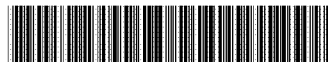




(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20030455A A2

HR P20030455A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 07 K 14/605**
C 07 K 14/765
C 12 N 15/62
A 61 K 38/38
A 61 K 38/26
C 07 K 19/00
A 61 P 3/10

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 05.06.2003.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.08.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US01/43165

Datum podnošenja međunarodne prijave 29.11.2001.

(87) Broj međunarodne objave: WO 02/46227

Datum međunarodne objave 13.06.2002.

(31) Broj prve prijave: 60/251,954

(32) Datum podnošenja prve prijave: 07.12.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelj:

(74) Punomoćnik:

Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, 46285 IN, US
Wolfgang Glaesner, 7512 Fieldstone Court, Indianapolis, 46254 IN, US
Radmila Micanović, 7126 White Oak Trail, Indianapolis, 46236 IN, US
Sheng-Hung Rainbow Tschang, 4963 Riley Mews, Carmel, 46033 IN, US
Silvije HRASTE, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **GLP-1 FUZIJSKI PROTEINI**

(57) Sažetak: Ovaj se izum odnosi na skupinu 1 spojeva nalik glukagonu, koji su spojeni na proteine, a koji imaju učinak produljenja in vivo poluživota peptida. Ti fuzijski proteini mogu se rabiti za liječenje diabetesa mellitusa koji nije ovisan o inzulinu, kao i mnoštva drugih stanja.

HR P20030455A A2

OPIS IZUMA

Ovaj se izum odnosi na peptide koji su nalik glukagonu uključujući njegove analoge i derivate koji su spojeni na proteine, a koji imaju učinak produljenja *in vivo* poluživota peptida. Ti se fuzijski proteini mogu rabiti za liječenje diabetes mellitusa koji nije ovisan o inzulinu, kao i mnoštva drugih stanja.

Peptid 1 nalik glukagonu (GLP-1) je peptid od 37 aminokiselina koji izlučuju L-stanice crijeva kao odgovor na gutanje hrane. Otkriveno je da potiče izlučivanje inzulina (inzulinotropno djelovanje), time izazivajući unos glukoze u stanice, te sniženje razina glukoze u serumu [pogledati, na primjer, Mojsov, S., (1992) *Int. J. Peptide Protein Research*, 40:333-343]. Međutim, GLP-1 ima slabu aktivnost. Naknadno endogeno cijepanje između 6. i 7. položaja stvara djelotvorniji biološki aktivan GLP-1 (7-37)OH peptid. Poznati su brojni analozi i derivati GLP-1, te se ovdje spominju kao "GLP-1 spojevi". Ti analozi GLP-1 uključuju Eksendine, a to su peptidi nađeni u otrovu GILA-čudovišta. Eksendini imaju sekvencu homolognu nativnom GLP-1, te mogu vezati GLP-1 receptor, te započeti kaskadu prijenosa signala koja je odgovorna za brojne aktivnosti koje se pripisuju GLP-1 (7-37)OH.

GLP-1 spojevi imaju mnoštvo fiziološki značajnih aktivnosti. Na primjer, pokazalo se da GLP-1 potiče otpuštanje inzulina, snižava izlučivanje glukagona, inhibira pražnjenje želuca, te pospješuje iskorištenje glukoze. [Nauck, M. A., i sur. (1993) *Diabetologia* 36:741-744; Gutniak, M., i sur. (1992) *New England J. of Med.* 326:1316-1322; Nauck, M. A., i sur., (1993) *J. Clin. Invest.* 91:301-307].

GLP-1 najviše obećava u liječenju diabetesa mellitusa koji nije ovisan o inzulinu (NIDDM). Na tržištu postoje brojni oralni lijekovi za liječenje otpornosti na inzulin koja je povezana uz NIDDM. Kako bolest napreduje, međutim, bolesnici moraju prijeći na liječenja koja potiču oslobađanje inzulina, te na kraju i na liječenja koja uključuju injekcije inzulina. Trenutni lijekovi koji potiču oslobađanje inzulina, međutim, također mogu uzrokovati hipoglikemiju, kao što može i stvarna primjena inzulina. Aktivnost GLP-1, međutim, kontroliraju razine glukoze u krvi. Kada razine padnu do izvjesne granične razine, GLP-1 nije aktivan. Stoga, ne postoji rizik od razvoja hipoglikemije povezane uz liječenje koje obuhvaća GLP-1.

Međutim, korist od terapije koja uključuje GLP-1 peptide ograničena je njihovim brzim uklanjanjem i kratkim poluživotima. Na primjer, GLP-1 (7-37) ima poluživot u serumu na trajanju samo 3 do 5 minuta. GLP-1 (7-36) amid ima vrijeme djelovanja u trajanju oko 50 minuta nakon subkutane primjene. Čak i analozi i derivati koji su otporni na endogeno cijepanje proteazama nemaju poluživot dovoljno dug da bi se izbjegle ponavljane primjene tijekom razdoblja od 24 sata. Brzo uklanjanje terapijskog sredstva je nepovoljno u slučajevima u kojima je poželjno održavanje visoke razine sredstva u krvi tijekom produljenog vremenskog razdoblja, jer će tada biti neophodne ponavljane primjene. Nadalje, spoj s dugim djelovanjem posebno je važan kod dijabetičara čiji je režim prethodnog liječenja uključivao uzimanje samo oralnih lijekova. Tim je bolesnicima često izrazito težak prijelaz na režim koji uključuje višestruke injekcije lijeka.

Ovaj izum prevladava probleme povezane uz isporuku spoja koji ima kratki poluživot u plazmi. Spojevi ovoga izuma obuhvaćaju GLP-1 spojeve spojene na drugi protein koji ima dugi poluživot u cirkulaciji, kao što je Fc dio imunoglobulina ili albumin.

Općenito, upravljanje malim terapijskim peptidima je teško jer čak i male promjene u njihovoj strukturi mogu utjecati na stabilnost i/ili biološku aktivnost. Ovo je posebno istinito za GLP-1 spojeve koji su trenutno u razvoju. Na primjer, GLP-1 (7-37)OH ima sklonost prolaženja kroz konformacijsku promjenu iz strukture primarne alfa uzvojnice u strukturu primarne beta ploče. Taj oblik beta ploče ima za posljedicu agregaciju materijala, za koji se vjeruje da je neaktivan. Stoga je iznenađujuća mogućnost razvijanja biološki aktivnih GLP-1 fuzijskih proteina s produljenim poluživotima. To je bilo posebno neočekivano uzimajući u obzir teškoće rada sa samim GLP-1 (7-37)OH, te ogromnu veličinu fuzijskog partnera u odnosu na mali povezani GLP-1 peptid.

Spojevi ovoga izuma obuhvaćaju heterologne fuzijske proteine koji sadrže prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se izabire iz skupine koja se sastoji od:

- a) humanog albumina;
- b) analoga humanog albumina; te
- c) odsječaka humanog albumina,

te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida.

Spojevi ovoga izuma također obuhvaćaju heterologni fuzijski protein koji sadrži prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se izabire iz skupine koja se sastoji od:

- 5 a) humanog albumina;
b) analoga humanog albumina; te
c) odsječaka humanog albumina,

10 te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida putem veznog peptida. Preferira se da se vezni peptid izabere iz skupine koja se sastoji od:

- a) peptida bogatog glicinom;
b) peptida koji ima sekvencu $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_n$ pri čemu je n 1, 2, 3, 4, 5 ili 6; te
c) peptida koji ima sekvencu $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_3$.

15 Dodatni spojevi ovoga izuma uključuju heterologne fuzijske proteine koji sadrže prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se izabire iz skupine koja se sastoji od:

- 20 a) Fc dijela imunoglobulina;
b) analoga Fc dijela imunoglobulina; te
c) odsječaka Fc dijela imunoglobulina,

25 te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida. GLP-1 spoj može se spojiti na drugi polipeptid putem veznog peptida. Preferira se da se vezni peptid izabere iz skupine koja se sastoji od:

- a) peptida bogatog glicinom;
b) peptida koji ima sekvencu $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_n$ pri čemu je n 1, 2, 3, 4, 5 ili 6; te
c) peptida koji ima sekvencu $[\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser}]_3$.

30 Općenito se preferira da GLP-1 spoj koji čini dio heterolognog fuzijskog proteina nema više od 6 aminokiselina koje se razlikuju od odgovarajuće aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH, ili Eksendinu-4. Čak i više se preferira da GLP-1 spoj nema više od 5 aminokiselina koje se razlikuju od odgovarajuće aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH, ili Eksendinu-4. Najviše se preferira da GLP-1 spoj nema više od 4, 3 ili 2 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajuće aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH, ili Eksendinu-4. Po mogućnosti, GLP-1 spoj koji čini dio heterolognog fuzijskog proteina sadrži glicin ili valin na položaju 8.

Ovaj izum također uključuje polinukleotide koji kodiraju ovdje opisane heterologne fuzijske proteine, vektore koji sadrže te polinukleotide, te stanice domaćine koje su transfektirane ili promijenjene s vektorima koji su ovdje opisani. Također je uključen proces za proizvodnju heterolognog fuzijskog proteina koji obuhvaća korake transkripcije i translacije ovdje opisanih polinukleotida pod uvjetima u kojima dolazi do ekspresije heterolognog fuzijskog proteina u mjerljivim količinama.

45 Ovaj izum također obuhvaća postupak za normaliziranje razina glukoze u krvi sisavaca kojima je to potrebno, a sastoji se od primjene terapijski učinkovite količine ovdje opisanog heterolognog fuzijskog proteina.

Izum je nadalje slikovito prikazan pomoću sljedećih slika:

Slika 1: IgG1 Fc aminokiselinska sekvenca koja obuhvaća glavno područje, CH2 i CH3 domene.

Slika 2: Aminokiselinska sekvenca humanog serumskog albumina.

50 Slika 3: A. SDS-PAGE gel i imunoblot istog gela koji slikovito prikazuju molekulska težina IgG1-Fc i GLP-1-Fc fuzijskih proteina (Red 1, MT standardi; Red 2, Pročišćeni Fc; Red 3, Mockov transfektirani medij; Red 4, Val⁸-GLP-1-Fc; Red 5, Eksendin-4-Fc) B. SDS-PAGE gel i imunoblot istog gela koji slikovito prikazuju molekulska težina humanih HSA i GLP-1-HSA fuzijskih proteina (Red 1, MT standardi; Red 2, Pročišćeni HSA; Red 3, Mockov transfektirani medij; Red 4, Val⁸-GLP-1-HSA; Red 5, Val⁸-GLP-1-[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃-HSA; Red 6, Eksendin-4-HSA; Red 7, Eksendin-4-[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃-HSA).

55 Slika 4: SDS-PAGE gel pročišćenog Fc, albumina, te GLP-1 fuzijskih proteina (Red 1, MT standardi; Red 2, pročišćeni Fc; Red 3, Val⁸-GLP-1-Fc; Red 4, Eksendin-4-Fc; Red 5, MT standard; Red 6, Val⁸-GLP-1-HSA; Red 7, Eksendin-4-HSA; Red 8, Eksendin-4-[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃-HSA).

Slika 5: Ekspresijski vektor za kloniranje koji sadrži Fc područja slikovito prikazana na slici 1.

60 Slika 6: Ekspresijski vektor za kloniranje koji sadrži albuminsku sekvencu slikovito prikazanu na slici 2.

Slika 7: Ekspresijski vektor za kloniranje koji sadrži DNA koja kodira vezni peptid od 15 aminokiselina spojeno u okviru, te 5' albuminske sekvence slikovito prikazane na slici 2.

Slika 8: *In vitro* ovisnost aktivnosti GLP-1 fuzijskih proteina o dozi.

Slika 9: Farmakokinetika GLP-1 Fc i HSA fuzijskih proteina.

5 Slika 10: Glukodinamički odgovor na Eksendin-Fc kod dva psa na normalnoj dijetei.

Slika 11: Inzulintropni odgovor na Eksendin-Fc kod dva psa na normalnoj dijetei.

Slika 12: DNA sekvenca koja kodira Fc područje humanog IgG1.

Slika 13: DNA sekvenca koja kodira humani albuminski protein.

10 Heterologni fuzijski proteini ovoga izuma sadrže GLP-1 spoj spojen na humani albumin, analog humanog albumina, odsječak humanog albumina, Fc dio imunoglobulina, analog Fc dijela imunoglobulina, ili odsječak Fc dijela imunoglobulina. C-završetak GLP-1 spoja može se izravno spojiti, ili spojiti putem veznog peptida, na N-završetak albumina ili Fc proteina. Ti heterologni fuzijski proteini biološki su aktivni i imaju povećani poluživot u usporedbi s nativnim GLP-1.

15 Preferira se da GLP-1 spojevi koji čine dio heterolognih fuzijskih proteina obuhvaćaju polipeptide koji imaju od oko dvadeset pet do oko trideset devet aminokiselina koje se prirodno pojavljuju ili koje se ne pojavljuju prirodno, a koje su dovoljno homologne nativnom GLP-1 (7-37)OH, tako da ispoljavaju inzulintropno djelovanje vezanjem na GLP-1 receptor na β -stanicama u pankreasu. GLP-1 spoj tipično se sastoji od polipeptida koji sadrži aminokiselinsku sekvencu
20 GLP-1 (7-37)OH, analoga GLP-1 (7-37)OH, odsječka GLP-1 (7-37)OH ili odsječka analoga GLP-1 (7-37)OH. GLP-1 (7-37)OH ima aminokiselinsku sekvencu SEQ ID NO: 1:

```

      7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-
29  30  31  32  33  34  35  36  37
Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly
(SEQ ID NO: 1)

```

25 Kako je uobičajeno u struci, amino završetku GLP-1 (7-37)OH dodijeljen je broj ostatka 7, a karboksi završetku, broj 37. Ostale aminokiseline u polipeptidu uzastopno su obilježene brojevima, kao što je prikazano u SEQ ID NO: 1. Na primjer, položaj 12 je fenilalanin, a položaj 22 je glicin.

