



(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 PCT на национальную фазу: 14.02.2005

(86) Заявка PCT:  
 US 03/21761 (11.07.2003)

(87) Публикация PCT:  
 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 ЛЛСи (US)

C2  
2 3 6 0 9 2 2

RU

R  
U  
2  
3  
6  
0  
9  
2  
2

**(54) АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА (VPAC2) ГИПОФИЗАРНОГО ПЕПТИДА, АКТИВИРУЮЩЕГО АДЕНИЛАТИКЛАЗУ (PACAP), 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  $\beta$ -клеток

поджелудочной железы глюкозависимым 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

табл.

R U 2 3 6 0 9 2 2 C 2

R U 2 3 6 0 9 2 2 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

**(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

(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)

(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)

R U 2 3 6 0 9 2 2 C 2

**(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  $\beta$ -cells of pancreas by glucose-dependant 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**

5       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  $\beta$ -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.

10

15

### **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 инсулиновозависимый сахарный диабет (ИЗСД, IDDM), возникающий, если у пациентов не хватает  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, производящих инсулин, и диабет 2 типа, или инсулинонезависимый сахарный диабет (ИНСД, NIDDM), возникающий у пациентов с нарушением функций  $\beta$ -клеток или изменениями в действии инсулина.

20

25

30

В настоящее время лечение пациентов с диабетом 1 типа проводят инсулином, а большинство пациентов с диабетом 2 типа лечат агентами, стимулирующими функцию  $\beta$ -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.

35

40

45

50

Ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, Precose®<sup>6</sup>, Voglibose®<sup>7</sup> и Miglitol®<sup>8</sup>) 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 сенсибилизаторы – это лекарства, усиливающие ответ организма на инсулин. Тиозолидиндионы, такие как Avandia<sup>TM</sup> (розиглитазон) и Actos<sup>TM</sup>, активируют рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором (PPAR), подтипа гамма и модулируют активность набора генов, еще не описанных достаточно хорошо. От использования Rezulin<sup>TM</sup> (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<sup>TM</sup> и Actos<sup>TM</sup>. Даже в этом случае рекомендуется проверять уровень ферментов печени каждые 2 месяца в течение первого года лечения и периодически потом. Возможно, применение Avandia<sup>TM</sup> и Actos<sup>TM</sup> связано с задержкой жидкости и отеками. Применение Avandia<sup>TM</sup> 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).

5 Glucophage<sup>TM</sup> (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<sup>TM</sup> обладает рядом побочных эффектов, включающих 10 нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта и лактоцидоз. Glucophage<sup>TM</sup> противопоказан пациентам старше 70 лет и пациентам с нарушениями функций почек или печени. Кроме того, Glucophage<sup>TM</sup> обладает тем же уровнем первичных и 15 вторичных отказов, что и SFU.

20 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.

25 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 30 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 35 клеток). Изложенная здесь стратегия разработки новых лекарств базируется на механизме передачи сигналов циклическим аденоzinин монофосфатом (ЦАМФ) и его влиянии на секрецию инсулина.

40 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, 45 50

et al., *Diabetes* 47:1426-1435, 1998). Стимуляторы секреции типа гипофизарного 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).

15

PACAP является мощным стимулятором зависимым от глюкозы секреции инсулина из панкреатических  $\beta$ -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  $\beta$ -клеток (Inagaki, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2679-2683, 1994; Tsutsumi, et al., *Diabetes* 51:1453-1460, 2002). Инсулинопротропное действие PACAP опосредуется белком Gs, связывающим ГТФ. В свою очередь, накопление клеточного цАМФ активирует неселективные катионные каналы в  $\beta$ -клетках, повышая концентрацию  $[Ca^{++}]$ , и усиливает экзоцитоз секреторных гранул, содержащих инсулин.

40

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

50

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

5 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). Од-  
10нако, распределение PACAP и VIP по центральной нервной системе предполагает выраженные нейротрансмиттерные функции этих структурно связанных полипепти-  
дов (Koves, et al., *Neuroendocrinology* 54:159-169, 1991).

15 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).

20 Кроме того, PACAP, по-видимому, играет роль в гормональной регуляции метаболизма липидов и углеводов (Gray, et al., *Mol. Endocrinol.* 15:1739-47, 2001); циркади-  
25анной 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 заболева-  
30ниях, септическом шоке и аутоиммунных заболеваниях (например, красной систем-  
ной волчанке) (Pozo, *Trends Mol. Med.* 9:211-217, 2003).

35 Вазоактивный интестинальный пептид (VIP) представляет собой пептид из 28 ами-  
нокислот, 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 принадле-  
40жит к семейству структурно связанных небольших полипептидов, включающему ге-  
лодермин, секретин, соматостатин и глюкагон. Биологическое действие VIP опо-  
редуетя активацией связанных с мембраной рецепторных белков, связанных с  
45 внутриклеточной сигнальной системой цАМФ. Изначально эти рецепторы были из-  
вестны как VIP-R1 и VIP-R2, однако, позднее было обнаружено, что они представ-  
ляют 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 кэпирования 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -клеток до нормального уровня (Rachman, et al., *Diabetes* 45:1524-1530, 1996). Последние сообщения указывают на то, что GLP-1 повышает способность  $\beta$ -клеток реагировать на глюкозу у пациентов с нарушениями переносимости глюкозы (Byrne, 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 4<sup>TM</sup> (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 4<sup>TM</sup>. Однако, зафиксировано значительное количество случаев тошноты и рвоты.

50

5 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 ком-  
10 мерческого использования, учитывая проблемы со стабильностью, связанные с полипептидами в составах, а также проблемы короткого периода полураспада полипептидов.

15 Существует потребность в улучшенных пептидах, обладающих зависимой от глюкозы активностью стимуляции секреции PACAP, GLP-1 или Exendin 4<sup>TM</sup>, 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.  
20 Таким образом, новые лекарства от диабета должны обеспечивать пациентам лучшее качество жизни.

25 **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  $\beta$ -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.

50

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 С-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.

5

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

10

### 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.

20

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.

25

30

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

35

40

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

45

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

50

На Фиг. 6 приведена стабильность трех аналогов VPAC2 (P5, P7 и контроль, R3P66) при концентрации 1 мг/мл в водном растворе, содержащем 150 мМ NaCl и 20 мМ 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 диметилсульфоксида (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  $\beta$ -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 20 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 50

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: A, аланин (ala); C, цистеин (cys); D, аспарагиновая кислота (asp); E, глутаминовая кислота (glu); F, фенилаланин (phe); G, глицин (gly); H, гистидин (his); I,

изолейцин (ile); К, лизин (lys); L, лейцин (leu); M, метионин (met); N, аспаргин (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).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

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 кодирующем 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 согласноproto-

5 колу Примера 7. Предпочтительные полипептиды настоящего изобретения, являю-  
щиеся 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  
10 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 по-  
15 липептида согласно протоколу Примера 7, при использовании клеток, экспресси-  
рующих соответствующие рецепторы.

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

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

35 Аналог содержит прополипептид, который содержит в себе аминокислотную после-  
довательность полипептида настоящего изобретения. Активный полипептид на-  
стоящего изобретения может быть отщеплен от дополнительных аминокислот, кото-  
40 рые составляют прополипептидную молекулу, естественными, *in vivo* процессами  
или методами, хорошо известными в данной области техники, таких как фермента-  
тивное или химическое расщепление. Например, нативный пептид VIP из 28 амино-  
45 кислот 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 больший период полураспада), слитые полипептиды (фьюжн-полипептиды), которые придают специфику направленности или дополнительную активность типа токсичность к пред назначенн ой цели, как описано далее.

10 15 Полипептиды настоящего изобретения могут быть рекомбинантными полипептидами, очищенными природными полипептидами или синтетическими полипептидами.

20 25 30 35 40 45 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 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, 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 вариант, в котором к зрелому полипептидному присоединены дополнительные аминокислоты, такие как лидерная или секреторная последовательности или последовательность, используемая для очистки зрелого полипептида или прополипептидной 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). Такие фрагменты, производные и варианты и аналоги находятся в пределах квалификации специалиста в данной области техники и ясны из приведенных здесь сведений.

50

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 реагента 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-

50

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

5 Кроме того, предпочтительные производные настоящего изобретения включают зрелые полипептиды, соединенные с другим соединением, таким как соединение для 10 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 пэгирования 15 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 20 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 25 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 30 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 - 35 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. 40 Такие варианты обычно сохраняют функциональную активность полипептидов настоящего изобретения. Для создания разнородной совокупности фрагментов для скрининга и последующего отбора можно использовать библиотеки фрагментов по- 45 50

5 линуклеотидов. Например, библиотеку фрагментов можно создать обработкой двух-  
 цепочечного ПЦР-фрагмента полинуклеотида нуклеазой в условиях, при которых  
 одноцепочечный разрыв случается только один раз на молекуле, денатурацией  
 10 двухцепочечной ДНК, восстановлением ДНК с образованием двухцепочечной ДНК, которая может содержать смысловые/несмысливые пары от различных продуктов  
 разрыва, удалением одноцепочечных частей из преобразованных дуплексов обра-  
 15 боткой нуклеазой S1, и лигированием получившейся библиотеки фрагментов в век-  
 тор экспрессии. Этим методом можно получить экспрессионную библиотеку, коди-  
 рующую N-концевые и внутренние фрагменты полипептидов настоящего изобрете-  
 ния различных размеров.

20 Варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Варианты, которые функционируют как аго-  
 нисты VPAC2, могут быть идентифицированы скринингом комбинаторных библио-  
 тек мутантов, например усеченных мутантов, полипептидов этого изобретения на  
 25 наличие активности агониста VPAC2.

