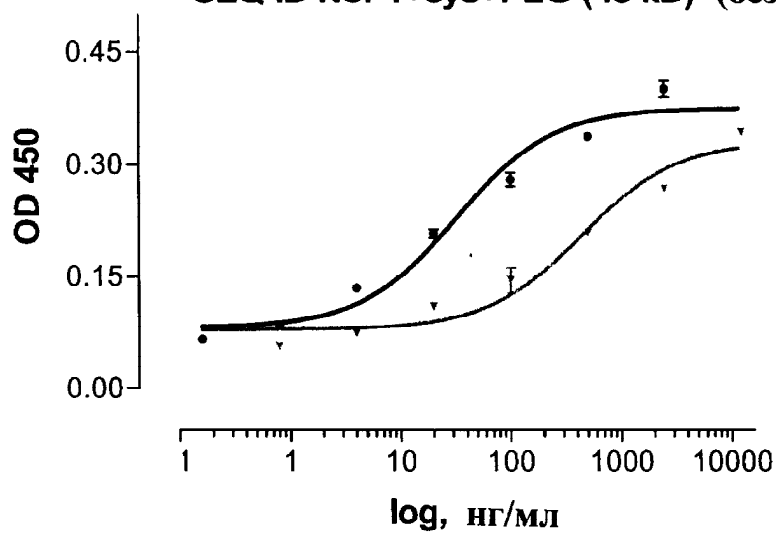


Фиг. 6



Фиг. 7

- SEQ ID No: 1+cys+PEG (43 kD)
- SEQ ID No: 1+cys+PEG (43 kD) (без N-концевого His)



Фиг. 8