30 GLP-1 spojevi također obuhvaćaju "GLP-1 odsječke". GLP-1 odsječak je polipeptid dobiven nakon odcjepljivanja jedne ili više aminokiselina s N-završetka i/ili C-završetka GLP-1 (7-37)OH ili njegovog analoga ili derivata. Nomenklatura koja se rabi za opisivanje GLP-1 (7-37)OH također se može primijeniti na GLP-1 odsječke. Na primjer, GLP-1

(9-36)OH označava GLP-1 odsječak dobiven odcjepljivanjem dvije aminokiseline s N-završetka, te jedne aminokiseline s C-završetka. Aminokiseline u odsječku obilježene su istim brojem kao i odgovarajuće aminokiseline u GLP-1

35 (7-37)OH. Na primjer, N-terminalna glutaminska kiselina u GLP-1 (9-36)OH nalazi se na položaju 9; položaj 12 zauzima fenilalanin; a položaj 22 zauzima glicin, kao i u GLP-1 (7-37)OH. Za GLP-1 (7-36)OH, glicin na položaju 37 u GLP-1 (7-37)OH je izbrisan.

40 GLP-1 spojevi također obuhvaćaju polipeptide u koje su dodane jedna ili više aminokiselina na N-završetak i/ili C-završetak GLP-1 (7-37)OH, ili njegovih odsječaka ili analoga. Preferira se da GLP-1 spojevi tog tipa imaju do oko trideset devet aminokiselina. Aminokiseline u "produženom" GLP-1 spoju obilježene su istim brojem kao i odgovarajuće aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH. Na primjer, N-terminalna aminokiselina GLP-1 spoja dobivenog dodavanjem dvije aminokiseline na N-završetak GLP-1 (7-37)OH nalazi se na položaju 5; a C-terminalna
45 aminokiselina GLP-1 spoja dobivenog dodavanjem jedne aminokiseline na C-završetak GLP-1 (7-37)OH nalazi se na položaju 38. Stoga položaj 12 zauzima fenilalanin, a položaj 22 zauzima glicin u oba ovako "produžena" GLP-1 spoja, kao i u GLP-1 (7-37)OH. Aminokiseline 1-6 u produženom GLP-1 spoju po mogućnosti su iste kao, ili konzervativne zamjene aminokiseline na odgovarajućem položaju GLP-1 (1-37)OH. Aminokiseline 38-45 u produženom GLP-1 spoju po mogućnosti su iste kao, ili konzervativne zamjene aminokiseline na odgovarajućem položaju glukagona ili Eksendina-4.
50

GLP-1 spojevi ovoga izuma obuhvaćaju "GLP-1 analoge". GLP-1 analog dovoljno je homologan s GLP-1 (7-37)OH ili odsječkom GLP-1 (7-37)OH, tako da analog ima inzulinotropno djelovanje. Po mogućnosti, GLP-1 analog ima aminokiselinsku sekvencu spoja GLP-1 (7-37)OH ili njegovog odsjeka, izmijenjenu tako da se od jedne, dvije, tri, četiri ili pet aminokiselina razlikuje od aminokiselina na odgovarajućem položaju GLP-1 (7-37)OH ili odsjeka GLP-1 (7-37)OH. U nomenklaturi koja se ovdje rabi za označavanje GLP-1 spojeva, zamjenska aminokiselina i njen položaj naznačeni su ispred roditeljske strukture. Na primjer, Glu²²-GLP-1 (7-37)OH označava GLP-1 spoj u kojem je glicin koji se normalno nalazi na položaju 22 GLP-1 (7-37)OH zamijenjen s glutaminskom kiselinom; Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH označava GLP-1 spoj u kojem su alanin koji se normalno nalazi na položaju 8 i glicin koji se normalno nalazi na položaju 22 GLP-1 (7-37)OH zamijenjeni s valinom, odnosno glutaminskom kiselinom.

GLP-1 spojevi ovoga izuma također uključuju "GLP-1 derivate". GLP-1 derivat definira se kao molekula koja ima aminokiselinsku sekvencu GLP-1 ili analoga GLP-1, ali dodatno ima kemijske preinake jedne ili više svojih aminokiselinskih postraničnih skupina, α -ugljikovih atoma, terminalnih amino skupina, ili terminalnih karboksilnih skupina. Kemijske preinake uključuju, ali bez ograničenja, dodavanje kemijskih skupina, stvaranje novih veza, te uklanjanje kemijskih skupina. Preinake na aminokiselinskim postraničnim skupinama uključuju, bez ograničenja, aciliranje lizinskih ϵ -amino skupina, N-alkiliranje arginina, histidina, ili lizina, alkiliranje glutaminske ili asparaginske karboksilne kiseline skupine, te deamidaciju glutamina ili asparagina. Preinake terminalne amino skupine uključuju, bez ograničenja, preinake dez-amina, N-nižih alkila, N-di-nižih alkila, te N-acila. Preinake terminalne karboksi skupine uključuju, bez ograničenja, preinake amida, nižih alkil amida, dialkil amida, te nižih alkil estera. Niži alkil je C₁-C₄ alkil. Nadalje, jedna ili više postraničnih skupina, ili terminalnih skupina, može se zaštititi pomoću zaštitnih skupina koje su poznate proteinskom kemičaru s osnovnim iskustvom. α -ugljik aminokiseline može se mono- ili dimetilirati.

Bilo koji GLP-1 spoj može biti dio heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma sve dok je GLP-1 spoj sposoban vezati i poticati prenošenje signala preko GLP-1 receptora. Vezanje na GLP-1 receptor i prenošenje signala može se procijeniti pomoću *in vitro* testova poput onih koji su opisani u EP 619,322, odnosno U.S. Patent-u Br. 5,120,712.

Brojni aktivni GLP-1 odsjecci, analozi i derivati poznati su u struci, te bilo koji od tih analoga i derivata također može biti dio heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma. Ovdje su dani i neki primjeri novih GLP-1 analoga, kao i GLP-1 analoga i derivata koji su poznati u struci.

Neki GLP-1 analozi i GLP-1 odsjecci poznati u struci uključuju, na primjer, GLP-1 (7-34) i GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), Gln⁹-GLP-1 (7-37), D-Gln⁹-GLP-1 (7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37), te Lys¹⁸-GLP-1 (7-37). GLP-1 analozi poput GLP-1 (7-34) i GLP-1 (7-35) otkriveni su u U.S. Patent-u Br. 5,118,666. GLP-1 koji su dobiveni biološkim postupkom, a koji imaju inzulinotropna svojstva, poput GLP-1 (7-36) također su poznati. Ostali poznati biološki aktivni GLP-1 spojevi otkriveni su u U.S. Patent-u Br. 5,977,071 Hoffmann-a i sur., U.S. Patent-u Br. 5,545,618 Buckley-a i sur., te kod Adelhorst-a i sur., *J. Biol. Chem.* 269:6275 (1994).

Preferirana skupina GLP-1 analoga sastavljena je od GLP-1 analoga koji su prikazani formulom I (SEQ ID NO: 2)

7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
His	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Phe	Thr	Xaa	Asp	Xaa	Xaa
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
40	41	42	43	44	45					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa					

Formula I (SEQ ID NO: 2)

pri čemu:

Xaa na položaju 8 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 9 je Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 11 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

- Xaa na položaju 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, ili Lys;
 Xaa na položaju 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr, ili Lys;
 5 Xaa na položaju 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, ili Lys;
 Xaa na položaju 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr, ili Lys;
 Xaa na položaju 21 je Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, ili Lys;
 10 Xaa na položaju 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, ili His;
 Xaa na položaju 27 je Leu, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 15 Xaa na položaju 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, ili Lys;
 Xaa na položaju 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, ili His;
 Xaa na položaju 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
 20 Xaa na položaju 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His;
 Xaa na položaju 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
 Xaa na položaju 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;
 Xaa na položaju 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;
 Xaa na položaju 40 je Gly, Asp, Glu, ili Lys, ili je izbrisan;
 25 Xaa na položaju 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
 Xaa na položaju 42 je Ser, Pro, Lys, Glu, ili Asp, ili je izbrisan;
 Xaa na položaju 43 je Ser, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
 Xaa na položaju 44 je Gly, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
 te
 30 Xaa na položaju 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

uz uvjet da se pri brisanju aminokiseline na položaju 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, ili 44, svaka aminokiselina nizvodno od te aminokiseline također izbriše.

- 35 Preferira se da GLP-1 spoj prikazan formulom I sadrži manje od šest aminokiselina koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH ili Eksendinu-4. Još se više preferira da se manje od pet aminokiselina razlikuje od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH ili Eksendinu-4. Čak se i više preferira da se manje od četiri aminokiseline razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH ili Eksendinu-4.
- 40 GLP-1 spojevi ovoga izuma uključuju derivate formule I poput njenih C-1-6-estera, ili amida, ili C-1-6-alkilamida, ili C-1-6-dialkilamida. WO99/43706 opisuje derivate GLP-1 spojeva prikazanih formulom I, te je ovdje spominjanjem obuhvaćen u cjelosti. Spojevi prikazani formulom I koji su derivatizirani kako je opisano u WO99/43706, kao i izvorni, obuhvaćeni su ovim izumom.
- 45 Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva sastavljena je od GLP-1 analoga prikazanih formulom II (SEQ ID NO: 3):

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

Formula II (SEQ ID NO: 3)

pri čemu:

Xaa na položaju 7 je: L-histidin, D-histidin, dezamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hidroksi-histidin, homohistidin, α -fluorometil-histidin ili α -metil-histidin;

- Xaa na položaju 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;
 Xaa na položaju 9 je: Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu, ili His;
 Xaa na položaju 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, ili His;
 Xaa na položaju 12 je: His, Trp, Phe, ili Tyr;
 5 Xaa na položaju 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu, ili Ala;
 Xaa na položaju 18 je: His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala, ili Lys;
 Xaa na položaju 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;
 Xaa na položaju 23 je: His, Asp, Lys, Glu, Gln, ili Arg;
 Xaa na položaju 24 je: Glu, Arg, Ala, ili Lys;
 10 Xaa na položaju 26 je: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu, ili His;
 Xaa na položaju 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ili Lys;
 Xaa na položaju 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;
 Xaa na položaju 31 je: Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp, ili Lys;
 Xaa na položaju 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, ili Glu;
 15 Xaa na položaju 34 je: Glu, Lys, ili Asp;
 Xaa na položaju 35 je: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ili Glu;
 Xaa na položaju 36 je: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu, ili His;
 R na položaju 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, ili je izbrisan.

- 20 Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva sastavljena je od GLP-1 analoga prikazanih formulom III (SEQ ID NO: 4):

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

formula III (SEQ ID NO: 4)

pri čemu:

- Xaa na položaju 7 je: L-histidin, D-histidin, dezamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hidroksi-histidin, homohistidin, α -fluorometil-histidin ili α -metil-histidin;
 25 Xaa na položaju 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;
 Xaa na položaju 11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, ili His;
 Xaa na položaju 12 je: His, Trp, Phe, ili Tyr;
 Xaa na položaju 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, ili Ala;
 30 Xaa na položaju 22: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;
 Xaa na položaju 23 je: His, Asp, Lys, Glu, ili Gln;
 Xaa na položaju 24 je: Glu, His, Ala, ili Lys;
 Xaa na položaju 25 je: Asp, Lys, Glu, ili His;
 Xaa na položaju 27 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ili Lys;
 35 Xaa na položaju 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;
 Xaa na položaju 33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, ili Glu;
 Xaa na položaju 34 je: Glu, Lys, ili Asp;
 Xaa na položaju 35 je: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ili Glu;
 Xaa na položaju 36 je: Arg, Glu, ili His;
 40 R na položaju 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, ili je izbrisan.

Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva sastavljena je od GLP-1 analoga prikazanih formulom IV (SEQ ID NO: 5):

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

formula IV (SEQ ID NO: 5)

pri čemu:

Xaa na položaju 7 je: L-histidin, D-histidin, dezamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hidroksi-histidin, homohistidin, α -fluorometil-histidin ili α -metil-histidin;

5 Xaa na položaju 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met ili Thr;

Xaa na položaju 12 je: His, Trp, Phe, ili Tyr;

Xaa na položaju 16 je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, ili Ala;

Xaa na položaju 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;

Xaa na položaju 23 je: His, Asp, Lys, Glu, ili Gln;

10 Xaa na položaju 26 je: Asp, Lys, Glu, ili His;

Xaa na položaju 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;

Xaa na položaju 35 je: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ili Glu;

R na položaju 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, ili je izbrisan.