25 В одном варианте осуществления изобретения разнородная библиотека аналогов по-  
 лучена комбинаторным мутагенезом на уровне нуклеиновой кислоты, и она кодиру-  
 30ется разнородной библиотекой генов. Разнородную библиотеку вариантов можно  
 получить, например, ферментативным лигированием смеси синтетических олиго-  
 нуклеотидов в последовательности генов, так чтобы вырожденный набор потенци-  
 35 альных вариантов аминокислотных последовательностей экспрессировался в виде  
 индивидуальных полипептидов, или, альтернативно, в виде набора больших слитых  
 белков (например, для фагового дисплея), содержащих в себе набор последователь-  
 40ностей. Для получения библиотек потенциальных вариантов из вырожденной олиго-  
 нуклеотидной последовательности можно использовать различные методы. Химиче-  
 45ский синтез вырожденной последовательности гена можно осуществить в автомати-  
 ческом синтезаторе ДНК, а синтетический ген затем лигируют в соответствующий  
 вектор экспрессии. Использование вырожденного набора генов позволяет получить в  
 50 одной смеси все последовательности, кодирующие требуемый набор потенциальных  
 вариантов 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).

5 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 10 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 15 клонирование библиотеки генов в реплицирующиеся векторы экспрессии, трансформацию подходящих клеток полученной библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, при которых обнаружение желательной активности 20 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 25 повышает частоту функциональных мутантов в библиотеках.

Изобретение также обеспечивает химерные полипептиды или слитые полипептиды. 30 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 35 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 40 понимать, что модификация одного типа может присутствовать в той же или различных степенях в нескольких сайтах в данном полипептиде. Также, данный полипептид 45

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 flavина, 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, пэгилирование, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, сelenоилирование, 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

5 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.

10

15 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. 20 8:779-785, 1989). Например, аминокислоты, принадлежащие к одной из следующих групп, представляют консервативные замены:

- 25
- 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.
- 30

35 Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующими 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 культи-

40

45

50

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 псевдодобшенства (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 ви-  
rusах. 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 дигидрофолят 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*, *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 Boy (Bowes melanoma); аденоовириусы; растительные клетки, и т.д.

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 плазмида или вирусный вектор, в который вставлена последовательность по настоящему изобретению в прямой или обратной ориентации. 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, 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 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-1 мыши. Выбор подходящего вектора и промотора находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

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

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 адено-вирусов. 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),  $\alpha$  фактор, кислотная фосфатаза, или белки

5 теплового шока. Гетерологичная структурная последовательность собирается в со-  
ответствующей фазе с последовательностями трансляции, инициации и терминации,  
и, предпочтительно, лидерной последовательностью способной направлять секре-  
цию транслированного белка в периплазматическое пространство или внеклеточ-  
ную среду. Как вариант, гетерологичная последовательность может кодировать сли-  
10 тый белок, включая N-концевой идентификационный пептид, придающий желатель-  
ные характеристики (например, стабилизацию или упрощенную очистку экспресси-  
рованного рекомбинантного продукта).

15 Векторы экспрессии, пригодные для применения в бактериях, можно сконструиро-  
вать вставкой структурной последовательности ДНК, кодирующей требуемый белок,  
вместе с соответствующими сигналами трансляции, инициации и терминации в опе-  
рабельной фазе с функциональным промотором. Вектор может содержать один или  
20 более фенотипических селективных маркеров и сайт начала репликации для обес-  
печения поддержания вектора, и, при желании, для обеспечения амплификации в хо-  
зяине. К прокариотическим хозяевам, подходящим для трансформации, относятся,  
25 например, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, и различные виды в пре-  
делях родов *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*, хотя по выбору можно ис-  
пользовать и другие. Векторы экспрессии, пригодные для применения в бактериях,  
30 могут содержать селективный маркер и бактериальный сайт начала репликации, по-  
лученный из коммерчески доступных плазмид, включающих генетические элементы  
известного вектора клонирования pBR322 (ATCC 37017). К таким коммерческим  
35 векторам относятся, например, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala,  
Sweden) and GEM1 (Promega, Madison, Wis., USA). Эти участки «остова» pBR322  
могут комбинироваться с соответствующим промотором и структурной последова-  
тельностью, которая должна быть экспрессирована.

40 После трансформации подходящего штамма хозяина и выращивания его до соотв-  
етствующей плотности клеток, активность выбранного промотора подавляют соотв-  
етствующим способом (например, температурным сдвигом или химической индукци-  
ей) и клетки культивируют в течение дополнительного времени. Клетки обычно со-  
45 бирают центрифугированием, разрушают физическим или химическим способом, и  
полученный неочищенный экстракт сохраняют для дальнейшей очистки. Микроб-

50

ные клетки, используемые для экспрессии белков, можно разрушать любым традиционным методом, включая циклическое замораживание-оттаивание, разрушение ультразвуком, механическое разрушение или использование агентов, лизирующих 5 клетки.

Для экспрессии рекомбинантного белка можно также использовать различные 10 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, 15 например, линии C127, 3T3, CHO, HeLa и BHK. 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 20 транскрипции и 5' фланкирующие нетранскрибуемые последовательности. В качестве необходимых нетранскрибуемых генетически элементов можно использовать 25 последовательности ДНК, полученные из генома вируса SV40, например, сайт начала репликации, ранний промотор, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования вируса SV40.

30 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 гидроксиапатите, 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). 35

40 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 45

в методе рекомбинантного получения, полипептиды настоящего изобретения могут быть гликозилированы углеводами млекопитающих или других эукариот, или могут быть негликозилированными. Полипептиды этого изобретения могут также включить 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 рекомбинантными методами, или не содержит химические предшественники или другие химические вещества, если синтезирован химически. Предпочтительно, выделенный полипептид по настоящему изобретению по существу не содержит клеточный материал и содержит менее 30 % (сухого веса) неполипептидного, или контаминирующего, 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 осуществлено 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 специфических примерах. Чистота препарата очищенного полипептида составляет, по крайней мере, приблизительно 70%; предпочтительно - приблизительно от 85% до 99%. Чистоту препаратов можно оценить любым способом, известным в данной области техники, таких как электрофорез в SDS-полиакриламидном геле и масс-спектрометрия/жидкостная хроматография.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды настоящего изобретения, можно синтезировать, полностью или частично, используя химические 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 экспрессии, чтобы экспрессировать полипептид.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что может быть выгодно получить кодирующие полипептид нуклеотидные последовательности, содержащие

5 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 последовательностью, можно использовать кодоны, предпочитаемые конкретным прокариотическим или эукариотическим хозяином.

10 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 сплайсвариантов, получения мутаций и т.д. можно использовать сайт-направленный мутагенез.

30 Также рассматриваются взаимосвязанные соединения, понятные специалисту в данной области техники, такие как химические миметики, органомиметики или пептидомиметики. В настоящем документе термины "миметик", "пептидный миметик", "пептидомиметик", "органомиметик" 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 биологической активности. При помощи современного программного обеспечения  
 15 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. 85:2149-54, 1963; Carpino, Acc. Chem. Res. 6:191-98, 1973; Birr, Aspects of the  
 30 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.: 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  
 35 своей полноте посредством ссылки.

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

5 мидная смола, кизельгур/полиамид (пепсин К), стекло с известным размером пор, целлюлоза, полипропиленовые мембранные, 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 10 FMOC, используя чувствительную к кислоте смолу. В этом случае предпочтительными твердыми подложками являются полистирольные смолы, поперечно сшитые дивинилбензолом, коммерчески доступные в различных функционализированных 15 формах, включая хлорометиловую смолу, гидроксиметиловую смолу, параацетамидометиловую смолу, бензгидриламиновую (BHA) смолу, 4-метилбензгидриламиновую (MBHA) смолу, оксимные смолы, смолу 4-алкоксибензилового спирта (смола Wang), 4-(2',4'-диметоксифениламинометил)-20 феноксиметиловую смолу, 2,4-диметоксибензгидрил-аминовую смолу и смолу 4-(2',4'-диметоксифенил-FMOC-аминометил)-феноксиацетамидонорлейцил-MBHA (амидную смолу MBHA Ринка). Кроме того, при необходимости чувствительные к 25 кислоте смолы также обеспечивают С-концевые кислоты. Особенно предпочтительной защитной группой для альфа-аминокислот является 9-фторфенилметоксикарбонильная (FMOC), лабильная в основании.

30 Походящие защитные группы для функциональных групп боковой цепи аминокислот, химически совместимые с группами BOC (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, 35 FMOC-Gly, FMOC-Lys(Boc), FMOC-Gln(Trit), FMOC-Glu(BOB), FMOC-His(Trit), FMOC-Tyr(But), FMOC-Arg(PMC (2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил)), 40 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), BOP (гексафторофосфат бензотриазолил-N-окситрисдиметиламинофосфония), PyBOP (гексафторофосфат бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидинофосфония), PyBrOP (гексафторофос-45

фат бром-тристирролидинофосфония); посредством симметричных ангидридов; по-  
средством активных сложных эфиров, таких как пентафторфениловые сложные эфи-  
ры; или посредством сложных эфиров НОВт (1-гидроксибензотриазол) или при ис-  
пользовании FMOC-фторида и хлоридов аминокислоты или FMOC-N-карбокси ан-  
гидридоаминокислоты. Предпочтительной является активация НВТУ (гексафтор-  
фосфатом 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония) или НАТУ (гексаф-  
торфосфатом 2-(1Н-7-аза-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония) в присутст-  
вии НОВт или НОАт (7-азагидроксибензотриазола).

Твердофазный метод может быть осуществлен вручную, хотя предпочтительным  
является автоматизированный синтез на коммерчески доступном пептидном синте-  
заторе (например, Applied Biosystems 431A или подобном; Applied Biosystems, Foster  
City, CA). При типичном синтезе первую (С-концевую) аминокислоту прикрепляют  
к хлортритиловой смоле. Для получения последовательности пептида можно приме-  
нить 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 кэппи-  
рованием уксусным ангидридом.

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

50

или требуемую соль можно получить прямо лиофилизацией соответствующего основания.