15 Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva sastavljena je od GLP-1 analoga prikazanih formulom V (SEQ ID NO: 6):

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

formula V (SEQ ID NO: 6)

pri čemu:

Xaa na položaju 7 je: L-histidin, D-histidin, dezamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hidroksi-histidin, homohistidin, α -fluorometil-histidin ili α -metil-histidin;

20 Xaa na položaju 8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;

Xaa na položaju 22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;

Xaa na položaju 23 je: His, Asp, Lys, Glu, ili Gln;

Xaa na položaju 24 je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ili Lys;

Xaa na položaju 30 je: Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;

25 R na položaju 37 je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, ili je izbrisan.

Preferirani GLP-1 spojevi prikazani formulama I, II, III, IV, te V obuhvaćaju GLP-1 analoge ili odsječke GLP-1 analoga, pri čemu analozi ili odsječci sadrže aminokiselinu drugačiju od alanina na položaju 8 (analozi položaja 8). Preferira se da ti analozi položaja 8 sadrže jednu ili više dodatnih promjena na položajima 9, 11, 12, 16, 18, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, te 37 u usporedbi s odgovarajućom aminokiselinom nativnog GLP-1 (7-37)OH. Također se preferira da ti analozi imaju 6 ili manje promjena u usporedbi s odgovarajućim aminokiselinama u nativnom GLP-1 (7-37)OH ili GLP-1 (7-36)OH. Još povoljniji analozi imaju 5 ili manje promjena u usporedbi s odgovarajućim aminokiselinama u nativnom GLP-1 (7-37)OH ili GLP-1 (7-36)OH, ili imaju 4 ili manje promjena u usporedbi s odgovarajućim aminokiselinama u nativnom GLP-1 (7-37)OH ili GLP-1 (7-36)OH. Još se i više preferira da ti analozi imaju 3 ili manje promjena u usporedbi s odgovarajućim aminokiselinama u nativnom GLP-1 (7-37)OH ili GLP-1 (7-36)OH. Najpovoljnije je da ti analozi imaju 2 ili manje promjena u usporedbi s odgovarajućim aminokiselinama u nativnom GLP-1 (7-37)OH.

40 Nadeno je da spojevi prikazani formulama II, III, IV i V imaju smanjenu sklonost agregaciji i stvaranju netopljivih oblika. To je također važno vezano uz fuzijske proteine, gdje relativno mali GLP-1 peptid mora održavati aktivnu

strukturu unatoč spajanju na mnogo veći protein. Preferirani GLP-1 spojevi prikazani formulama II, III, IV, te V obuhvaćeni u fuzijskim proteinima ovog izuma sadrže GLP-1 analoge ili odsječke GLP-1 analoga u kojima su glicin na položaju 22, te po mogućnosti alanin na položaju 8 zamijenjeni s nekom drugom aminokiselinom.

- 5 Kada je na položaju 22 asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, arginin ili lizin, na položaju 8 je po mogućnosti glicin, valin, leucin, izoleucin, serin, treonin ili metionin, a još pogodnije valin ili glicin. Kada je na položaju 22 sulfonska kiselina poput cisteina, na položaju 8 po mogućnosti je glicin, valin, leucin, izoleucin, serin, treonin ili metionin, a još pogodnije valin ili glicin.

- 10 Ostali preferirani GLP-1 spojevi uključuju GLP-1 analoge prikazane formulom IV (SEQ ID NO: 5), pri čemu analozi imaju sekvencu GLP-1 (7-37)OH, osim što je aminokiselina na položaju 8 po mogućnosti glicin, valin, leucin, izoleucin, serin, treonin, ili metionin, a pogodnije valin ili glicin, a na položaju 30 je glutaminska kiselina, asparaginska kiselina, serin, ili histidin, a pogodnije glutaminska kiselina.

- 15 Ostali preferirani GLP-1 spojevi uključuju GLP-1 analoge prikazane formulom IV (SEQ ID NO: 5), pri čemu analozi imaju sekvencu GLP-1 (7-37)OH, osim što je aminokiselina na položaju 8 po mogućnosti glicin, valin, leucin, izoleucin, serin, treonin, ili metionin, a pogodnije valin ili glicin, a na položaju 37 je histidin, lizin, arginin, treonin, serin, glutaminska kiselina, asparaginska kiselina, triptofan, tirozin, fenilalanin, a pogodnije histidin.

- 20 Ostali preferirani GLP-1 spojevi uključuju GLP-1 analoge prikazane formulom IV (SEQ ID NO: 5), pri čemu analozi imaju sekvencu GLP-1 (7-37)OH, osim što je aminokiselina na položaju 8 po mogućnosti glicin, valin, leucin, izoleucin, serin, treonin, ili metionin, a pogodnije valin ili glicin, te na položaju 22 glutaminska kiselina, lizin, asparaginska kiselina, ili arginin, a pogodnije glutaminska kiselina ili lizin, a na položaju 23 je lizin, arginin, glutaminska kiselina, asparaginska kiselina, te histidin, a pogodnije lizin ili glutaminska kiselina.

- 25 Ostali preferirani GLP-1 spojevi uključuju GLP-1 analoge prikazane formulom V (SEQ ID NO: 6), pri čemu analozi imaju sekvencu GLP-1 (7-37)OH, osim što je aminokiselina na položaju 8 po mogućnosti glicin, valin, leucin, izoleucin, serin, treonin, ili metionin, a pogodnije valin ili glicin, te na položaju 22 glutaminska kiselina, lizin, asparaginska kiselina, ili arginin, a pogodnije glutaminska kiselina ili lizin, a na položaju 27 je alanin, lizin, arginin,
- 30 triptofan, tirozin, fenilalanin, ili histidin, a pogodnije alanin.

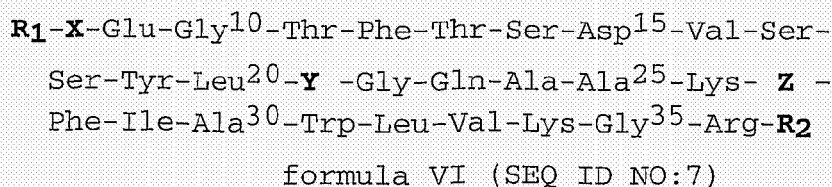
- 35 Ostali preferirani GLP-1 spojevi uključuju GLP-1 analoge prikazane formulom II, pri čemu analozi imaju sekvencu GLP-1 (7-37)OH, osim što se aminokiselina na položaju 8, te jedna, dvije ili tri aminokiseline izabrane iz skupine koja se sastoji od položaja 9, položaja 11, položaja 12, položaja 16, položaja 18, položaja 22, položaja 23, položaja 24, položaja 26, položaja 27, položaja 30, položaja 31, položaja 33, položaja 34, položaja 35, položaja 36, te položaja 37, razlikuju od aminokiseline na odgovarajućem položaju nativnog GLP-1 (7-37)OH.

Ostali preferirani GLP-1 spojevi prikazani formulom II uključuju:

Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-37)OH,
 Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-
 37)OH, Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-
 Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-
 GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-
 37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH,
 Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-
 GLP-1(7-36)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Arg²²-GLP-1(7-36)OH,
 Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Cys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-
 1(7-36)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-
 36)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)OH,
 Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-
 Arg²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)OH, Gly⁸-Cys²²-
 GLP-1(7-36)OH, Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²³-GLP-1(7-
 37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-
 His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His²⁴-GLP-1(7-37)OH, Lys²⁴-GLP-
 1(7-37)OH, Val⁸-Lys²⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys²³-GLP-1(7-
 37)OH, Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-
 Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Asp³⁰-GLP-
 1(7-37)OH, Gly⁸-Asp³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH,
 Val⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gln³⁰-GLP-1(7-37)OH, Tyr³⁰-

GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Tyr³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ser³⁰-GLP-1(7-37)OH, His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁰-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁴-GLP-1(7-37)OH, Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ala³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Gly³⁴-GLP-1(7-37)OH, Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Ala³⁵-GLP-1(7-37)OH, Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH, Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Pro³⁵-GLP-1(7-37)OH, Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Lys²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Gly³⁴-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH, te Gly⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH.

Još jedna preferirana skupina GLP-1 analoga i derivata za uporabu u ovome izumu sastavljena je od molekula prikazanih formulom VI (SEQ ID NO: 7)



pri čemu: R₁ se izabire iz skupine koja se sastoji od L-histidina, D-histidina, dezamino-histidina, 2-aminohistidina, β-hidroksi-histidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina, te alfa-metil-histidina; X se izabire iz skupine koja se sastoji od Ala, Gly, Val, Thr, Ile, te alfa-metil-Ala; Y se izabire iz skupine koja se sastoji od Glu, Gln, Ala, Thr, Ser, te Gly; Z se izabire iz skupine koja se sastoji od Glu, Gln, Ala, Thr, Ser, te Gly; a R₂ je Gly-OH.

Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva za uporabu u ovom izumu otkrivena je u WO 91/11457, te se prvenstveno sastoji od GLP-1 (7-34), GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), ili GLP-1 (7-37), ili njihovog amidnog oblika, te njihovih farmaceutski prihvatljivih soli, koji imaju barem jednu izmjenu izabranu iz skupine koja se sastoji od:

supstitucije glicina, serina, cisteina, treonina, asparagina, glutamina, tirozina, alanina, valina, izoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, arginina, ili D-lizina umjesto lizina na položaju 26 i/ili položaju 34; ili supstitucije glicina, serina, cisteina, treonina, asparagina, glutamina, tirozina, alanina, valina, izoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, lizina ili D-arginina umjesto arginina na položaju 36;

supstitucije aminokiseline koja je otporna na oksidaciju umjesto triptofana na položaju 31;

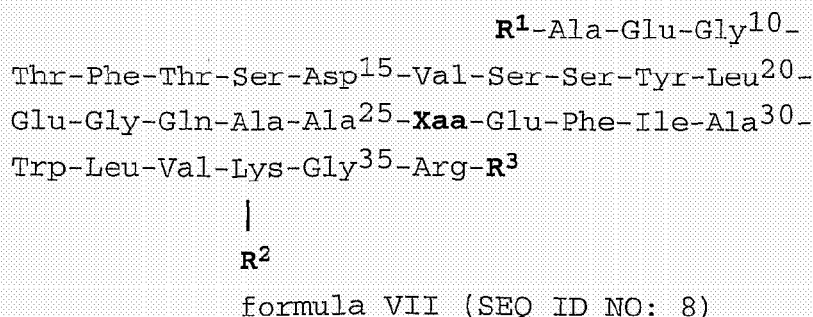
supstitucije barem jednog od: tirozina umjesto valina na položaju 16; lizina umjesto serina na položaju 18; asparaginske kiseline umjesto glutaminske kiseline na položaju 21; serina umjesto glicina na položaju 22; arginina umjesto glutamina na položaju 23; arginina umjesto alanina na položaju 24; te glutamina umjesto lizina na položaju 26; te

supstitucije barem jednog od: glicina, serina, ili cisteina umjesto alanina na položaju 8; asparaginske kiseline, glicina, serina, cisteina, treonina, asparagina, glutamina, tirozina, alanina, valina, izoleucina, leucina, metionina, ili fenilalanina umjesto glutaminske kiseline na položaju 9; serina, cisteina, treonina, asparagina, glutamina, tirozina, alanina, valina, izoleucina, leucina, metionina, ili fenilalanina umjesto glicina na položaju 10; te glutaminske kiseline umjesto asparaginske kiseline na položaju 15; i

supstitucije glicina, serina, cisteina, treonina, asparagina, glutamina, tirozina, alanina, valina, izoleucina, leucina, metionina, ili fenilalanina, ili D ili N-aciliranog ili alkiliranog oblika histidina umjesto histidina na položaju 7; pri čemu, kod supstitucija (a), (b), (d) i (e), supstituirane aminokiseline mogu prema izboru biti u D-obliku, a aminokiseline supstituirane na položaju 7 mogu prema izboru biti u N-aciliranom ili N-alkiliranom obliku.

Kako je moguće da je enzim, dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV), odgovoran za zapaženu naglu *in vivo* inaktivaciju primjenjenog GLP-1, [pogledati, na primjer, Mentlein, R., i sur., *Eur. J. Biochem.*, 214:829-835 (1993)], preferiraju se GLP-1 analozi i derivati koji su zaštićeni od djelovanja DPP IV vezano uz fuzijske proteine, te se više preferiraju i fuzijski proteini u kojima je GLP-1 spoj Gly⁸-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, α-metil-Ala⁸-GLP-1 (7-37)OH, ili Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37)OH.

Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva za uporabu u ovom izumu sastoji se od spojeva prikazanih formulom VII (SEQ ID NO: 8) koji su zahtjevani u U.S. Patent-u Br. 5,512,549, koji je ovdje izričito obuhvaćen spominjanjem.



pri čemu se R¹ izabire iz skupine koja se sastoji od 4-imidazopropionila, 4-imidazoacetila, ili 4-imidazo-α,α-dimetil-acetila; R² se izabire iz skupine koja se sastoji od C₆-C₁₀ nerazgranatog acila, ili je odsutan; R³ se izabire iz skupine koja se sastoji od Gly-OH ili NH₂; a Xaa je Lys ili Arg.

Pogodniji spojevi prikazani formulom IV za uporabu u ovom izumu oni su u kojima je Xaa Arg, a R² je C₆-C₁₀ nerazgranati acil. Čak i više preferirani spojevi prikazani formulom IV za uporabu u ovom izumu oni su u kojima je Xaa Arg, R² je C₆-C₁₀ nerazgranati acil, a R³ je Gly-OH. Ostali izrazito preferirani spojevi prikazani formulom IV za uporabu u ovom izumu oni su u kojima je Xaa Arg, R² je C₆-C₁₀ nerazgranati acil, R³ je Gly-OH, a R¹ je 4-imidazopropionil. Posebno preferirani spoj prikazan formulom IV za uporabu u ovom izumu onaj je u kojem je Xaa Arg, R² je C₈ nerazgranati acil, R³ je Gly-OH, a R¹ je 4-imidazopropionil.

Po mogućnosti, GLP-1 spojevi obuhvaćaju GLP-1 analoge, pri čemu osnova takvih analoga ili odsječaka sadrži aminokiselinu drugačiju od alanina na položaju 8 (analozi položaja 8). Osnova također može uključivati L-histidin, D-histidin, ili izmjenjene oblike histidina poput dezaminohistidina, 2-amino-histidina, β-hidroksi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina, ili α-metil-histidina na položaju 7. Preferira se da ti analozi položaja 8 sadrže jednu ili više dodatnih promjena na položajima 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 i 37 u usporedbi s odgovarajućom

aminokiselinom nativnog GLP-1 (7-37)OH. Više se preferira da ti analozi položaja 8 sadrže jednu ili više dodatnih promjena na položajima 16, 18, 22, 25 i 33 u usporedbi s odgovarajućom aminokiselinom nativnog GLP-1 (7-37)OH.