5 В общем, специалисту в данной области техники будет понятно, что описанные здесь пептиды могут быть модифицированы рядом химических методов для получения пептидов, обладающих по существу той же активностью, что и немодифицированный пептид, и возможно имеющих другие требуемые свойства. Например, карбоксильные кислые группы пептида могут быть в форме соли фармацевтически приемлемого катиона. Аминогруппы в пептиде могут быть в форме фармацевтически приемлемой кислой соли присоединения, такой как соль HCl, HBr, уксусной, бензойной, толуолсульфоновой, малеиновой, винной и других органических кислот, или могут быть преобразованы в амид. Тиолы могут быть защищены любой из множества известных защитных групп, таких как ацетамидные группы. Специалисту в данной 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 дисульфидную связь, таким образом создавая циклический пептид. Другой метод циклизации пептида включает образование тиоэфиров и карбокси- и амино-концевых амидов и сложных эфиров.

35 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 40 N-концевой аминогруппе, С-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 С-концевой карбоксильной группе и включение  $-\text{CH}_2-$  карбаматной связи между двумя аминокислотами в пептиде).

45 50

5 Модификации амино-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 эквимолярных 10 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 остальном условия 15 реакции традиционны (например, комнатная температура, в течение 30 минут). Алкилированием конечной амино-группы для замещения N низшим алкилом и последующей реакцией с галоидангидридом, как описано выше, получают N-алкиламидную группу формулы  $RC(O)NR$ -. Иначе, амино-конец может быть ковалентно связан с сукцинимидной группой по реакции с янтарным ангидридом. Используют приблизительно эквимолярное 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 20 25 Wollenberg, et al., (Патент США № 4,612,132), включенном в настоящий документ в своей полноте посредством ссылки. Также следует понимать, что янтарная группа 30 может иметь заместители,  $C_2$ - $C_6$ -алкил или -SR заместители, которые получают традиционными методами для получения замещенного сукцинимида на N-конце пептида. Такие алкильные заместители могут быть получены реакцией низшего олефина 35 ( $C_2$ - $C_6$ -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 амино-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- 40 45 50

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 диизопропилэтамина 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 концевого амина в карбамат, где R - алкил, предпочтительно - низший алкил. Предпочтительно инертный разбавитель содержит избыток третичного амина (например, 10 экв.) типа диизопропилэтамина 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 концевого амина в карбамидную группу (то есть  $RNHCO(NH)R'$ ), где R соответствует определениям выше. Предпочтительно инертный разбавитель содержит избыток третичного амина (например, 10 экв.) типа диизопропилэтамина. В остальном условия реакции традиционны (например, комнатная температура, в течение 30 минут).

При получении пептидных миметиков, в которых С-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 С-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<sup>1</sup> 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 метилене ( $CH_2Cl_2$ ), диметилформамиде (ДМФ) или их смеси. Затем образуется циклический пептид заменой активированного эфира N-концевым амином. Циклизация, в большей степени чем полимеризация, может быть усиlena 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 вызвать 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 скрипинга, 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, SIDDICO (Tuscon, Arizona); Tripos, Inc.; Calbiochem/Novabiochem (San Diego, CA); Symyx Technologies, Inc. (Santa Clara, CA); Medicchem 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](http://www.netsci.org), 1995; Adnan, et al., "Solid Support Combinatorial Chemistry in Lead Discovery and SAR Optimization," Id., 1995; Davies

50

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; 5,331573; and 5,573,905.

5

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.

20

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.

35

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

45

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

50

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);

10 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);

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

20 4) Доставку ДНК посредством ДНК-содержащего вируса. Такие ДНК-содержащие вирусы включают, например, аденоовириусы (предпочтительно векторы на основе Ad2 и Ad5), вирусы герпеса (предпочтительно векторы на основе вируса простого герпеса), и парвовириусы (предпочтительно векторы на основе "дефектных" или неавтономных парвовириусов, 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 - мишени. Хотя ретровирические векторы широко изучались и использовались в различных применениях генной терапии, эти векторы в общем не подходят для инфицирования неделяющихся клеток. Кроме того, ретровириусы обладают потенциальной онкогенностью. Однако, последние исследования в области лентивирических векторов могут позволить обойти некоторые из этих ограничений (см., например, Naldini, et al., *Science* 272:263-67, 1996).

40 45 К ретровириусам, из которых можно получить ретровирические плазмидные векторы, включают, без ограничения, вирус лейкоза мышей Молони, вирус некроза селезенки, ретровириусы, такие как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус лейкоза птиц, вирус лейкоза обезьяньи гиббонов, вирус иммунодефицита человека, аденоовириус, 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.

10

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

15

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.

20

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.

30

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.

35

40

45

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

50

5 любой другой промотор (например, клеточные промоторы, такие как промоторы эукариотических клеток, включая, без ограничения, промоторы гистона, pol III и β-актина). Другие вирусные промоторы, которые можно использовать, включают, без ограничения, адено-вирусные промоторы, промоторы тимидинкиназы (ТК) и В19 парвовирусные промоторы. Выбор подходящего промотора находится в компетенции специалиста в данной области техники с учетом приведенных здесь сведений.

10

15 Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид настоящего изобретения, находится под контролем соответствующего промотора. Соответствующие промоторы, которые можно использовать, включают, без ограничения, адено-вирусные промоторы, такие как ановирусный главный поздний промотор; или гетерологичные промоторы, такие как промотор цитомегаловируса (CMV); промотор респираторного синцитиального вируса (RSV); индуцибельные промоторы, такие как промотор ММТ (металлотионеина); промоторы теплового шока; альбуминовый промотор; промотор ApoAI; промоторы глобина человека; вирусные тимидинкиназные промоторы, такие как промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ретровирусные LTR (включая модифицированные ретровирусные LTR, описанные выше); промотор β-актина и промоторы гормона роста человека. Промотор также может быть нативным промотором, контролирующим ген, кодирующий полипептид.

20

25 Для трансформации клеточных линий, способных к упаковке, можно использовать ретровирусный плазмидный вектор с целью получения продуцирующих клеточных 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, ψCRE, ψCRIP, 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 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<sub>4</sub>. 30

35 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.

40

45

50

5 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, 10 фибробласты, миобласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки и бронхиальные эпителиальные клетки.

15 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, 20 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., 25 например, патенты США 5,641,670 и 5,733,761, включенные в настоящий документ в своей полноте посредством ссылки).

35 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')<sub>2</sub> и Fv, способные связывать 40 эпитоп полипептида настоящего изобретения. Как правило, для образования эпитопа требуется, по крайней мере, 6, 8, 10 или 12 смежных аминокислот. Однако, эпи- 45 па 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.

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

20  
25 Как правило, в иммунохимическом анализе антитело, специфически связывающееся с полипептидом настоящего изобретения, дает сигнал обнаружения, по крайней ме-  
ре, в 5, 10 или 20 раз выше, чем сигнал обнаружения других белков. Предпочтитель-  
но, антитела, специфически связывающиеся с полипептидом настоящего изобрете-  
ния, не обнаруживают другие белки в иммунохимических анализаах и могут иммуно-  
30 преципитировать полипептид настоящего изобретения из раствора.

35 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 изо-  
бретения можно конъюгировать с белком-носителем, таким как бычий сывороточный альбумин, тиреоглобулин, и гемоцианин моллюска Keyhole Limpet. В зависи-  
40 мости от вида хозяина для усиления иммунологического ответа можно использовать различные адьюванты. Такие адьюванты включают, без ограничения, адьювант Фрейнда, минеральные гели (например, гидроксид алюминия), и поверхности-  
активные вещества (например, лизолецитин, полиолы плуроника, полианионы, пеп-  
тиды, масляные эмульсии, гемоцианин моллюска Keyhole Limpet и динитрофенол).  
45 Среди адьювантов, используемых для людей, особенно применимы ВСГ (бациллы Кальметта-Герена) и Corynebacterium parvum.

50

5 Моноклональные антитела, специфически связывающиеся с полипептидом настоящего изобретения, можно получить, используя любую методику, предусматривающую 10 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. 15 Sci. 80:2026-30, 1983; Cole, et al., Mol. Cell Biol. 62:109-20, 1984).

15 Кроме того, можно использовать методы, разработанные для получения "химерных антител", соединение генов антитела мыши с генами антитела человека для получения 20 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 25 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 30 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, 35 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 40 частично или полностью адаптированы к человеку, как описано в патенте США № 5,565,332.

45 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

50

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

5

Одноцепочечные антитела также можно сконструировать при использовании метода амплификации ДНК, такого как ПЦР, используя гибридомную 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).

10

15

20

25

30

35

40

45

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

50

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, прочно связанный с полипептидом настоящего изобретения. Связанный фаг можно  
15 элюировать, например, изменением pH или элюированием с E. coli и накопить ин-  
фицированием хозяев E. coli. Этот процесс пэннинга (отбора) можно повторить один или два раза для обогащения популяции антител, прочно связывающихся с полипеп-  
20тидом настоящего изобретения. Антитела Fab из обогащенной популяции затем экс-  
прессируют, 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  
30 антитела затем можно элюировать с колонки, используя буфер с высокой концен-  
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 диа-  
40 бета, включая диабет типа 1 и типа 2 (инсулиновозависимый 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 изо-  
бретения 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

5 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.

10 Полипептиды настоящего изобретения также могут быть эффективны при таких на-  
рушениях, как ожирение, и при лечении атеросклеротического заболевания, гипер-  
липидемии, гиперхолистеринемии, низких уровней ЛВП, гипертензии, сердечно-  
15 сосудистых заболеваний (включая атеросклероз, коронарную болезнь сердца, бо-  
лезнь коронарной артерии и гипертензию), заболеваний сосудов головного мозга и  
заболеваний периферических сосудов; а также при лечении волчанки, синдрома по-  
20 ликистоза яичника, канцерогенеза и гиперплазии, астмы, проблем репродукции у  
мужчин, язвы, нарушений сна, нарушений метаболизма липидов и углеводов, цирка-  
25 дианной дисфункции, нарушений роста, нарушений гомеостаза энергии, иммунных  
заболеваний, включая аутоиммунные заболевания (например, системную красную  
волчанку), а также острых и хронических воспалительных заболеваний и септиче-  
ского шока.

30 Соединения настоящего изобретения могут также быть полезны при лечении физио-  
логических нарушений, связанных, например, с клеточной дифференцировкой для  
35 продуцирования клеток, накапливающих липид, регулировкой чувствительности к  
инсулину и уровней глюкозы в крови, которые задействованы, например, в ненор-  
мальном функционировании  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, опухолях, секрети-  
рующих инсулин и/или аутоиммунной гипогликемии из-за аутоантител к инсулину,  
40 аутоантител к инсулиновому рецептору, или аутоантител, являющихся стимули-  
рующими для  $\beta$ -клеток поджелудочной железы), с дифференцировкой макрофагов,  
ведущей к образованию атеросклеротических бляшек, с воспалительной реакцией,  
45 канцерогенезом, гиперплазией, экспрессией гена адipoцита, дифференцировкой  
адипоцитов, снижением массы  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, секрецией инсули-  
на, чувствительностью ткани к инсулину, ростом клеток липосаркомы, поликистоз-  
50 ным заболеванием яичников, хронической ановуляцией, гиперандрогенизмом, про-  
дукцией прогестерона, стероидогенезом, окислительно-восстановительным потен-  
циалом и окислительным стрессом в клетках, продуцированием синтетазы оксида

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

5 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, 10 пиридинил, никотиновая кислота, глюкокортикоиды, фенитоин, тиреоидный гормон,  $\beta$ -адренергические агенты,  $\alpha$ -интерферон и лекарства, применяемые при лечении 15 ВИЧ инфекции.

20 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); 25 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 (Brennenman, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:207-12, 1998); для защиты сердца в течение 30 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 35 против язвы (Tuncel, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:309-22, 1998).

40 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.

5 Полипептиды изобретения можно также применяться в комбинации с другими из-  
вестными средствами для лечения диабета, включая агонисты PPAR, препараты  
сульфонилмочевины, стимуляторы секреции, не являющиеся соединениями сульфо-  
нилмочевины, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы, агенты, повышающие чувствительность  
10 к инсулину, стимуляторы секреции инсулина, соединения, снижающие выход глю-  
козы из печени, инсулин и препараты против ожирения. Такие средства могут при-  
15 меняться до, одновременно с или после применения полипептидов изобретения. Ин-  
сулин включает как долго, так и кратковременно действующие формы и составы ин-  
сулина. Агонист PPAR может включать агонисты любой из субъединиц PPAR или  
20 их комбинации. Например, агонист PPAR может включать агонисты PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ,  
25 PPAR- $\delta$  или любой комбинации двух или трех субъединиц PPAR. К агонистам  
PPAR относятся, например, розиглитазон и пиоглитазон. К препаратам сульфонил-  
мочевины относятся, например, глибурид, глиметирид, хлорпропамид и глипизид. К  
30 ингибиторам  $\alpha$ -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 примени-  
35 мы при лечении диабета, включают тиазолидиндионы и соединения, не являющиеся  
тиазолидиндионами. Соединения, снижающие выход глюкозы печени, которые мо-  
гут быть полезны при лечении диабета при совместном применении с полипептидом  
40 изобретения, включают метформин, типа Glucophage и Glucophage XR. Стимулято-  
ры секреции инсулина, которые могут быть полезны при лечении диабета при со-  
вместном применении с полипептидом изобретения, включают препараты сульфо-  
нилмочевины и препараты, не являющиеся ими: GLP-1, GIP, секретин, натеглинид,  
45 меглитинид, репаглинид, глибенкламид, глиметирид, 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 кисло-  
стой, и экзендин. В одном из вариантов осуществления изобретения полипептиды  
изобретения используют в комбинации со стимуляторами секреции инсулина, чтобы  
50 повысить чувствительность  $\beta$ -клеток поджелудочной железы к стимулятору секре-  
ции инсулина.

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

ют агонисты  $\beta$ -3, антагонисты СВ-1, средства, подавляющие аппетит, такие как, например, сибутрамин (Meridia), и ингибиторы липазы, такие как, например, орлистат (Xenical).

5

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,  $\beta$ -блокаторы и ингибиторы ACE.

10

15

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

20

25

В настоящем документе используются определяемые ниже термины.

30

35

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.

35

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

40

45

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.

50

5 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 не-  
10 скольких отдельных капсулах для каждого ингибирующего агента. Кроме того, та-  
кой способ введения подразумевает применение каждого типа терапевтического агента последовательно.

15 Фраза "терапевтически эффективное" означает количество каждого вводимого аген-  
та, ведущее к достижению цели улучшения диабетического состояния или выраже-  
20 нности нарушения, при отсутствии или минимизации неблагоприятных побочных  
эффектов, связанных с лечением.

25 Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что объект подходит для приме-  
нения в фармацевтическом продукте.

30 Эффективную дозу полипептидов настоящего изобретения для каждого случая мож-  
но легко определить, основываясь на известных способах определения эффективно-  
35 сти 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 ле-  
чении одного из этих состояний может сильно изменяться в зависимости от таких  
параметров, как конкретное соединение и используемый тип дозировки, способ вве-  
дения, период лечения, возраст и пол пациента и природа и степень состояния.

40 Общее количество вводимого активного ингредиента в общем может находиться в  
пределах приблизительно от 0,0001 мг/кг до 200 мг/кг, предпочтительно - приблизи-  
тельно от 0,01 мг/кг до 200 мг/кг веса тела в сутки. Дозировочная единица может со-  
45 держать 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  
50 и использование методов вливания, может составлять приблизительно от 0,01 до 200

5 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.

10 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 15 установлены специалистом в данной области техники при использовании традиционных методов анализа лечения.

20 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 25 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 искали благоприятных воздействий активного ингредиента. Терапевтически эффективным количеством полипептида является количество, дающее 30 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.

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

40

5 плавы, порошки, растворы, сусpenзии 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 обычного твердого или мягкого желатина, содержащую например, поверхностно-активные вещества, смазочные вещества и инертные наполнители, такие как лактоза, сахароза, фосфат кальция и кукурузный крахмал.

10

15 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; дезинтегриирующими агентами, предназначенными для облегчения разрушения и растворения таблетки 20 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 25 поверхности 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 30 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, сусpendирующими агентом, или эмульгатора. Другие различные материалы могут 35 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.

40

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

50

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

10 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 гуммиарабик и трагакантовая камедь, (2) природные фосфатиды, такие как соевый и лецитин, (3) сложные эфиры или неполные эфиры, производные жирных кислот и 15 ангидридов гексита, например, сорбитмоноолеат, и (4) продукты конденсации указанных неполных эфиров этиленоксидом, например, полиоксиэтилен сорбитмоноолеат. Эмульсии могут также содержать подсластители и вкусовые добавки.

20 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-гидроксибензоат; один или более красителей; одну или более вкусовых добавок; и 30 один или более подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

35 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 40 Полипептиды настоящего изобретения могут также применяться парентерально, то есть подкожно, внутривенно, внутримышечно или внутрибрюшно, в виде дозировочных форм для инъекций, содержащих соединение в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость или смесь жидкостей, таких как вода, физиологический раствор, водные растворы декстрозы и связанных сахаров; спирт, такой как этанол, изо-пропанол или гексадеканол; гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтилен- 45 50

ликол; 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 ацетилированный глицерид жирной кислоты, с или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, сусpendирующего агента, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгатора и других фармацевтических адьювантов.

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 моноглицеридсульфаты, и сульфосукцинаты; неионные детергенты, например, жирные оксиды амина, алканоламиды жирной кислоты и сополимеры полиоксиэтиленполипропилена; и детергенты амфотерного типа, например, алкил-бета-аминопропионаты и соли 2-алкилимидазолина четвертичного аммония, а также смеси.

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.

5 Примерами поверхностно-активных веществ, применяемых в парентеральных соста-  
вах, является класс сложных эфиров жирной кислоты и полиэтиленсорбита, напри-  
мер, сорбитмоноолеат и высокомолекулярные аддукты этиленоксида с гидрофобным  
10 основанием, полученные конденсацией пропиленоксида с пропиленгликолем.

15 Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильных водных суспензий  
для инъекций. Такие суспензии могут быть приготовлены согласно известным мето-  
дам при использовании соответствующих диспергирующих или смачивающих аген-  
тов и суспендирующих агентов, таких как, например, натрий карбоксиметилцеллю-  
20 лоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметил-целлюлоза, альгинат натрия, поливи-  
нилпирролидон, трагакантовая камедь и гуммиарабик; диспергирующие и смачи-  
вающие агенты могут представлять собой природный фосфатид типа лецитина, про-  
25 дукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой, например, стеарат полиокси-  
этилена, продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим  
спиртом, например, гептадекаэтиленоксистанол, продукт конденсации этиленоксида  
30 с неполным эфиром, производным жирной кислоты и гексита, такой как полиокси-  
этилен сорбитмоноолеат, или продукт конденсации этиленоксида с неполным эфи-  
ром, производным жирной кислоты и ангидрида гексита, например полиоксиэтилен  
35 сорбитанмоноолеат.

35 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 использо-  
40 вать, включают, например, воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида  
натрия. Кроме того, в качестве растворителей или среды для суспенсирования тра-  
диционно используют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно применять  
45 любое мягкое, нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды.  
Кроме того, для приготовления инъекций можно применять жирные кислоты, такие  
как олеиновая кислота.

50

5 Композиция по изобретению может также применяться в форме суппозиториев для ректального введения лекарства. Эти композиции могут быть получены путем сме-  
шивания лекарства (например, полипептида) с подходящим нераздражающим на-  
10 полнителем, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре, и, таким образом, будет плавиться в прямой кишке, высво-  
15 бождая лекарство. Таким материалом является, например, масло какао и полиэти-  
ленгликоль.

15 Другой состав, используемый в способах настоящего изобретения, задействует трансдермальные приспособления доставки ("пластыри"). Такие трансдермальные 20 пластири можно использовать для обеспечения непрерывного или прерывистого введения соединений настоящего изобретения в контролируемых количествах. Кон-  
струкция и использование трансдермальных пластырей для доставки фармацевти-  
25 ческих агентов хорошо известны в данной области техники (см., например, патент США 5,023,252, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Такие пластири могут быть созданы для непрерывной, пульсирующей доставки фармацевтических агентов или доставки по требованию.