5 U preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 12 izabrana iz skupine koja se sastoji od triptofana ili tirozina. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 12, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom, serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 12 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom.

10 U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 16 izabrana iz skupine koja se sastoji od triptofana, izoleucina, leucina, fenilalanina ili tirozina. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 16, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom, serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 16 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim
15 supstitucija na položajima 16 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 16 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.

U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 18 izabrana iz skupine koja se sastoji od triptofana, tirozina, fenilalanina, lizina, leucina ili izoleucina, a po mogućnosti triptofana, tirozina ili izoleucina. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 18, supstituiru i aminokiselina na položaju 8
20 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom, serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 18 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 18 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 18 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.
25

U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 19 izabrana iz skupine koja se sastoji od triptofana ili fenilalanina, a po mogućnosti triptofana. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 19, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom,
30 serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 19 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 19 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 19 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.

35 U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 20 fenilalanin, tirozin ili triptofan. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 20, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom, serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 20 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 20 i 8, supstituiru i aminokiselina
40 na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 20 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.

U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 25 izabrana iz skupine koja se sastoji od valina, izoleucina i leucina, a po mogućnosti valina. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 25, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom,
45 serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 25 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 25 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 25 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.
50

U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 27 izabrana iz skupine koja se sastoji od izoleucina ili alanina. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 27, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom, serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više preferira da se osim supstitucija na položajima 27 i 8, supstituiru i
55 aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 27 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 27 i 8, supstituiru i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.

U još jednoj preferiranoj izvedbi, GLP-1 analog je GLP-1 (7-37)OH, pri čemu je aminokiselina na položaju 33 izoleucin. Više se preferira da se osim supstitucije na položaju 33, supstituiru i aminokiselina na položaju 8 s glicinom, valinom, leucinom, izoleucinom, serinom, treoninom, ili metioninom, a pogodnije valinom ili glicinom. Čak se i više
60

preferira da se osim supstitucija na položajima 33 i 8, supstituira i aminokiselina na položaju 22 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 33 i 8, supstituira i aminokiselina na položaju 30 s glutaminskom kiselinom. Također se preferira da se osim supstitucija na položajima 33 i 8, supstituira i aminokiselina na položaju 37 s histidinom.

GLP-1 spojevi imaju izmjenjenu na jednom ili više sljedećih položaja: 8, 12, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 27, 30, 33 i 37. Ti GLP-1 spojevi pokazuju pojačano djelovanje u usporedbi s GLP-1 (7-37)OH, te sadrže aminokiselinsku sekvencu prikazanu formulom IX (SEQ ID NO: 12)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Xaa₂₅-Lys-Xaa₂₇-
Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Lys-Gly-Arg-Xaa₃₇
Formula IX (SEQ ID NO: 12)

pri čemu:

Xaa₇ je: L-histidin, D-histidin, dezamino-histidin, 2-amino-histidin, β-hidroksi-histidin, homohistidin, α-fluorometil-histidin, ili α-metil-histidin;

Xaa₈ je: Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;

Xaa₁₂ je: Phe, Trp, ili Tyr;

Xaa₁₆ je: Val, Trp, Ile, Leu, Phe, ili Tyr;

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

Xaa₁₉ je: Tyr, Trp, ili Phe;

Xaa₂₀ je: Leu, Phe, Tyr, ili Trp;

Xaa₂₂ je: Gly, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa₂₅ je: Ala, Val, Ile, ili Leu;

Xaa₂₇ je: Glu, Ile, ili Ala;

Xaa₃₀ je: Ala ili Glu;

Xaa₃₃ je: Val, ili Ile; te

Xaa₃₇ je: Gly, His, NH₂, ili je odsutan.

Neki preferirani GLP-1 spojevi prikazani formulom IX uključuju:

GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)-NH₂, Gly⁸-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1 (7-37)OH, Leu⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ile⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ser⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1 (7-37)OH, Thr⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-Tyr¹²-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Gly⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-Glu²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-Lys²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Leu⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH, Leu⁸-Glu²²-GLP-1 (7-36)NH₂, Ile⁸-Glu²²-GLP-1 (7-

37)OH, Ile⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂, Asp²²-GLP-1(7-37)OH, Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂, Lys²²-GLP-1(7-37)OH, Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-His³⁷-GLP-1(7-36)NH₂.

Neki preferirani GLP-1 spojevi prikazani formulom IX koji imaju višestruke supstitucije uključuju GLP-1 (7-37)OH pri čemu je na položaju 8 valin ili glicin, na položaju 22 je glutaminska kiselina, na položaju 16 je tirozin, leucin ili triptofan, na položaju 18 je tirozin, triptofan, ili izoleucin, na položaju 25 je valin, a na položaju 33 je izoleucin. Ostali preferirani GLP-1 spojevi uključuju sljedeće: Val⁸-Tyr¹⁶-GLP-1 (7-

37)OH, Val⁸-Tyr¹²-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-Phe¹⁹-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Trp¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Leu¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Ile¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁶-Glu²²-GLP-1(7-37)OH; Val⁸-Trp¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Tyr¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-Phe¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH, te Val⁸-Ile¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH.

GLP-1 spojevi ovoga izuma također obuhvaćaju Eksendinske spojeve. Eksendin-3 i Eksendin-4 biološki su aktivni peptidi koji su prvobitno izolirani iz otrova guštera *Ileodermatidae*, te se pokazalo da se vežu na GLP-1 receptore, te potiču proizvodnju H⁺ ovisno o cAMP-u u parijetalnim stanicama sisavaca. Eksendin-3 i Eksendin-4 su oba peptidi od 39 aminokiselina, koji su otprilike 39% homologni s GLP-1. Oni djeluju kao snažni agonisti GLP-1 aktivnosti.

Zamjetljivo je da je derivat Eksendina koji je skraćen na N-završetku, poznat kao Eksendin (9-39 aminokiselina), inhibitor Eksendina-3, Eksendina-4 i GLP-1.

Eksendinski spoj tipično sadrži polipeptid koji ima aminokiselinsku sekvencu Eksendina-3, Eksendina-4, ili njihovog analoga ili odsječka. Eksendin-3 i Eksendin-4 otkriveni su u U.S. Patentu Br. 5,424,286.

Eksendin-3 ima aminokiselinsku sekvencu SEQ ID NO: 9:

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

(SEQ ID NO: 9)

Eksendin-4 ima aminokiselinsku sekvencu SEQ ID NO: 10:

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

(SEQ ID NO: 10)

GLP-1 spojevi također uključuju odsječke Eksendina, a to su polipeptidi dobiveni nakon skraćivanja za jednu ili više aminokiselina na N-završetku i/ili C-završetku Eksendina ili analoga Eksendina. Nadalje, GLP-1 spojevi uključuju Eksendinske polipeptide u koje su dodane jedna ili više aminokiselina na N-završetak i/ili C-završetak Eksendina ili njegovih odsječaka. Eksendinski spojevi tog tipa imaju najviše do oko četrdeset pet aminokiselina.

GLP-1 spojevi također uključuju "analoge Eksendina". Analog Eksendina dovoljno je homologan Eksendinu-4, Eksendinu-3, ili njihovom odsječku, tako da analog ima inzulinotropno djelovanje. Djelovanje odsječaka i/ili analoga Eksendina može se procijeniti pomoću *in vitro* testova poput onih koji su opisani u EP 619,322, te u U.S. Patentu Br. 5,120,712.

Po mogućnosti, analog Eksendina ima aminokiselinsku sekvencu Eksendina-4 ili njegovog odsječka, izmijenjenu tako da se jedna, dvije, tri, četiri ili pet aminokiselina razlikuju od aminokiselina na odgovarajućem položaju u Eksendinu-4 ili odsječku Eksendina-4. U nomenklaturi koja je ovdje rabljena za označavanje Eksendinskih spojeva, supstitucijska aminokiselina i njen položaj naznačeni su prije osnovne strukture. Na primjer, Val⁸-Eksendin-4 označava Eksendinski spoj u kojem je glicin koji se normalno nalazi na položaju 8 Eksendina-4 zamijenjen valinom.

Još jedna preferirana skupina GLP-1 spojeva sastavljena je od analoga GLP-1/Eksendina-4 prikazanih formulom VIII (SEQ ID NO: 11).

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

formula VIII (SEQ ID NO: 11)

pri čemu:

Xaa na položaju 7 je: L-histidin, D-histidin, dezamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hidroksi-histidin, homohistidin, α -fluorometil-histidin, ili α -metil-histidin;

Xaa na položaju 8 je: Gly, Ala ili Val;

Xaa na položaju 16 je: Leu ili Val;

Xaa na položaju 18 je: Lys ili Ser;

Xaa na položaju 19 je: Gln ili Tyr;

Xaa na položaju 20 je: Met ili Leu;

Xaa na položaju 22 je: Glu ili Gln;

Xaa na položaju 23 je: Glu ili Gln;

Xaa na položaju 25 je: Val ili Ala;

Xaa na položaju 26 je: Arg ili Lys;

Xaa na položaju 27 je: Leu ili Glu;

Xaa na položaju 30 je: Glu ili Ala;

Xaa na položaju 33 je: Val ili Lys;

Xaa na položaju 34 je: Asn ili Lys;

Xaa na položaju 36 je: Gly ili Arg; te

R na položaju 37 je: Gly, Pro, Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser, ili je odsutan. Aktivnost 18 različitih vrsta koje spadaju u ovaj rod predložena je u Tabeli 6.

Daljnji analozi Eksendina koji su korisni za ovaj izum opisani su u patentnim izdanjima PCT-a WO 99/25728 (Beeley i sur.), WO 99/25727 (Beeley i sur.), WO 98/05351 (Young i sur.), WO 99/40788 (Young i sur.), WO 99/07404 (Beeley i sur.), te WO 99/43708 (Knudsen i sur.).

GLP-1 fuzijski proteini ovoga izuma mogu sadržavati glikozilacijska mjesta. Glikozilacija je kemijska izmjena u kojoj se proteinu dodaju šećerne skupine na specifična mjesta. Glikozilacija proteina igra ulogu u osiguravanju ispravnog naboja, strukture, te stabilnosti sazrijevaćeg proteina, te može utjecati na vezanje proteina na površinu stanice, te moguće izlučivanje proteina. Najvažniji je utjecaj glikozilacije na *in vivo* brzinu uklanjanja mnogih proteina. Šećeri mogu biti O-povezani ili N-povezani. Općenito, O-povezani šećeri dodaju se na kisik u hidroksilnoj skupini serina ili treonina, dok se N-povezani šećeri dodaju amidnom dušiku asparagina. Prikladno mjesto za N-glikozilaciju je Asn X1 X2, pri čemu je X1 bilo koja aminokiselina osim Pro, a X2 je Ser ili Thr.

GLP-1 spojevi obično se ne glikoziliraju *in vivo*; međutim, zanimljivo je da se GLP-1 fuzijski proteini ovoga izuma, koji sadrže GLP-1 spoj produžen na C-završetku koji je spojen na Fc sekvencu, glikoziliraju na zadnjem serinu u C terminalnom produžetku (SSGAPPPS*), te na treoninu na položaju 11 u N terminalnom području Fc (AEPKSCDKTHT*CPPC...).

Heterologni Fc fuzijski proteini:

Gore opisani GLP-1 spojevi mogu se spojiti izravno ili putem veznog peptida na Fc dio imunoglobulina.

Imunoglobulini su molekule koje sadrže polipeptidne lance koji se zajedno drže pomoću disulfidnih veza, a tipično je da imaju dva laka lanca i dva teška lanca. U svakom lancu, jedna domena (V) ima promjenjivu aminokiselinsku sekvencu koja ovisi o specifičnosti antitijela te molekule. Druge domene (C) imaju prilično nepromjenjivu sekvencu zajedničku molekulama iste klase.

Kako je ovdje primjenjen, Fc dio imunoglobulina ima značenje koje se uobičajeno daje pojmu u području imunologije. Specifično, ovaj pojam se odnosi na odsječak antitijela koji se dobije uklanjanjem dva područja za vezanje antigena (Fab odsječci) s antitijela. Jedan način za uklanjanje Fab odsječaka je razgradnja imunoglobulina s proteazom

papainom. Stoga se Fc dio oblikuje iz otprilike jednako velikih odsječaka nepromjenjivog područja s oba teška lanca, koji su povezani nekovalentnim interakcijama i disulfidnim vezama. Fc dio može obuhvatiti glavna područja, te se produžiti kroz CH₂ i CH₃ domene do C-završetka antitijela. Reprezentativna glavna područja za ljudske i miše imunoglobuline mogu se naći u Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C.A.K., ured., W.H. Freeman and Co., 1992, čija su poučavanja ovdje ugrađena spominjanjem. Fc dio može nadalje obuhvaćati jedno ili više glikozilacijskih mjesta. Aminokiselinska sekvenca reprezentativnog Fc proteina koja sadrži glavno područje, CH₂ i CH₃ domene, te jedno

N-glikozilacijsko mjesto na položaju 82 prikazana je na Slici 1.

Postoji 5 tipova humanih imunoglobulinskih Fc područja s različitim efektorskim i farmakokinetičkim svojstvima: IgG, IgA, IgM, IgD, te IgE. IgG je najzastupljeniji imunoglobulin u serumu. IgG također ima najduže vrijeme poluživota u serumu od svih imunoglobulina (23 dana). Za razliku od ostalih imunoglobulina, IgG se učinkovito vraća u cirkulaciju nakon vezanja na Fc receptor. Postoje četiri IgG podklase G1, G2, G3 i G4, od kojih svaka ima različitu efektorsku funkciju. G1, G2 i G3 mogu vezati C1q, te aktivirati komplement, dok G4 ne može. Iako G3 može vezati C1q učinkovitije nego G1, G1 je učinkovitiji u posredovanju kod komplementom usmjerene lize stanica. G2 aktivira komplement izrazito neučinkovito. Vezno mjesto za C1q na IgG smješteno je u karboksi terminalnom području CH₂ domene.