30 Может быть желательно или необходимо ввести пациенту фармацевтическую композицию посредством механического устройства доставки. Конструкция и использо-  
35 вание 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 лекар-  
40 ства 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.

45 Композиции по изобретению могут также содержать другие традиционные фарма-  
цевтически приемлемые ингредиенты, называемые в общем носителями или разбави-  
50 телями, по мере необходимости или желания. Любую из композиций настоящего изо-  
бретения 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 использовать 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 агенты, такие как, без ограничения, нашатырный спирт, карбонат аммония, диэтаноламин, моноэтаноламин, гидроксид калия, борат натрия, карбонат натрия, гидроксид натрия, триэтаноламин, троламин.

Другие фармацевтические ингредиенты включают, например, без ограничения, адсорбенты (например, порошковая целлюлоза и активированный уголь); аэрозольные 20 пропелленты (например, диоксид углерода,  $CCl_2F_2$ ,  $F_2ClC-CClF_2$  и  $CClF_3$ ); газы-вытеснители (например, азот и аргон); противогрибковые консерванты (например, бензойная кислота, бутилпарабен, этилпарабен, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия); противомикробные консерванты (например, хлорид бензалькония, хлорид бензэтония, бензиловый спирт, хлорид цетилпиридиния, хлорбутанол, фенол, фенилэтиловый спирт, нитрат фенилртути и тимеросал); антиоксиданты (например, 25 аскорбиновая кислота, аскорбильпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, гипофосфорная кислота, монотиоглицерин, пропилгаллат, аскорбат натрия, бисульфит натрия, формальдегид сульфоксилат натрия, метабисульфит натрия); связующие вещества (например, блок-полимеры, природные и 30 синтетические каучуки, полиакрилаты, полиуретаны, кремнийорганические соединения и сополимеры стирола-бутадиена); буферные агенты (например, метафосфат калия, одноосновный фосфат калия, ацетат натрия, безводный цитрат натрия и дигидрат цитрата натрия); носители (например, сироп акации, ароматический сироп, 35 ароматический эликсир, вишневый сироп, сироп какао, апельсиновый сироп, сироп, кукурузное масло, минеральное масло, арахисовое масло, кунжутное масло, бактериостатический хлористый натрий для инъекций и бактериостатическая вода для инъекций); хелатирующие агенты (например, этилендиаминтетрауксуснокислый 40 двунатрий и этилендиаминтетрауксусная кислота); красители (например, FD&C Красный Номер 3, FD&C Красный Номер 20, FD&C Желтый Номер 6, FD&C Синий 45 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);  
5 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 10 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 15 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 20 для промывания); загустители (например, цетиловый спирт, воск цетиловых эфиров, микрокристаллический воск, парафин, стеариловый спирт, белый воск и желтый воск); основы для суппозиториев (например, масло какао и полиэтиленгликоли (смеси)); 25 поверхности-активные вещества (например, хлорид бензалкония, ноноксинол 10, окстоксинол 9, полисорбат 80, лаурилсульфат натрия и сорбитмонопальмитат); суппендирующие агенты (например, агар, бентонит, карбомеры, натрий карбоксиметилцеллюлоза, гидроксигидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, каолин, метилцеллюлоза, трагакант и Veegum); подсластители 30 (например, аспартам, декстроза, глицерин, маннит, пропиленгликоль, натрия саха-рин, сорбит и сахароза); агенты против прилипания таблеток (например, стеарат магния и тальк); связующие компоненты таблетки (например, гуммиарабик, альгиновая кислота, натрий карбоксиметилцеллюлоза, сжимаемый сахар, этилцеллюлоза, желатин, раствор глюкозы, метилцеллюлоза, повидон и предварительно желатини- 35 40 45 50

5 зированный крахмал); разбавители для таблеток и капсул (например, двухосновный фосфат кальция, каолин, лактоза, маннит, микрокристаллическая целлюлоза, порошковая целлюлоза, осажденный карбонат кальция, карбонат натрия, фосфат натрия, сорбит и крахмал); вещества для покрывания таблеток (например, раствор глюкозы, гидроксиэтилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, фталат ацетата целлюлозы и шеллак); наполнители для прессования таблеток (например, двухосновный фосфат кальция); дезинтегрирующие агенты для таблеток (например, альгиновая кислота, кальций карбоксиметилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, калий полакриллин, альгинат натрия, крахмальный гликолят натрия и крахмал); скользящие вещества для таблеток (например, коллоидная окись кремния, кукурузный крахмал и тальк); смазочные вещества таблеток (например, стеарат кальция, стеарат магния, минеральное масло, стеариновая кислота и стеарат цинка); загустители для таблеток/капсул (например, двуокись титана); полирующие компоненты для таблеток (например, карнаубский воск и белый воск); загустители (например, пчелиный воск, цетиловый спирт и парафин); агенты для тоничности (например, декстроза и хлористый натрий); агенты, повышающие вязкость (например, альгиновая кислота, бентонит, карбомеры, натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, повидон, альгинат натрия и трагакант); 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 эффектов. Например, полипептиды настоящего изобретения можно комбинировать с известными препаратами против ожирения, или с известными препаратами против диабета или для других показаний и т.п., а также с их смесями и комбинациями.

40 45 Описанные здесь полипептиды можно также применять в основной свободной форме или в композициях, в исследованиях и диагностике или как аналитические стандарты, 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 осуществляющую процедуру.

10

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, деградация 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 дозировки, такие как имплантат.

35

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

50

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

5

### Состав капсулы

10

В состав капсулы входят:

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

15

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

20

### Состав таблетки

25

В состав таблетки входят:

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

30

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.

35

### Стерильный внутривенный раствор

40

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

50

## Внутримышечная супензия

Готовят следующую внутримышечную супензию:

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 Супензия 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.

25 **Мягкие желатиновые капсулы**

30 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 растворен в смеси полиэтиленгликоля, глицерина и сорбита для получения лекарственной смеси, смешиваемой с водой.

35

## Таблетки/капсулы немедленного высвобождения

40 Представляют собой твердые пероральные дозировочные формы, полученные традиционными и новыми способами. Эти формы принимают перорально без воды для 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 лиофильной сушки экстракции твердого состояния. Лекарственные соединения лекарственного средства можно спрессовать с вязкоупругими и термоэластичными са-

45

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

5 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.

10

## Примеры

Для лучшего понимания настоящего изобретения приводятся следующие примеры. 15 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.

20

### Пример 1. Методология пептидного синтеза

Полипептиды настоящего изобретения были разработаны с целью повышения стабильности и увеличения периода полураспада этих пептидов. Конкретно, для немутуированной 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. 25 Для повышения стабильности и минимизации гидролиза, дезамидирования 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. 30 Далее, как описано ниже, полипептиды настоящего изобретения были пэгилированы для продления периода полураспада.

35

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-Polymer (Rapp-Polymer, Tübingen, Germany). По окончании синтеза пептиды отщепляют от смолы и снимают защиту, используя ТФУ/ДТТ (дитиотрейтол)/H<sub>2</sub>O/триизопропилсиан (88/5/5/2). Пептиды осаждают из

50

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 DE™ MALDI Mass Spectrometer (модель 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Образец пептида добавляют к матричному буферу (50/50 dH<sub>2</sub>O/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).

## 20 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 полу-распада *"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 5 mPEG-mal . Реакционную смесь пептид-ПЭГ-mal наносят на катионообменную колонку для удаления остаточных реагентов ПЭГ, а затем наносят на колонку для 10 гель-фильтрации для удаления остаточного свободного пептида. Чистоту, массу и 15 число мест пэглирования 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. 20 Кроме того, сохраняется также селективность активации рецептора VPAC2 по сравнению с VPAC1 и PAC1. Возможно что пэглирование меньшим полиэтиленгликолем (например, линейным 22 кДа ПЭГ) с меньшей вероятностью снизит активность пептида, тогда как больший полиэтиленгликоль (например, разветвленный 43 кДа 25 ПЭГ) более вероятно снизит активность. Однако, больший ПЭГ увеличивает период полураспада в плазме настолько, что возможна одна инъекция в неделю (Haggis, 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 моно- 30 мерный пептид и GST разделяет один сайт узнавания Фактора Xa. Ген, кодирующий сайт узнавания Фактора Xa, слитый с нуклеотидной последовательностью пептида, 35 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 40 ДНК-полимеразы I (Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD). Последовательность ДНК, выбранная для каждого гена, основана на обратной трансляции аминокислотной 45 последовательности, разработанной для каждого пептида. В некоторых случаях ген, кодирующий пептид, получают ПЦР-мутагенезом (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 описаным выше методом. Двухцепочный 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 OD<sub>600</sub> 0,6 - 1,0, а затем клетки инкубируют с 1 мМ 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 ресуспенсионируют 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 Сепароза 4B (Glutathione Sepharose 4B) (Pharmacia) на шейкере в течение ночи при 4°C. Смесь супернатант/смолы 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 Xa (1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 100 мМ NaCl и 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Пептиды отщепляют от колонки добавлением 60 единиц Фактора Xa (Pharmacia) в 1 мл буфера Фактора Xa, 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 A (0,1% ТФУ/H<sub>2</sub>O), 30 мин градиент до буфера B (0,1% ТФУ/ACN (ацетонитрил)), 10 мин Буфер A, 10 мин градиент и 10 мин Буфер A. 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 полипептидов 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-

5 ва измеряют через 15, 30 и 60 минут. Представитель ПЭГилированных пептидов на-  
 стоящего изобретения значительно снижает уровни глюкозы в крови по отношению  
 10 к носителю в IPGTT (внутрибрюшинное исследование переносимости глюкозы),  
 снижение показателя AUC глюкозы (Фиг. 4) составляет 17%-28%. Это указывает на  
 15 то, что пэгилированный пептид пролонгирует активность по снижению уровня глю-  
 козы *in vivo*. В дополнение к активности ПЭГилированных пептидов настоящего  
 изобретения по снижению уровня глюкозы, это также указывает на продление пе-  
 20риода полураспада пептида *in vivo*. PACAP-27 имеет очень короткий период полу-  
 распада *in vivo* (<10 мин). Способность ПЭГилированных пептидов изобретения  
 снижать уровень глюкозы в крови через 3 часа после введения пептида ясно указы-  
 25 вает на то, что пептид присутствует в кровообращении в этот момент времени и, сле-  
 довательно, имеет пролонгированный период полураспада по сравнению с PACAP-  
 30 27.  
 35

#### Пример 7. Сцинтилляционный анализ SPA циклического АМФ

Клетки CHO, экспрессирующие пептид VPAC2, вносят в 96-луночные планшеты с  
 40 плотностью  $8 \times 10^4$  клеток/лунку и выращивают при 37°C в течение 24 часов в среде  
 (αMEM, нуклеозиды, глутамин (Gibco/BRL, Rockville, MD), 5% БЭС (бычья эмбрио-  
 нальная сыворотка), 100 мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 0,4 мг/мл гигромицин и  
 45 1,5 мг/мл генетицин (Geneticin) (Gibco/BRL). Среду удаляют, и планшеты промыва-  
 ют PBS. Клетки инкубируют с пептидом (в 10 мМ Нерес, 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl,  
 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1,2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 25 мМ NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,4) с 1% БЭС и  
 50 100 мкМ IBMX (изобутилметилксантин)) 15 мин при 37°C. Содержание циклическо-  
 го АМФ в клеточных экстрактах определяют при использовании системы прямого  
 сцинтилляционного скрининга цАМФ SPA (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Pis-  
 cataway, NJ). Количество цАМФ в лизатах определяют согласно инструкции к этому  
 набору. Количество цАМФ (в пмоль), produцируемого при каждой концентрации  
 пептида наносят на график и анализируют нелинейной регрессией, используя про-  
 грамму Prizm, для определения величины EC<sub>50</sub> для каждого пептида.

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

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

5 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.

20 **Таблица 1**

Пептид	Последовательность SEQ ID NO.	VPAC2 EC <sub>50</sub> (нМ)	VPAC1 EC <sub>50</sub> (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

25 **Пример 8. Фармацевтическая композиция - составы для внутривенного и под-  
кожного введения**

30 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.

10

**Пример 9. Стабильность составов, включающих пептиды настоящего изобретения**

15

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.

20

25

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

30

35

40

50

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 массспектрометрическую систему Perspective MALDI. Пептид высушивают в лиофилизаторе. Затем пептид (2 мг) конъюгируют с гемоцианином моллюска Keyhole Limpet (KLH) через свободную сульфогидрильную 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 адьюванта 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.

5

96-луночный планшет Immulon 4NBX покрывают С-концевым антителом Morphosys F(ab), специфическим к пептидам настоящего изобретения, и инкубируют в течение 10 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 15 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), 20 считывают оптическую плотность OD<sub>450</sub> (Фиг. 7).

25

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 30 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 гиперхолистеринемия, и ожирения можно использовать следующие исследования.

35

### Метод измерения уровней глюкозы в крови

40

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 45 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-

45

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

5

### **Метод измерения уровней триглицеридов**

10

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).

15

20

### **Метод измерения уровней ЛВП-холестерина**

25

30

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).

35

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

40

45

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).

50

### **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, голодающих 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 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 назначеннную дозу полипептида. Спустя один час после введения в клетки возвращают предварительно взвешенные кормушки с пищей. Поглощение пищи записывают 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.

15

20

25

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

30

#### Исследование постоянного кормления

35

40

45

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 животная 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).

50

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 СО<sub>2</sub> 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

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

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

15 <130> MSB-7295

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

16 <160> 264

20 <170> PatentIn version 3.2

25 <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

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

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <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

50 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

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

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 Arg Tyr  
 20 25 30

10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

15

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 31

25

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

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 Gln Lys Arg Tyr  
 20 25 30

35

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

40

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

50

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

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 Arg  
 20 25 30

10 <210> 8  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

20 <210> 9  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

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 Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr  
 20 25 30

35 <210> 10  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

45 <210> 11  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

10 <400> 12  
 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

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

40 <400> 14  
 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 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 15  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

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

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

15 <400> 17

20 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 Gln Gln Lys Arg  
 20 25 30

<210> 18  
 <211> 30  
 <212> БЕЛЮК  
 <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

<210> 19  
 <211> 30  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 19

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 Arg Arg  
 20 25 30

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

&lt;400&gt; 20

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

5

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

10

<210>	21
<211>	30
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

15

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

20

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

25

<210>	22
<211>	30
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

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

30

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

35

<210>	23
<211>	30
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

&lt;400&gt; 23

40

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

45

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

50

<210>	24
<211>	30
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

&lt;400&gt; 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

&lt;400&gt; 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

&lt;400&gt; 26

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 Gln Lys Met  
 20 25 30

35

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

&lt;400&gt; 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

&lt;400&gt; 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> БЕЛОК  
 <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  
 <212> БЕЛОК  
 <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> БЕЛОК  
 <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

40 <210> 32  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <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

25

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

<400> 35

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

<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

10 <210> 38

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

35

<210> 40

<211> 31

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(31)

40 <223> Ac is acetyl

<400> 40

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

45

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

&lt;400&gt; 41

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

5

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

10

<210>	42														
<211>	29														
<212>	БЕЛОК														
<213>	Homo sapiens														

&lt;400&gt; 42

15

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

20

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

25

<210>	43														
<211>	31														
<212>	БЕЛОК														
<213>	Homo sapiens														

&lt;400&gt; 43

25

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

30

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

35

<210>	44														
<211>	31														
<212>	БЕЛОК														
<213>	Homo sapiens														

&lt;400&gt; 44

40

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

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

45

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

&lt;400&gt; 45

50

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

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

5           <210> 46  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <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

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

20           <210> 47  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 47

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 Thr Ile Lys Gln Lys Arg Tyr  
 20           25           30

35           <210> 48  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 48

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

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

50           <210> 49  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49

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

60           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

<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

25 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

35 <210> 53  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 53

40 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 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

25

<210> 56  
<211> 30  
<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

35

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

40

<210> 57  
<211> 30  
<212> БЕЛОК  
<213> Homo sapiens

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 Arg Arg  
20 25 30

<210> 58  
<211> 30  
<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

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

<400> 59

15 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 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

40 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 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

10 <400> 63  
 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 Leu  
 20 25 30

20 <210> 64  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 64

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 Met  
 20 25 30

35 <210> 65  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 65

40 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 Lys Pro  
 20 25 30

50 <210> 66  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 66

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

55 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  
 <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  
 <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

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 71

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 Tyr  
 20 25 30

10

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

15

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 73

30

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

30

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

35

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

40

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 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

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

<400> 76  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

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

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

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <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

&lt;400&gt; 79

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

5

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

10

<210>	80
<211>	29
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

&lt;400&gt; 80

15

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

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

20

<210>	81
<211>	31
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

25

&lt;400&gt; 81

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

30

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

35

<210>	82
<211>	31
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

&lt;400&gt; 82

40

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

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

45

<210>	83
<211>	30
<212>	БЕЛОК
<213>	Homo sapiens

50

&lt;400&gt; 83

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

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

10  
 <400> 84  
 His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Gln Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln  
 1 5 10 15

15  
 Leu Ala Ala Lys Lys Tyr Leu Gln Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
 20 25 30

20  
 <210> 85  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 85

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 Thr Ile Lys Asn Lys Arg Tyr  
 20 25 30

35  
 <210> 86  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 86

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

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

50  
 <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

55  
 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

<400> 89

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

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

40 <210> 91  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 91

45 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 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

25

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

<400> 94

30

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 Asn Lys Arg  
20 25 30

40

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

45

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 Arg Arg  
20 25 30

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

<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

10 <210> 97  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <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

35 <210> 99  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <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

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

20           <210> 102  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 102

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 Met  
 20                           25                           30

35           <210> 103  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 103

40           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 Lys Pro  
 20                           25                           30

50           <210> 104  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 104

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

60           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

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

<400> 106

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 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

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 109

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

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

15

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 30

25

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 111

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 Asn Arg Ile  
 20 25 30

35

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

40

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 30

50

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 113

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 Asn Arg Ile  
 20 25 30

10 <210> 114  
 <211> 30  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<400> 114

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 Asn Arg Ile  
 20 25 30

20 <210> 115  
 <211> 32  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(32)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль (ПЭГ)

<400> 115

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

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

40 <210> 116  
 <211> 32  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(32)  
 <223> Ac означает ацетил; PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 116

50 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

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

&lt;400&gt; 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

30

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 Arg Cys-PEG  
 20 25 30

40

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

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

&lt;210&gt; 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

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

40                <210> 125  
 <211> 32  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

45                <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(32)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 125

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

<210> 126  
 <211> 31

<212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 126

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

35

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

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 128

45

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

50

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

<210> 129  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

<220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

&lt;400&gt; 129

10 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

15 <210> 130  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

25 <400> 130  
 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 Pro Gln Lys Arg Cys-PEG  
 20 25 30

35 <210> 131  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

45 <400> 131  
 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 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

15 <210> 133  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

25 <400> 133

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 Arg Arg Cys-PEG  
 20 25 30

35 <210> 134  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

45 <400> 134

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 Gln Lys Ala Cys-PEG  
 20 25 30

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

<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

15 <210> 136  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

25 <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

50 <210> 138  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<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

15 <210> 139  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

25 <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

50 <210> 141  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

<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

45

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

50

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

<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

30

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

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

<400> 146

40

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 Trp Cys-PEG  
 20 25 30

50

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

&lt;223&gt; PEG означает полиэтиленгликоль

&lt;400&gt; 147

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

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

15

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt; PEG означает полиэтиленгликоль

20

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

&lt;210&gt; 149

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

35

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt; PEG означает полиэтиленгликоль

&lt;400&gt; 149

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

40

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

45

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Homo sapiens

50

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt; PEG означает полиэтиленгликоль

&lt;400&gt; 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

10

<210> 151  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

25

<400> 151  
 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

30

<210> 152  
 <211> 31  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Homo sapiens

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(31)  
 <223> PEG означает полиэтиленгликоль

40

<400> 152  
 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 Cys-PEG  
 20 25 30