Sve IgG podklase mogu se vezati na Fc receptore (CD16, CD32, CD64), s time da su G1 i G3 učinkovitiji od G2 i G4. Područje IgG za vezanje na Fc receptor oblikovano je od ostataka koji su smješteni i na glavnom i na karboksi terminalnom području CH₂ domene.

IgA može postojati i u monomernom i u dimernom obliku koji je povezan J-lancem. IgA je drugi najzastupljeniji Ig u serumu, ali ima poluživot od samo 6 dana. IgA ima tri efektorske funkcije. Veže se na IgA specifični receptor na makrofagima i eozinofilima, što pokreće fagocitozu, odnosno degranulaciju. Također može aktivirati komplement nepoznatim alternativnim putem.

IgM je izražen bilo kao pentamer ili heksamer, a u oba slučaja je povezan putem J-lanca. IgM ima poluživot u serumu 5 dana. Slabo se veže na C1q putem veznog mjesta smještenog u njegovoj CH₃ domeni. IgD ima poluživot 3 dana u serumu. Nije razjašnjeno koje efektorske funkcije se mogu pripisati ovome Ig-u. IgE je monomerni Ig, te ima poluživot u serumu 2,5 dana. IgE se veže na dva Fc receptora što pokreće degranulaciju, te ima za posljedicu otpuštanje sredstava koja izazivaju upalu.

Ovisno o željenom *in vivo* učinku, heterologni fuzijski proteini ovoga izuma mogu sadržavati bilo koji izotip od gore opisanih, ili mogu sadržavati mutirana Fc područja, gdje su funkcije vezanja komplementa i/ili Fc receptora izmijenjene. Stoga, heterologni fuzijski proteini ovoga izuma mogu sadržavati cijelo Fc područje imunoglobulina, odsječke Fc dijela imunoglobulina, ili njihove analoge spojene na GLP-1 spoj.

Fuzijski proteini ovoga izuma mogu se sastojati od jednolančanih proteina ili višelančanih polipeptida. Dva ili više Fc fuzijskih proteina mogu se proizvesti tako da stupaju u interakcije putem disulfidnih veza koje se prirodno stvaraju između Fc područja. Ti multimeri mogu biti homogeni s obzirom na GLP-1 spoj ili mogu sadržavati različite GLP-1 spojeve spojene na N-završetak Fc dijela fuzijskog proteina.

Bez obzira na konačnu strukturu fuzijskog proteina, Fc ili područje nalik Fc-u mora služiti za produženje *in vivo* plazmatskog poluživota GLP-1 spoja spojenog na N-završetak. Nadalje, spojeni GLP-1 spoj mora zadržati nešto biološke aktivnosti. Povećanje poluživota može se pokazati pomoću postupka opisanog u Primjeru 7, gdje se poluživot fuzijskog proteina uspoređuje s poluživotom samog GLP-1 spoja. Biološka aktivnost može se utvrditi *in vitro* i *in vivo* postupcima koji su poznati u struci. Reprezentativni biološki testovi opisani su u Primjerima 6, 8 i 9.

Kako Fc područje IgG-a koje je proizvedeno proteolizom ima isti *in vivo* poluživot kao i nedirnuta IgG molekula, a Fab odsječci se naglo razgrađuju, vjeruje se da se presudna sekvenca za produženje poluživota nalazi u CH₂ i/ili CH₃ domeni. Nadalje, pokazano je u literaturi da se brzine katabolizma IgG oblika koji se ne vežu na Fc receptor visokog afiniteta ili na C1q ne mogu razlikovati od brzina uklanjanja osnovnog divljeg tipa antitijela, što ukazuje da je kataboličko mjesto različito od mjesta uključenih u vezanje na Fc receptor ili C1q. [Wawrzynczak i sur., (1992) Molecular Immunology 29:221]. Istraživanja mutageneze usmjerene prema određenom mjestu pomoću mišjeg IgG1 Fc područja ukazuju da je mjesto IgG1 Fc područja koje nadzire brzinu katabolizma smješteno na zajedničkom području CH₂-CH₃ domene.

Na temelju tih istraživanja, Fc područja mogu se izmijeniti na kataboličkom mjestu radi optimizacije poluživota fuzijskih proteina. Preferira se da se Fc područje rabljeno u heterolognim fuzijskim proteinima ovoga izuma izvede iz

Fc područja IgG1 ili IgG4. Čak je i povoljnije da Fc područje bude IgG4 ili izvedeno iz IgG4. Po mogućnosti IgG Fc područje sadrži i CH₂ i CH₃ područja uključujući glavna područja.

Heterologni albuminski fuzijski proteini:

GLP-1 spojevi koji su gore opisani mogu se spojiti izravno ili putem veznog peptida na albumin ili njegov analog, odsječak, ili derivat.

Općenito se albuminski proteini koji čine dio fuzijskih proteina ovoga izuma mogu izvesti iz albumina kloniranih iz bilo koje vrste. Međutim, preferira se humani albumin, te njegovi odsječci i analozi, kako bi se smanjio rizik imunogenosti fuzijskog proteina kod ljudi. Humani serumski albumin (HSA) sastoji se od jednog neglikoziliranog polipeptidnog lanca od 585 aminokiselina s molekulskom težinom formule u iznosu 66.500. Aminokiselinska sekvenca humanog HSA prikazana je na slici 2. [Pogledati Meloun, i sur. (1975) FEBS Letters 58:136; Behrens, i sur. (1975) Fed. Proc. 34:591; Lawn, i sur. (1981) Nucleic Acids Research 9:6102-6114; Minghetti, i sur. (1986) J. Biol. Chem. 261:6747]. Opisano je mnoštvo polimorfni oblika, kao i analoga i odsječaka albumina. [Pogledati Weitkamp, i sur., (1973) Ann. Hum. Genet. 37:219]. Na primjer, u EP 322,094, izumitelji otkrivaju razne kraće oblike HSA. Neki od tih odsječaka uključuju HSA (1-373), HSA (1-388), HSA (1-389), HSA (1-369), te HSA (1-419), te odsječke između 1-369 i 1-419. EP 399,666 otkriva odsječke albumina koji uključuju HSA (1-177) i HSA (1-200), te odsječke između HSA (1-177) i HSA (1-200).

Podrazumijeva se da heterologni fuzijski proteini ovoga izuma uključuju GLP-1 spojeve koji se spajaju s bilo kojim albuminskim proteinom, uključujući odsječke, analoge i derivate, pri čemu je takav fuzijski protein biološki aktivan, te ima duži plazmatski poluživot od samog GLP-1 spoja. Stoga, albuminski dio fuzijskog proteina ne mora obavezno imati plazmatski poluživot jednak kao kod nativnog humanog albumina. Odsječci, analozi, te derivati su poznati ili se mogu proizvesti tako da imaju duže poluživote ili da imaju prijelazne poluživote u odnosu na nativni humani albumin i odgovarajući GLP-1 spoj.

Heterologni fuzijski proteini ovoga izuma obuhvaćaju proteine koji imaju konzervativne supstitucije aminokiselina u GLP-1 spoju i/ili Fc ili albuminskom dijelu fuzijskog proteina. "Konzervativna supstitucija" je zamjena aminokiseline s drugom aminokiselinom koja ima isti ukupni elektronski naboj, te otprilike istu veličinu i oblik. Aminokiseline s alifatskim ili supstituiranim alifatskim aminokiselinskim postraničnim lancima imaju otprilike istu veličinu kada se ukupni broj ugljika i heteroatoma u njihovim postraničnim lancima ne razlikuje za više od oko četiri. Imaju otprilike isti oblik, kada se broj grana u njihovim postraničnim lancima ne razlikuje za više od jedne. Smatra se da aminokiseline s fenilnim ili supstituiranim fenilnim skupinama u svojim postraničnim lancima imaju otprilike istu veličinu i oblik. Osim ako je ovdje izričito drugačije navedeno, konzervativne supstitucije se po mogućnosti izvode s aminokiselinama koje se prirodno pojavljuju.

Međutim, pojam "aminokiselina" ovdje se rabi u svom najširem smislu, te obuhvaća aminokiseline koje se prirodno pojavljuju, kao i aminokiseline koje se ne pojavljuju prirodno, uključujući analoge i derivate aminokiselina. Posljednje uključuje molekule koje sadrže aminokiselinsku skupinu. Iskusi stručnjak će uvidjeti, u svjetlu ove široke definicije, da spominjanje aminokiseline ovdje obuhvaća, na primjer, proteogene L-aminokiseline koje se prirodno pojavljuju; D-aminokiseline; kemijski izmjenjene aminokiseline poput analoga i derivata aminokiselina; aminokiseline koje se prirodno pojavljuju, a nisu proteogene poput norleucina, β-alanina, ornitina, GABA, itd.; te kemijski sintetizirane spojeve koji imaju svojstva za koje je u struci poznato da su karakteristična za aminokiseline. Kako je ovdje primjenjen, pojam "proteogeni" ukazuje da se aminokiselina može ugraditi u peptid, polipeptid, ili protein u stanici kroz metaboličke puteve.

Ugradnja neprirodnih aminokiselina, uključujući sintetske aminokiseline koje nisu nativne, supstituirane aminokiseline, ili jedne ili više D-aminokiselina u heterologne fuzijske proteine ovoga izuma može biti korisna na više raznih načina. Peptidi koji sadrže D-aminokiseline, itd., ispoljavaju povećanu stabilnost *in vitro* ili *in vivo* u usporedbi s njihovim kopijama koje sadrže L-aminokiseline. Stoga, izgradnja peptida, itd., u koje su ugrađene D-aminokiseline može biti posebno korisna kada je poželjna ili potrebna veća intracelularna stabilnost. Još specifičnije, D-peptidi, itd., otporni su na endogene peptidaze i proteaze, time osiguravajući poboljšanu bioraspodivnost molekule, te produžena vremena života *in vivo*, onda kada su takva svojstva poželjna. Uz to, D-peptidi, itd., ne mogu se učinkovito podvrći opsežnom histološki podudarnom predstavljanju T-pomoćničkim stanicama koje je ograničeno na kompleksni razred II, te je stoga malo vjerojatno da će inducirati humoralne imune odgovore u cijelom organizmu.

Osim analiza strukture/funkcije raznih polipeptida koji su obuhvaćeni ovim izumom, postoje brojni faktori koje treba razmotriti prilikom izbora aminokiselina za supstituciju. Jedan faktor koji se može razmatrati pri uvođenju takvih promjena je hidropatski indeks aminokiselina. O važnosti hidropatskog aminokiselinskog indeksa u razmatranju

interaktivne biološke funkcije proteina raspravljali su Kyte i Doolittle (1982, *J. Mol. Biol.*, 157:105-132). Prihvaćeno je da relativni hidropatski karakter aminokiselina doprinosi sekundarnoj strukturi nastalog proteina. To, zauzvrat, utječe na interakcije proteina s molekulama kao što su enzimi, supstrati, receptori, ligandi, DNA, antitijela, antigeni, itd. Na temelju njenih osobina hidrofobnosti i naboja, svakoj se aminokiselini dodjeljuje hidropatski indeks kako slijedi:

5 izoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenilalanin (+2,8); cistein/cistin (+2,5); metionin (+1,9); alanin (+1,8); glicin (-0,4); treonin (-0,7); serin (-0,8); triptofan (-0,9); tirozin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamat/glutamin/aspartat/asparagin (-3,5); lizin (-3,9); te arginin (-4,5).

Kao što je poznato u struci, izvjesne aminokiseline u peptidu, polipeptidu, ili proteinu mogu se supstituirati drugim aminokiselinama koje imaju sličan hidropatski indeks ili broj, te stvaraju konačni peptid, itd., koji ima sličnu ili čak i poboljšanu biološku aktivnost. Pri uvođenju takvih promjena, preferira se da se aminokiseline koje imaju hidropatske indekse unutar ± 2 supstituiraju jedna drugom. Povoljnije supstitucije su one u kojima aminokiseline imaju hidropatske indekse unutar ± 1 . Najpovoljnije supstitucije su one u kojima aminokiseline imaju hidropatske indekse unutar $\pm 0,5$.

Slične aminokiseline mogu također biti supstituirane na temelju svoje hidrofilnosti. U.S. Patent Br. 4,554,101 otkriva da najveća lokalna prosječna hidrofilnost proteina, kojom upravlja hidrofilnost njegovih susjednih aminokiselina, korelira s biološkim svojstvima proteina. Sljedeće vrijednosti hidrofilnosti dodijeljene su aminokiselinama: arginin/lizin (+3,0); aspartat/glutamat (+3,0 $\pm$ 1); serin (+0,3); asparagin/glutamin (+0,2); glicin (0); treonin (-0,4); prolin (-0,5 $\pm$ 1); alanin/histidin (-0,5); cistein (-1,0); metionin (-1,3); valin (-1,5); leucin/izoleucin (-1,8); tirozin (-2,3); fenilalanin (-2,5); te triptofan (-3,4). Stoga se jedna aminokiselina u peptidu, polipeptidu, ili proteinu može supstituirati drugom aminokiselinom koja ima slični brojčani pokazatelj hidrofilnosti, te još uvijek proizvesti konačni peptid, itd., koji ima sličnu biološku aktivnost, odnosno, i dalje zadržava ispravnu biološku funkciju. Prilikom uvođenja takvih promjena, aminokiseline koje imaju hidropatske indekse unutar ± 2 po mogućnosti se supstituiraju jedna drugom, one unutar ± 1 se više preferiraju, a one unutar $\pm 0,5$ se najviše preferiraju.