45

<210> 153  
 <211> 123  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

50

<400> 153  
 ggatccatcg aaggtcgtca ctccgacgct gttttcacccg accagtacac gcgtctgcgt 60  
 aaacaggttg ctgcaaagaa atacctgcag tccatcaagc agaagcgtta ctaatgactc 120  
 gag 123

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 241		
<211> 90		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
5 <400> 241		
cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag		60
aaataacctgc agtccatcaa gaacaaggcgt		90
10 <210> 242		
<211> 90		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
15 <400> 242		
cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag		60
aaataacctgc agtccatccc caacaagegt		90
20 <210> 243		
<211> 90		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
25 <400> 243		
cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag		60
aaataacctgc agtccatcca gaacaaggcgt		90
30 <210> 244		
<211> 90		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
35 <400> 244		
cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag		60
aaataacctgc agtccatccg taacaaggcgt		90
40 <210> 245		
<211> 90		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
45 <400> 245		
cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag		60
aaataacctgc agtccatcaa gaaccgtcgt		90
50 <210> 246		
<211> 90		
<212> ДНК		
<213> Homo sapiens		
55 <400> 246		
cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggctgcaaag		60
aaataacctgc agtccatcaa gaacaaggca		90

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

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

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

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 264	cactccgacg ctgtttcac cgaccagtac acgcgtctgc gtaaacagat ggcttccaag	60
5	aaataacctgc agtccatccg taaccgtatc	90

### Формула изобретения

1. Полипептид с активностью агониста рецептора VPAC2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбираемой из группы, состоящей из 10 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.
- 15 3. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.2.
4. Клетка-хозяин, производящая полипептид с активностью агониста рецептора VPAC2, которая содержит вектор экспрессии по п.3.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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 45 группы, состоящей из агонистов PPAR, препаратов сульфонилмочевины, стимуляторов секреции, не являющихся препаратами сульфонилмочевины, ингибиторов альфа-глюкозидазы, инсулиновых сенсибилизаторов, 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.
- 50 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.

5 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.

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

15

20

25

30

35

40

45

50

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
1	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQS1KQKRY
2	Ac - HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQS1KQKRY
3	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1KQKRY
4	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQS1KQK
5	HTEAVFTDQYTRLRKQVAAKKYLQS1KQKRY
6	HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLQDIKQGGT
7	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1KQKR
8	HSDAVFTDQYTRLRKQAAKKYLQTIKQKRY
9	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQTIKQKRY
10	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKYLQS1KQKRY
11	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLQS1KQKRY
12	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAGKKYLQS1KQKR
13	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1KQKR
14	HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLQS1KQKR
15	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQS1KQKR
16	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1PQKR
17	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QQKR
18	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1RQKR
19	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QRR
20	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKA
21	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKF
22	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKH
23	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKI
24	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKK
25	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKL
26	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKM
27	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKP
28	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKQ
29	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKS
30	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKT
31	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKV
32	HSDAVFTDOYTRLRKQMAAKKYLQS1QKW
33	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QKY
34	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAGKKYLQS1QRI
35	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1QRI
36	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQS1QRI
37	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLQS1PQRI
38	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQS1RQRI

Фиг. 1а

Последова- тельность № SEQ ID NO:	Последовательность
39	HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
40	Ac - HTDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
41	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKRY
42	HSDAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQK
43	HTEAVFTDNYTRLRKQVAACKYLQSIKQKRY
44	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLQDIKQGGT
45	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIKQKR
46	HSDAVFTDNYTRLRKQAAKKYLQTIKQKRY
47	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQTIKQKRY
48	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHKYLQSIKQKRY
49	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLQSIKQKRY
50	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIKQKR
51	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIKQKR
52	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLQSIKQKR
53	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLQSIKQKR
54	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIHQKR
55	HSDAVFTDNYTRLRKQMAACKYLQSIQQKR
56	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKR
57	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQRR
58	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKA
59	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKF
60	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKH
61	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKI
62	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKK
63	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKL
64	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKM
65	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKP
66	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKQ
67	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKS
68	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKT
69	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKV
70	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKW
71	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQKY
72	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIHQRI
73	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLQSIHQRI
74	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLQSIHQRI
75	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKYLQSIHQRI
76	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLQSIHQRI

Фиг. 1б

Последовательность № SEQ ID NO:	Последовательность
77	HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY
78	Ac-HTDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY
79	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKRY
80	HSDAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNK
81	HTEAVFTDQYTRLRKQVAACKYLQSIKNKRY
82	HSDAVFTDQYTRLRKQLAALKYLQDIKNNGT
83	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKR
84	HSDAVFTDQYTRLRKQLAALKYLQTIKNKRY
85	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQTIKNKRY
86	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKYLQSIKNKRY
87	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKRY
88	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLQSIKNKR
89	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLQSIKNKR
90	HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLQSIKNKR
91	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIKNKR
92	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIPNKR
93	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIQNKR
94	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIRNKR
95	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNRR
96	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKA
97	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKF
98	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKH
99	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKI
100	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKK
101	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKL
102	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKM
103	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKP
104	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNQ
105	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKS
106	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKT
107	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKV
108	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKW
109	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNKY
110	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIKNRI
111	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLQSIKNRI
112	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIKNRI
113	HSDAVFTDQYTRLRKQMAACKYLQSIIPNRI
114	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIRNRI

Фиг. 1с

Последова- тельность № SEQ ID NO:	Последовательность
115	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKYLQSIKQKRYC-PEG
116	Ac-HTDAVFTDQYTRLRKQVAAKYLQSIKQKRYC-PEG
117	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIKQKRYC-PEG
118	HSDAVFTDQYTRLRKQVAAKYLQSIKQKC-PEG
119	HTEAVFTDQYTRLRKQVAAKYLQSIKQKRYC-PEG
120	HSDAVFTDQYTRLRKQLAVKKYLQDIKQGGTC-PEG
121	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIKQKRC-PEG
122	HSDAVFTDQYTRLRKQLAKYLQTIKQKRYC-PEG
123	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQTIKQKRYC-PEG
124	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAHKYLQSIKQKRYC-PEG
125	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKHYLQSIKQKRYC-PEG
126	HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLQSIKQKRC-PEG
127	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKKYLQSIKQKRC-PEG
128	HSDAVFTDQYTRLRKQMARKKYLQSIKQKRC-PEG
129	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIKQKRC-PEG
130	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIPOKRC-PEG
131	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKRC-PEG
132	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIROKRC-PEG
133	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQRRC-PEG
134	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKAC-PEG
135	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKFC-PEG
136	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKHC-PEG
137	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKIC-PEG
138	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKKC-PEG
139	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKLC-PEG
140	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKMC-PEG
141	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKPC-PEG
142	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKQC-PEG
143	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKSC-PEG
144	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKTC-PEG
145	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKVC-PEG
146	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKWC-PEG
147	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKYLQSIQKYC-PEG
148	HSDAVFTDQYTRLRKQMAGKKYLQSIQRIC-PEG
149	HSDAVFTDQYTRLRKQMAKKYLQSIQRIC-PEG
150	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIQRIC-PEG
151	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIQRIC-PEG
152	HSDAVFTDQYTRLRKQMASKKYLQSIQRIC-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-кодоны    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 TAC ACG 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 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. 3б

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. 3д

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

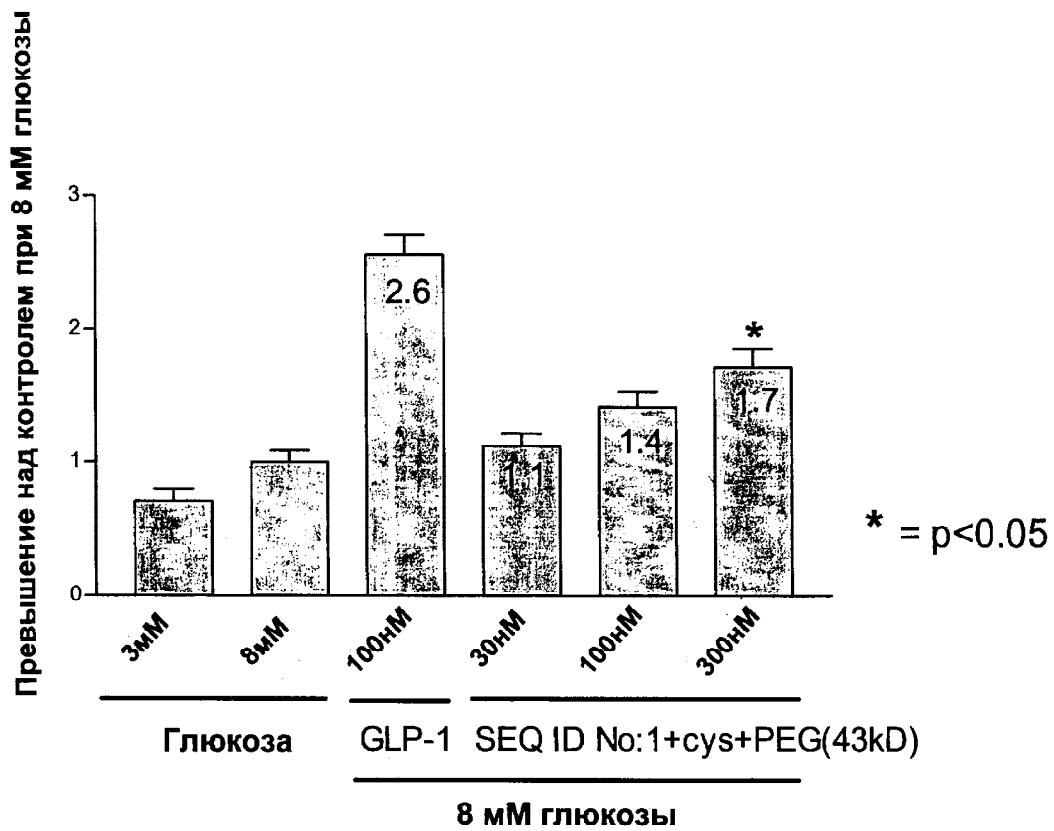
Фиг. 3f

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

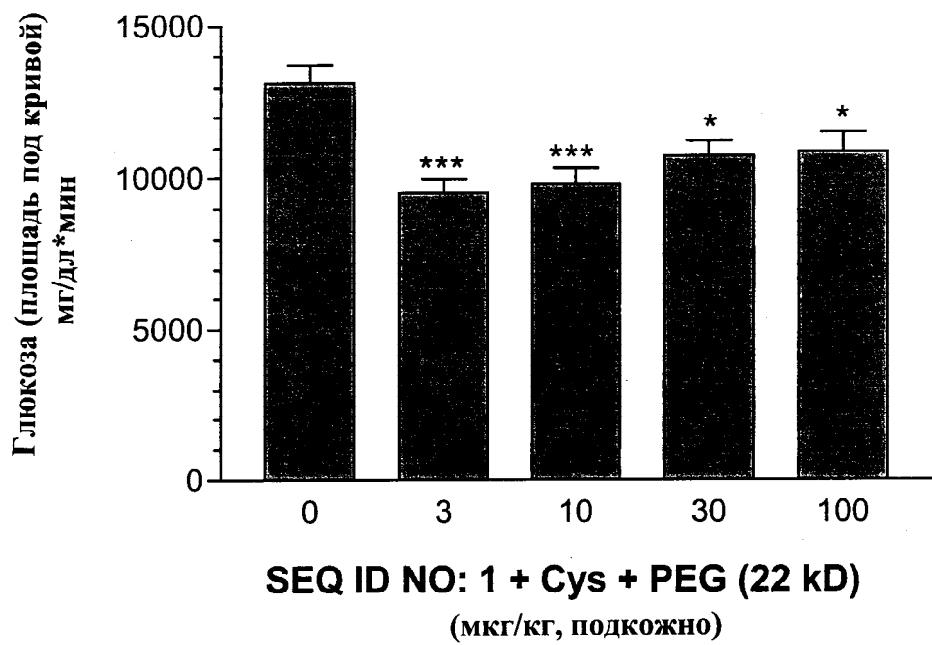
Фиг. 3г

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 AAC 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

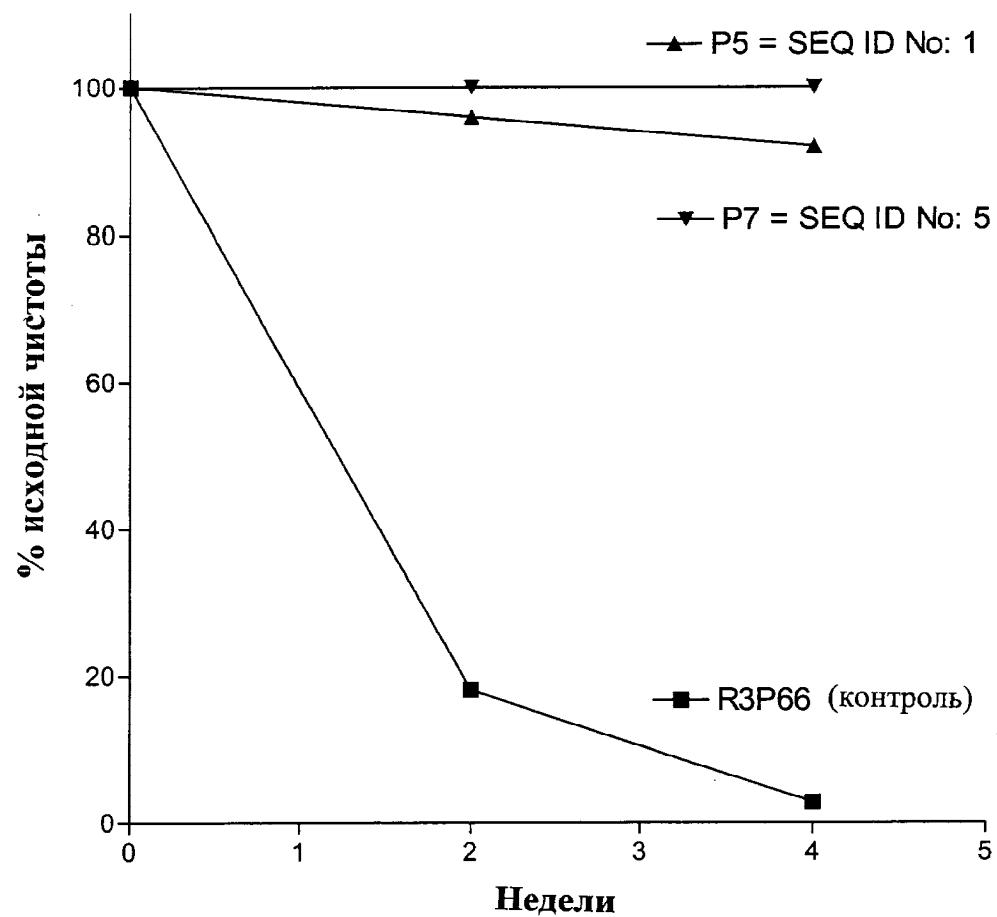
Фиг. 3h



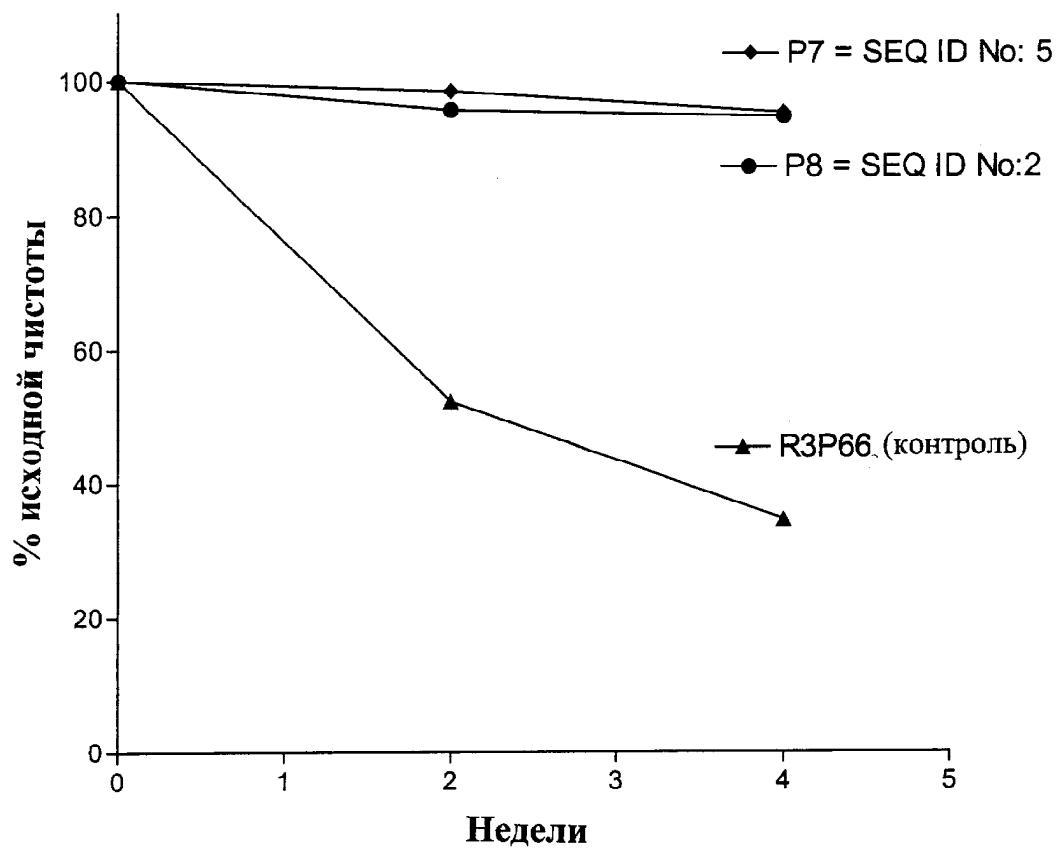
Фиг. 4



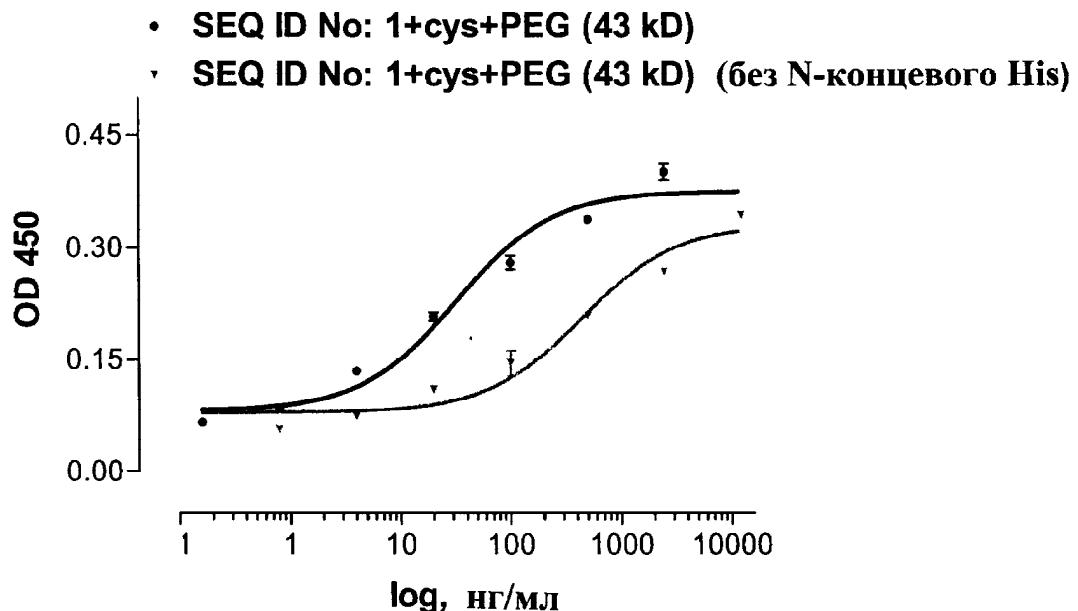
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8