Kao što je gore skicirano, supstitucija aminokiselina u fuzijskim proteinima ovoga izuma može se zasnivati na relativnoj sličnosti aminokiselina supstituenata na postraničnom lancu, na primjer, njihovoj hidrofobnosti, hidrofilnosti, naboju, veličini, itd. Nadalje, supstitucije se mogu načiniti na osnovu sklonosti sekundarne strukture. Na primjer, aminokiselina uzvojnice može se zamijeniti s aminokiselinom koja će očuvati strukturu uzvojnice. Primjeri supstitucija koji uzimaju u obzir razna svojstva od gore navedenih kako bi se ostvarile konzervativne izmjene aminokiselina koje za posljedicu imaju neprimjetne promjene unutar ovdje prikazanih peptida, itd., mogu se izabrati između drugih pripadnika klase kojoj pripadaju aminokiseline što se prirodno pojavljuju. Aminokiseline se mogu podijeliti na sljedeće četiri skupine: (1) kisele aminokiseline; (2) bazične aminokiseline; (3) neutralne polarne aminokiseline; te (4) neutralne nepolarne aminokiseline.

Opći postupci za stvaranje heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma

Iako se heterologni fuzijski proteini ovoga izuma mogu načiniti mnoštvom raznih postupaka, preferiraju se rekombinantni postupci. U svrhe ovoga izuma, kako je ovdje otkriveno i zahtjevano, dolje su definirani sljedeći opći pojmovi i kratice molekularne biologije. Pojmovi i kratice koji su primjenjeni u ovom dokumentu imaju svoja normalna značenja ako nije drugačije naznačeno. Na primjer, "°C" odnosi se na stupnjeve Celzija; "mmol" se odnosi na milimol ili milimolove; "mg" se odnosi na miligrame; "µg" se odnosi na mikrograme; "ml ili mL" odnosi se na mililitre; te "µl ili µL" odnosi se na mikrolitre. Kratice aminokiselina odgovaraju postavkama u 37 C.F.R. § 1,822 (b) (2) (1994).

"Par baza" ili "bp" kako je ovdje primjenjen odnosi se na DNA ili RNA. Kratice A, C, G i T odgovaraju 5'-monofosfatnim oblicima deoksiribonukleozida (deoksi)adenozina, (deoksi)citidina, (deoksi)gvanozina, odnosno timidina, prilikom njihovog pojavljivanja u molekulama DNA. Kratice U, C, G i A odgovaraju 5'-monofosfatnim oblicima ribonukleozida uridina, citidina, gvanozina, odnosno adenzina, prilikom njihovog pojavljivanja u molekulama RNA. U dvolančanoj DNA, par baza može se odnositi na udruživanje A sa T ili C sa G. U DNA/RNA, par baza heterodupleksa može se odnositi na udruživanje A sa U ili C sa G. (Pogledati definiciju pojma "komplementaran", dolje).

"Razgradnja" ili "restrikcija" DNA odnosi se na katalitičko cijepanje DNA pomoću restriktorskog enzima koji djeluje samo na određene sekvence u DNA ("endonukleaze specifične za sekvencu"). Razni restriktorski enzimi koji su ovdje primjenjeni komercijalno su dostupni, a njihovi uvjeti reakcije, kofaktori, te drugi zahtjevi rabljeni su prema znanju osobe uobičajene stručnosti. Prikladne pufere, te količine supstrata za pojedine restriktorske enzime navodi proizvođač, ili se lako mogu naći u literaturi.

"Ligacija" se odnosi na postupak stvaranja fosfodiesterskih veza između dva dvolančana odsječka nukleinske kiseline. Ako nije drugačije navedeno, ligacija se može postići uz uporabu poznatih pufera i uvjeta s DNA ligazom, poput T4 DNA ligaze.

"Plazmid" se odnosi na ekstrakromosomski genetski element koji se (obično) sam replicira. Plazmidi se općenito označavaju pomoću malog slova "p" nakon čega slijede slova i/ili brojevi. Početni plazmidi u ovome izumu su bilo komercijalno dostupni, javno dostupni bez ograničenja, ili se mogu izgraditi iz dostupnih plazmida u skladu s objavljenim postupcima. Osim toga, plazmidi ekvivalentni onima koji su opisani poznati su u struci, te će biti očiti za stručnjaka s osnovnim vještinama.

"Rekombinantni DNA vektor za kloniranje", kako je ovdje primjenjen, odnosi se na bilo koje sredstvo koje se samostalno replicira, uključujući, ali bez ograničenja, plazmide i fage, koji sadrže DNA molekulu kojoj se mogu dodati ili su dodani jedan ili više dodatnih DNA segmenata.

"Rekombinantni DNA ekspresijski vektor", kako je ovdje primjenjen, odnosi se na bilo koji rekombinantni DNA vektor za kloniranje u koji je ugrađen promotor za kontrolu transkripcije umetnute DNA.

"Transkripcija" se odnosi na postupak u kojem se informacija sadržana u neukleotidnoj sekvenci DNA prenosi u komplementarnu RNA sekvencu.

"Transfekcija" se odnosi na unos ekspresijskog vektora u stanicu domaćina, bez obzira da li je ili nije došlo do ekspresije bilo koje kodirajuće sekvence. Brojni postupci transfekcije su poznati stručnjaku uobičajenih znanja, na primjer, koprecipitacija s kalcijevim fosfatom, liposomska transfekcija, i elektroporacija. Općenito se priznaje da je transfekcija uspješno izvedena kada se pojavi bilo kakva naznaka djelovanja tog vektora unutar stanice domaćina.

"Transformacija" se odnosi na uvođenje DNA u organizam, tako da se DNA može replicirati, bilo kao ekstrakromosomski element ili putem uklapanja u kromosom. Postupci transformiranja bakterijskih i eukariotskih domaćina dobro su poznati u struci, pri čemu su mnogi od tih postupaka, poput injiciranja u jezgru, spajanja protoplasta ili tretmana s kalcijem pomoću kalcijevog klorida, sažeti u J. Sambrook, i sur., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989). Općenito, kada se DNA uvodi u Kvasac, pojam transformacija se rabi kao suprotnost pojma transfekcija.

"Translacija", kako je ovdje primjenjena, odnosi se na postupak u kojem se genetska informacija iz glasničke RNA (mRNA) rabi za pobliže označavanje i usmjerenje sinteze polipeptidnog lanca.

"Vektor" se odnosi na spoj nukleinske kiseline koji se rabi za transfekciju i/ili transformaciju stanica kod upravljanja genima, a nosi polinukleotidne sekvence koje odgovaraju određenim proteinskim molekulama, te koje u kombinaciji s odgovarajućim kontrolnim sekvencama prenose specifična svojstva na stanice domaćine koje se podvrgavaju transfekciji i/ili transformaciji. Prikladni vektori su plazmidi, virusi, te bakteriofagi. Umjetni vektori se stvaraju izrezivanjem i spajanjem DNA molekula iz različitih izvora pomoću restrikcijskih enzima i ligaza. Pojam "vektor", kako je ovdje primjenjen, uključuje rekombinantne DNA vektore za kloniranje i rekombinantne DNA ekspresijske vektore.

"Komplementarno" ili "komplementarnost", kako je ovdje primjenjeno, odnosi se na parove baza (purine i pirimidine) koji se udružuju putem vodikovih veza u dvolančanu nukleinsku kiselinu. Sljedeći parovi baza su komplementarni: gvanin i citozin; adenin i timin; te adenin i uracil.

"Hibridizacija", kako je ovdje primjenjena, odnosi se na postupak kojim se lanac nukleinske kiseline spaja s komplementarnim lancem putem sparivanja baza. Uvjeti primjenjeni u hibridizaciji dvije komplementarne nukleinske kiseline koje su vrlo slične, ali nisu identične, mijenjaju se sa stupnjem komplementarnosti dvaju lanaca, te sa dužinom lanaca. Takvi postupci i uvjeti su dobro poznati osobama koje se bave ovim područjem.

"Izolirana aminokiselinska sekvenca" odnosi se na bilo koju aminokiselinsku sekvencu, stvorenu ili sintetiziranu na bilo koji način, koja se po smještaju razlikuje od sekvence koja se prirodno pojavljuje.

"Izolirani DNA spoj" odnosi se na DNA sekvencu, bilo kako stvorenu ili sintetiziranu, koja ima različiti smještaj od svog prirodnog smještaja u genomskoj DNA.

"Izolirani spoj nukleinske kiseline" odnosi se na bilo koju RNA ili DNA sekvencu, bilo kako stvorenu ili sintetiziranu, koja ima različiti smještaj od svog prirodnog smještaja.

"Primer" se odnosi na odsječak nukleinske kiseline koji djeluje kao supstrat za započinjanje enzimatskog ili sintetskog produžavanja.

"Promotor" se odnosi na DNA sekvencu koja usmjerava transkripciju DNA ili RNA.

"Proba" se odnosi na spoj nukleinske kiseline ili njen odsječak, koji se hibridizacijom spaja s drugim spojem nukleinske kiseline.

"Strogost" reakcija hibridizacije lako će utvrditi osoba osnovne stručnosti, te je to općenito empirijski izračun koji ovisi o dužini probe, temperaturi ispiranja, te koncentraciji soli. Općenito, duže probe zahtijevaju više temperature da bi dovoljno očvrsnule, dok kraće probe trebaju niže temperature. Hibridizacija općenito ovisi o mogućnosti denaturirane DNA da ponovno očvrsne kada su komplementarni lanci prisutni u temperaturi ispod njihove temperature taljenja. Što je viši stupanj željene homolognosti između proba i sekvenci koje se hibridiziraju, to je viša relativna temperatura koja se može rabiti. Kao rezultat, slijedi da su više relativne temperature sklone učiniti reakciju strožom, dok ju niže temperature čine manje takvom. Za dodatne detalje i objašnjenja o strogosti hibridizacijskih reakcija, pogledati Ausubel i sur., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, 1995.

"Strogi uvjeti" ili "uvjeti visoke strogosti", kako su ovdje primjenjeni, mogu se identificirati pomoću onih koji (1) rabe nisku ionsku jakost i visoku temperaturu za ispiranje, na primjer, 15 mM natrijev klorid/1,5 mM natrijev citrat/0,1% natrijev dodecil sulfat kod 50°C; (2) rabe tijekom hibridizacije sredstvo za denaturaciju, poput formamida, na primjer, 50% (v/v) formamid s 0,1% goveđim serumskim albuminom/0,1% Ficoll-om/0,1% polivinilpirolidonom/50 mM puferom natrijevog fosfata kod pH 6,5 sa 750 mM natrijevim kloridom/75 mM natrijevim citratom kod 42°C; ili (3) rabe 50% formamid, 5× SSC (750 mM natrijev klorid, 75 mM natrijev citrat), 50 mM natrijev fosfat (pH 6,8), 0,1% natrijev pirofosfat, 5× Denhardtovu otopinu, DNA iz sperme lososa koja je obrađena u ultrazvučnoj kupelji (50 µg/ml), 0,1% SDS, te 10% dekstran sulfat kod 42°C, uz ispiranja kod 42°C u 0,2× SSC-u (30 mM natrijev klorid/3 mM natrijev citrat), te 50% formamidu kod 55°C, nakon čega slijedi ispiranje visoke strogosti koje obuhvaća 0,1× SSC koji sadrži EDTA kod 55°C.

"Umjereno strogi uvjeti" mogu se identificirati prema opisu Sambrook-a i sur. [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, (1989)], te obuhvaćaju uporabu otopine za ispiranje i uvjeta hibridizacije (na primjer, temperature, ionske jakosti, te %SDS-a) koji su manje strogi od onih gore opisanih. Primjer umjereno strogih uvjeta je prekonoćna inkubacija kod 37°C u otopini koja sadrži: 20% formamid, 5× SSC (750 mM natrijev klorid, 75 mM natrijev citrat), 50 mM natrijev fosfat kod pH 7,6, 5× Denhardtovu otopinu, 10% dekstran sulfat, te 20 mg/mL denaturiranu ogoljenu DNA iz sperme lososa, nakon čega slijedi ispiranje filtera u 1× SSC-u kod otprilike 37-50°C. Iskusni stručnjak znat će kako treba podesiti temperaturu, ionsku jakost, itd., što je neophodno radi prilagođavanja faktora poput dužine probe i slično.

"PCR" se odnosi na opće poznatu lančanu reakciju polimeraze koja rabi toplinski stabilnu DNA polimerazu.

"Vodeća sekvenca" odnosi se na sekvencu aminokiselina koja se enzimatski ili kemijski može ukloniti radi stvaranja željenog polipeptida.

"Sekvenca za signal izlučivanja" odnosi se na sekvencu aminokiselina koje su općenito prisutne u N-terminalnom području većeg polipeptida, a čija je funkcija usmjerena prema započinjanju povezivanja tog polipeptida s odjeljcima stanične membrane poput endoplazmatskog retikuluma, te izlučivanju tog polipeptida kroz plazmatsku membranu.

Izgradnja DNA koja kodira heterologne fuzijske proteine ovoga izuma:

Albumini divljeg tipa i imunoglobulinski proteini mogu se dobiti iz raznih izvora. Na primjer, ti se proteini mogu dobiti iz cDNA knjižnice koja je pripravljena iz tkiva ili stanica kod kojih je izražena ekspresija željene mRNA u mjerljivim količinama. Knjižnice se mogu provjeravati pomoću proba koje su oblikovane prema objavljenim DNA ili proteinskim sekvencama za pojedine željene proteine. Na primjer, nepromjenjiva područja imunoglobulinskih lakih ili teških lanaca opisana su u Adams, i sur. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, i sur. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, i sur. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6027-6031; Rice i sur. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, i sur. (1982) *Nature* 298:286-288; te Morrison, i sur. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256. Neke reference koje otkrivaju albuminski protein i DNA sekvence uključuju Meloun, i sur. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, i sur. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, i sur. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; te Minghetti, i sur. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747.

Provjeravanje cDNA ili genomske knjižnice s izabranom probom može se provesti uz uporabu standardnih postupaka, poput opisanih u Sambrook i sur., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989). Alternativni načini izolacije gena koji kodira albuminski ili imunoglobulinski protein je uporaba PCR metodologije [Sambrook i sur., gore; Dieffenbach i sur., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1995)]. PCR primeri mogu se oblikovati na temelju objavljenih sekvenci.

Općenito potpuna dužina sekvenci divljeg tipa koje su klonirane iz određenih vrsta može poslužiti kao kalup za stvaranje analoga, odsječaka, te derivata koji zadržavaju mogućnost prenošenja dužeg plazmatskog poluživota na GLP-1 spoj koji čini dio fuzijskog proteina. Preferira se da Fc i albuminski dijelovi heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma budu izvedeni iz native humane sekvence kako bi se smanjio rizik potencijalne imunogenosti fuzijskog proteina kod ljudi.

Napose se preferira da imunoglobulinski dio fuzijskog proteina koji je obuhvaćen ovim izumom sadrži samo Fc odsječak imunoglobulina. Ovisno o tome da li su pojedine efektorske funkcije poželjne, te o strukturnim karakteristikama fuzijskog proteina, Fc odsječak može sadržavati glavno područje zajedno s CH2 i CH3 domenama, ili neku drugu njihovu kombinaciju. Ti Fc odsječci mogu se proizvesti pomoću PCR postupka s primercima oblikovanim tako da se hibridizacijom spajaju na sekvence koje odgovaraju željenim krajevima odsječaka. Slično, ako su poželjni odsječci albumina, mogu se oblikovati PCR primeri koji su komplementarni u odnosu na unutrašnje albuminske sekvence. PCR primeri mogu se također oblikovati tako da se stvaraju mjesta za restriksijske enzime radi olakšavanja kloniranja u ekspresijske vektore.

DNA koja kodira GLP-1 spojeve ovoga izuma može se načiniti pomoću mnoštva različitih postupaka uključujući postupke kloniranja poput onih koji su opisani gore, kao i kemijsku sintezu DNA. Kemijska sinteza može biti privlačna uzimajući u obzir kratkoću kodiranog peptida. Aminokiselinska sekvenca za GLP-1 objavljena je, kao i sekvenca preproglukagonskog gena. [Lopez, i sur. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 80:5485-5489; Bell, i sur. (1983) *Nature*, 302:716-718; Heinrich, G., i sur. (1984) *Endocrinol.*, 115:2176-2181; Ghiglione, M., i sur. (1984) *Diabetologia* 27:599-600]. Stoga se primeri mogu oblikovati u PCR native GLP-1 spojeve i njihove odsječke.

Gen koji kodira fuzijski protein može se tada izgraditi ligacijom DNA koja kodira GLP-1 spoj u okviru na DNA koja kodira albumin ili Fc protein. Gen koji kodira GLP-1 spoj, te gen koji kodira albumin ili Fc protein mogu se također spojiti u okviru putem DNA koja kodira vezni peptid.

In vivo funkcija i stabilnost heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma može se optimizirati dodavanjem malih veznih peptida kako bi se spriječile moguće neželjene interakcije među domenama. Iako ti vezni peptidi mogu biti bilo koje dužine, te se sastojati od bilo koje kombinacije aminokiselina, preferira se da dužina ne bude veća nego što je neophodno za sprječavanje neželjenih interakcija među domenama i/ili optimizaciju biološke aktivnosti i/ili stabilnosti. Općenito, vezni peptidi ne bi trebali sadržavati aminokiseline s izrazito velikim postraničnim lancima ili aminokiseline koje bi vjerojatno mogle uvesti značajnu sekundarnu strukturu. Preferira se da vezni peptid bude bogat serinom-glicinom, te da bude kraći od 30 aminokiselina. Još se više preferira da vezni peptid nema više od 20 aminokiselina. Čak se i više preferira da vezni peptid bude kraći od 15 aminokiselina. Preferirani vezni peptid sadrži ponovljenu sekvencu Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. Preferira se da se ta sekvenca ponavlja između 2 i 6 puta. Čak se i više preferira da se ta sekvenca ponovi između 3 i 4 puta.

DNA koja kodira divlji tip GLP-1, albumin, te Fc polipeptide i njihove odsječke, može se mutirati bilo prije ligacije ili vezano uz cDNA koja kodira cijeli fuzijski protein. Mnoštvo postupaka mutagenaze dobro je poznato u struci. Na primjer, mutagenski PCR postupak rabi produžavanje preklopljenog lanca radi stvaranja specifičnih mutacija baza sa svrhom promjene specifične aminokiselinske sekvence u odgovarajućem proteinu. Ta PCR mutagenaza zahtjeva uporabu četiri primera, dva usmjerena prema naprijed (primeri A i C), te dva obrnutog usmjerenja (primeri B i D). Mutirani gen se umnožava iz divljeg tipa kalupa u dva različita stupnja. Prva reakcija umnožava gen na pola izvođenjem reakcije A na B, te odvojene reakcije C na D, gdje B i C primeri pogađaju područje gena koji se treba mutirati. Pri svrstavanju tih primera uz ciljno područje, oni sadrže neodgovarajuće baze za baze koje su cilj promjene. Kada su A na B i C na D reakcije gotove, reakcijski produkti se izoliraju, te se miješaju za uporabu kao kalupi za A na D reakciju. Ta reakcija tada daje potpuni, mutirani produkt.

Kada se proizvede gen koji kodira cijeli fuzijski protein, on se može klonirati u odgovarajući ekspresijski vektor. Specifične strategije koje se mogu primijeniti za izradu GLP-1 fuzijskih proteina ovoga izuma opisane su u primjeru 1.

Opći postupci za rekombinantnu ekspresiju heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma:

Stanice domaćini se transfektiraju i transformiraju s ekspresijskim vektorima ili vektorima za kloniranje koji su ovdje opisani radi proizvodnje heterolognih fuzijskih proteina, te se uzgajaju u uobičajenom hranjivom mediju koji je

izmijenjen tako da bude prikladan za indukciju promotora, odabir transformacijskih tvari, ili umnožavanje gena koji kodiraju željene sekvence. Uvjeti za kulturu, poput medija, temperature, pH i slično, može izabrati iskusni stručnjak bez nepotrebnog pokusiranja. Općenito, principi, protokoli, te praktični postupci za ostvarivanje maksimalne produktivnosti staničnih kultura mogu se naći u *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ured. (IRL Press, 1991), te Sambrook, i sur., gore. Postupci transfekcije su poznati stručnjaku koji vlada osnovnim vještinama, na primjer, CaPO_4 i elektroporacija. Opći stavovi vezano uz transformacije sustava stanica domaćina kod sisavaca opisani su u U.S. Patentu Br. 4,399,216. Transformacije u kvascu obično se izvode u skladu s postupkom prema van Solingenu i sur., *J. Bact.* 130(2):946-7 (1977), te Hsiao i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(8):3829-33 (1979). Međutim, drugi postupci za uvođenje DNA u stanice, poput mikroinjiciranja u jezgru, elektroporacije, spajanja bakterijskih protoplasta s neoštećenim stanicama, ili polikationa, na primjer, polibrena ili poliomitina, mogu se također rabiti. Za razne postupke transformacija stanica sisavaca, pogledati Keown, i sur., *Methods in Enzymology* 185:527-37 (1990), te Mansour, i sur., *Nature* 336(6197):348-52 (1988).

Prikladne stanice domaćini za kloniranje ili ekspresiju nukleinske kiseline (na primjer, DNA) u vektorima ovdje obuhvaćaju prokariote, kvasac, ili više eukariotske stanice. Prikladni prokarioti obuhvaćaju, ali bez ograničenja, cubakterije, kao što su gram-negativni ili gram-pozitivni organizmi, na primjer, *Enterobacteriaceae* kao *E. coli*. Razni rodovi *E. coli* javno su dostupni, poput *E. coli* K12 rod MM294 (ATCC 3 1.446); *E. coli* X1 776 (ATCC 3 1.537); *E. coli* rod W3 110 (ATCC 27.325) i K5 772 (ATCC 53.635). Druge prikladne prokariotske stanice domaćini obuhvaćaju *Enterobacteriaceae* kao što su *Escherichia*, na primjer, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, na primjer, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, na primjer, *Serratia marcescens*, te *Shigella*, kao i *Bacilli* poput *B. subtilis* i *B. licheniformis* (na primjer, *B. licheniformis* 4 1 P otkriven u DD266, 7 10, objavljenom 12. travnja 1989), *Pseudomonas* poput *P. aeruginosa*, te *Streptomyces*. Ti primjeri samo slikovito opisuju, a ne ograničavaju izum. Rod W3110 posebno se preferira kao domaćin ili domaćin roditelj, jer je to uobičajeni rod domaćin za fermentacije rekombinantnih DNA produkata. Po mogućnosti, stanica domaćin izlučuje minimalne količine proteolitičkih enzima. Na primjer, rod W3 110 može se izmijeniti kako bi se izazvala genetska mutacija u genima koji kodiraju proteine endogene za domaćina, uz primjere takvih domaćina koji uključuju *E. coli* W3110 rod 1A2, koji ima potpuni genotip *ronA*; *E. coli* W3 110 rod 9E4, koji ima potpuni genotip *ton4 ptr3*; *E. coli* W3110 rod 27C7 (ATCC 55,244), koji ima potpuni genotip *tonA, ptr3 phoA E15 (argF-lac) I69 degP ompT /can'*; *E. coli* W3110 rod 40B4, koji je rod 37D6 te sadrži na kanamicin neotpornu *degP* deleciju mutaciju; te *E. coli* rod koji ima mutiranu periplazmatsku proteazu otkriven u U.S. Patentu Br. 4,946,783 izdanom 7. kolovoza 1990. Druga je mogućnost po kojoj su prikladni *in vivo* postupci kloniranja, na primjer, PCR ili druge reakcije polimeraza nukleinskih kiselina.

Osim prokariota, eukariotski mikrobi poput vlaknastih gljivica ili kvasca prikladni su domaćini za kloniranje ili ekspresiju vektora fuzijskih proteina. *Saccharomyces cerevisiae* je niži eukariotski mikroorganizam koji se uobičajeno rabi kao domaćin. Ostali uključuju *Schizosaccharomyces pombe* [Beach i Nurse, *Nature* 290:140-3 (1981); EP 139,383 objavljen 2. svibnja 1995]; *Muyveromyces* domaćine [U.S. Patent Br. 4,943,529; Fleer, i sur., *Bio/Technology* 9(10):968-75 (1991)] poput, na primjer, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574) [de Lourencourt i sur., *J. Bacteriol.* 154(2):737-42 (1983)]; *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906) [Van den Berg i sur., *Bio/Technology* 8(2):135-9 (1990)]; *K. thermotolerans*, te *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070) [Sreekrishna i sur., *J. Basic Microbiol.* 28(4):265-78 (1988)]; *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* [Case, i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(10):5259-63 (1979)]; *Schwanniomyces* poput *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 objavljen 31. listopada 1990.); te vlaknaste gljivice kao što su, na primjer, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 objavljen 10. siječnja 1991.), te *Aspergillus* domaćini poput *A. nidulans* [Ballance i sur., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112(1):284-9 (1983)]; Tilburn, i sur., *Gene* 26(2-3):205-21 (1983); Yelton, i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(5):1470-4 (1984)], te *A. niger* [Kelly i Hynes, *EMBO J.* 4(2):475-9 (1985)]. Metilotrofni kvasci se izabiru iz skupine koju čine *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* i *Rhodotoruia*. Popis specifičnih vrsta koje su primjeri ovog razreda kvasaca može se naći u C. Antony, *The Biochemistry of Methylotrrophs* 269 (1982).

Prikladne stanice domaćini za ekspresiju fuzijskih proteina ovoga izuma izvode se iz višestaničnih organizama. Primjeri stanica beskralježnjaka uključuju stanice kukaca kao što su *Drosophila S2* i *Spodoptera Sp*, *Spodoptera high5*, kao i stanice biljaka. Primjeri korisnih staničnih linija sisavaca koje služe kao domaćini uključuju stanice jajnika kineskog hrčka (CHO) i COS stanice. Specifičniji primjeri uključuju liniju CV1 iz bubrega majmuna, transformiranu pomoću SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); liniju humanog embrijskog bubrega [stanice 293 ili 293 podklonirane stanice za rast u suspenzijskoj kulturi, Graham, i sur., *J. Gen. Virol.*, 36(1):59-74 (1977)]; stanice jajnika kineskog hrčka /-DHFR [CHO, Urlaub i Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-20 (1980)]; Sertolijeve stanice miša [TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23(1):243-52 (1980)]; humane plućne stanice (W138. ATCC CCL 75); humane jetrene stanice (Hep G2, HB 8065); te mišji tumor dojke (MMT 060562, ATCC CCL51). Smatra se da je izbor prikladne stanice domaćina dio vještine u struci.

Fuzijski proteini ovoga izuma mogu se izravno rekombinantno proizvesti, ili kao proteini koji imaju signalnu sekvencu ili neku drugu dodatnu sekvencu koja stvara specifično mjesto odcjepljivanja na N-završetku zrelog fuzijskog proteina. Općenito, signalna sekvencu može biti sastavni dio vektora, ili može biti dio DNA koja kodira fuzijski protein, a koji je umetnut u vektor. Signalna sekvencu može biti prokariotska signalna sekvencu koja se izabire, na primjer, iz skupine vodećih sekvenci za alkalnu fosfatazu, penicilinazu, lpp, ili toplinski stabilni enterotoksin II. Za izlučivanje kod kvasca, signalna sekvencu može biti, na primjer, vodeća sekvencu invertaze kvasca, vodeća sekvencu alfa faktora (uključujući vodeće sekvence γ -faktora u *Saccharomyces* i *Kluyveromyces*, gdje je potonja opisana u U.S. Patentu Br. 5,010,182), ili vodeća sekvencu kisele fosfataze, vodeća sekvencu glukoamilaze u *C. albicans* (EP 362,179), ili signalna sekvencu opisana u WO 90/13646. Kod ekspresije stanica sisavaca, signalne sekvence sisavaca mogu se rabiti za usmjeravanje izlučivanja proteina, poput signalnih sekvenci izlučenih polipeptida iste ili srodnih vrsta, kao i virusne vodeće sekvence za izlučivanje.

I ekspresijski vektori i vektori za kloniranje sadrže sekvencu nukleinske kiseline koja omogućava vektoru repliciranje u jednoj ili više izabranih stanica domaćina. Takve sekvence dobro su poznate za mnoštvo bakterija, kvasaca, i virusa. Ishodište replikacije iz plazmida pBR322 prikladno je za većinu gram-negativnih bakterija, 2u plazmidno ishodište je prikladno za kvasce, a razna virusna ishodišta (SV40, poliom, adenovirus, VSV ili BPV) korisna su za vektore za kloniranje u stanicama sisavaca.

Ekspresijski vektori i vektori za kloniranje tipično će sadržavati gen odabira, koji se također naziva i marker odabira. Tipični geni odabira kodiraju proteine koji (a) prenose otpornost prema antibioticima ili drugim toksinima, na primjer, ampicilinu, neomicinu, metotreksatu, ili tetraciklinu, (b) nadopunjuju autotrofne nedostatke, ili (c) opskrbljuju neophodne hranjive tvari koje nisu dostupne iz složenog medija, na primjer, gen koji kodira racemazu D-alanina za vrstu *Bacillus*.

Primjeri prikladnih markera odabira za stanice sisavaca oni su koji omogućuju identifikaciju stanica sposobnih za preuzimanje nukleinske kiseline koja kodira fuzijski protein, poput DHFR ili timidin kinaze. Prikladna stanica domaćin prilikom uporabe divljeg tipa DHFR je CHO stanična linija kod koje se javlja smanjena DHFR aktivnost, a koja se priprema i umnožava kako je opisano [Urlaub i Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7): 4216-20 (1980)]. Prikladan gen odabira za uporabu kod kvasaca je trpL gen, koji je prisutan u plazmidu YRp7 kvasca [Stinchcomb, i sur., *Nature* 282(5734):39-43 (1979); Kingsman, i sur., *Gene* 7(2):141-52 (1979); Tschumper, i sur., *Gene* 10(2):157-66 (1980)]. Gen trpL daje marker odabira za mutirani rod kvasca kojem nedostaje mogućnost rasta u triptofanu, na primjer, ATCC Br. 44076 ili PEPC1 [Jones, *Genetics* 85:23-33 (1977)].

Ekspresijski vektori i vektori za kloniranje obično sadrže promotor koji je djelatno povezan na sekvencu nukleinske kiseline koja kodira fuzijski protein radi usmjeravanja sinteze mRNA. Dobro su poznati promotori koje prepoznaje mnoštvo mogućih stanica domaćina. Promotori prikladni za uporabu s prokariotskim domaćinima uključuju promotorske sustave β -laktamaze i laktoze [Chang, i sur., *Nature* 275(5681):617-24 (1978); Goeddel, i sur., *Nature* 281(5732):544-8 (1979)], alkalne fosfataze, promotorski sustav triptofana (up) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.* 8(18): 4057-74 (1980); EP 36,776 objavljen 30. rujna 1981.], te hibridne promotore poput tat promotora [deBoer, i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(1):21-5 (1983)]. Promotori za uporabu u bakterijskim sustavima također će sadržavati Shine-Dalgarno (S.D.) sekvencu koja je djelatno povezana na DNA koja kodira fuzijski protein.

Primjeri prikladnih promotorskih sekvenci za uporabu s domaćinima kvascima uključuju promotore za 3-fosfogliceratnu kinazu [Hitzeman, i sur., *J. Biol. Chem.* 255(24):12073-80 (1980)] ili druge glikolitičke enzime [Hess i sur., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry* 17(23):4900-7 (1978)], poput enolaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze, heksokinaze, piruvat dekarboksilaze, fosfofruktokinaze, glukoza-6-fosfat izomeraze, 3-fosfoglicerat mutaze, piruvat kinaze, triozafosfat izomeraze, fosfoglukozu izomeraze, te glukokinaze.

Ostali promotori kvasaca, koji su inducibilni, te koji imaju dodatnu prednost transkripcije kontrolirane uvjetima rasta, su promotorska područja za alkohol dehidrogenazu 2, izocitokrom C, kiselu fosfatazu, enzime razgrađivanja koji su povezani s metabolizmom šećera, metalotionein, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, te enzime odgovorne za iskorištavanje maltoze i galaktoze. Prikladni vektori i promotori za uporabu u ekspresiji kod kvasaca dalje su opisani u EP 73,657. Transkripcija mRNA koja kodira fuzijski protein iz vektora u stanicama domaćinima iz sisavaca može se kontrolirati, na primjer, pomoću promotora koji su dobiveni iz genoma virusa poput poliom virusa, virusa kokošjih boginja, adenovirusa (poput Adenovirusa 2), goveđeg papiloma virusa, pilećeg sarkoma virusa, citomegalovirusa, retrovirusa, virusa hepatitisa B, te Simian virusa 40 (SV40), iz heterolognih promotora sisavaca, na primjer, aktinskog promotora ili imunoglobulinskog promotora, te iz promotora koji se aktiviraju kod toplinskog stresa, pod uvjetom da su takvi promotori spojivi sa sustavima stanica domaćina.

Transkripcija polinukleotida koji kodira fuzijski protein putem viših eukariota može se pojačati umetanjem sekvence za pojačanje u vektor. Pojačavajuće sekvence su elementi u DNA koji imaju cis oblik, obično od oko 10 do 300 bp, koji djeluju na promotor kako bi se pojačala njegova transkripcija. Mnoge pojačavajuće sekvence poznate su za gene sisavaca (globin, elastaza, albumin, α -ketoprotein, i inzulin). Tipično se, međutim, rabe pojačavajuće sekvence iz virusa eukariotskih stanica. Primjeri uključuju SV40 pojačavajuću sekvencu na kasnoj strani ishodišta replikacije (bp 100-270), ranu promotorsku pojačavajuću sekvencu citomegalovirusa, pojačavajuću sekvencu poliomna na kasnoj strani ishodišta replikacije, te pojačavajuće sekvence adenovirusa. Pojačavajuća sekvenca se može sastaviti s vektorom na položaju 5' ili 3' na kodirajuću sekvencu za fuzijski protein, ali se preferira smještaj na mjestu 5' od promotora.

Ekspresijski vektori koji se rabe u eukariotskim stanicama domaćinima (kvasci, gljivice, kukci, biljke, životinje, ljudi, ili stanice iz drugih višestaničnih organizama koje su pretvorene u jezgre) također će sadržavati sekvence koje su neophodne za prekidanje transkripcije, te za stabiliziranje mRNA. Takve sekvence su uobičajeno dostupne iz 5', te ponekad 3' područja iz eukariotskih ili virusnih DNA ili cDNA koja nisu translatirana. Ta područja sadrže segmente nukleotida transkribirane u obliku poliadeniliranih odsječaka u netranslatiranom dijelu mRNA koja kodira fuzijski protein.

Razni oblici fuzijskog proteina mogu se prikupiti iz medija za kulturu ili lizata stanica domaćina. Ako je vezan za membranu, može se osloboditi s membrane pomoću prikladne otopine detergenta (na primjer, Triton-X 100) ili enzimatskim odcjepljivanjem. Stanice koje se rabe u ekspresiji fuzijskog proteina mogu se oštetiti raznim fizičkim ili kemijskim načinima, poput ciklusa smrzavanja-otapanja, stavljanja u ultrazvučnu kupelj, mehaničkog oštećivanja, ili sredstvima za liziranje stanica.

Pročišćavanje heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma:

Nakon izvršene ekspresije heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma u odgovarajućoj stanici domaćinu, analozi se mogu izolirati i pročistiti. Sljedeći postupci primjeri su prikladnih postupaka pročišćavanja: frakcioniranje na karboksimetilcelulozi; gel filtracija poput Sephadex-a G-75; anionsko izmjenjivačka smola poput DEAE ili Mono-Q; kationska izmjena poput CM ili Mono-S; protein A sefaroza za uklanjanje onečišćavača poput IgG; kolone za keliranje metala radi vezanja oblika polipeptida koji su obilježeni pomoću epitopa; HPLC reverzne faze; kromatofokusiranje; silikagel; etanolna precipitacija; te precipitacija s amonijevim sulfatom.

Razni postupci pročišćavanja proteina mogu se primijeniti, a ti su postupci poznati u struci i opisani, na primjer, u Deutscher, *Methods in Enzymology* 182:83-9 (1990), te Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982). Izabrani koraci pročišćavanja ovisit će o prirodi procesa proizvodnje koji se rabi, te o pojedinom fuzijskom proteinu koji se proizvodi. Na primjer, fuzijski proteini koji sadrže Fc odsječak mogu se učinkovito pročišćavati pomoću Protein A ili Protein G afinitetnog matriksa. Mogu se rabiti puferi niskog ili visokog pH za eluiranje fuzijskog proteina s afinitetnog matriksa. Blagi uvjeti eluiranja doprinijet će sprječavanju ireverzibilne denaturacije fuzijskog proteina. Također se mogu rabiti puferi koji sadrže imidazol. Primjer 3 opisuje neke uspješne protokole pročišćavanja za fuzijske proteine ovoga izuma.

Karakterizacija heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma:

Brojni postupci postoje za karakterizaciju fuzijskih proteina ovoga izuma. Neki od tih postupaka uključuju: SDS-PAGE u kombinaciji s postupcima bojanja proteina ili imunoblot uz uporabu anti-IgG ili anti-HSA antitijela. Ostali postupci uključuju matriksom potpomognutu masenu spektrometriju laserske desorpcije/ionizacije (MALDI-MS), tekućinsku kromatografiju/masenu spektrometriju, izoelektrično fokusiranje, analitičku ionsku izmjenu, kromatofokusiranje, te cirkularni dikroizam, da nabrojimo samo nekoliko. Reprezentativni broj heterolognih fuzijskih proteina karakteriziran je pomoću SDS-PAGE u kombinaciji s imunoblotom, kao i masenom spektrometrijom (pogledati primjere 4 i 5, te slike 3 i 4).

Na primjer tabela 3 (pogledati primjer 5) slikovito prikazuje izračunatu molekulsku masu za reprezentativni broj fuzijskih proteina, kao i masu određenu pomoću masene spektrometrije. Osim toga, slike 3 i 4 slikovito prikazuju molekulske težine reprezentativnog broja fuzijskih proteina kako su određene pomoću SDS PAGE. Svi heterologni fuzijski proteini koji su testirani, pokazali su prolaznu ekspresiju i izlučivanje. Osim toga, signalna sekvenca za Igk je odcijepljena radi dobivanja proteina s ispravnim N-završetkom.

Nadalje, tabela 3 slikovito prikazuje da je u nekim slučajevima masa određena masenom spektrometrijom veća od očekivane. To je posljedica glikozilacije Fc dijela, i C terminalnog produženja. Enzimatska razgradnja fuzijskih proteina, nakon koje slijedi HPLC reverzne faze i masena spektrometrija omogućuju identifikaciju peptidnih frakcija koje sadrže šećerne skupine. Tim se frakcijama zatim može utvrditi sekvenca N-terminalnih aminokiselina radi

identifikacije mogućih glikozilacijskih mjesta. Na primjer, karakterizacija Eksendina-4-Fc (SEQ ID NO: 29) pokazuje da su serin na položaju 39 i treonin na položaju 50 O-glikozilirani, a asparagin na položaju 122 je N-glikozilirani.

Reprezentativnom broju GLP-1 fuzijskih proteina također je testirana aktivnost. Brojni postupci postoje za otkrivanje GLP-1 aktivnosti *in vitro* i *in vivo* (pogledati primjere 6, 7, 8 i 9). Tabela 4 (primjer 6) slikovito prikazuje aktivnost GLP-1 receptora povezanu uz nekoliko GLP-1 spajanja. Brojevi se odnose na aktivnost povezanu uz Val⁸-GLP-1 (7-37)OH. Svi testirani fuzijski proteini imali su aktivnost GLP-1 receptora. Niska razina *in vitro* aktivnosti ne ukazuje obavezno na slabi učinak *in vivo*. Zbog značajnog povišenja poluživota tih fuzijskih proteina, slaba *in vitro* aktivnost ne predskazuje općenito slabu *in vivo* aktivnost. Slika 7 i primjer 7 slikovito prikazuju produženi poluživot u vezi s fuzijskim proteinima ovoga izuma. Na primjer, Val⁸-GLP-1-Fc je imao poluživot od otprilike 45 sati kod majmuna, Val⁸-GLP-1-HSA imao je poluživot od oko 87 sati kod majmuna, Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 imao je poluživot nakon IV primjene otprilike 55 sati kod pasa, te je Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 imao poluživot nakon SC primjene otprilike 38 sati kod pasa.

Pripravci izuma:

Fizička stabilnost je također osnovno obilježje za terapijske pripravke proteina. GLP-1 spojevi se posebno teško proizvode i oblikuju uslijed strukturnih promjena koje nastaju tijekom postupka obrade. Na primjer, neki GLP-1 spojevi imaju općenitu sklonost agregiranju. Osim toga, pokazalo se da se neki GLP-1 spojevi pretvaraju iz topivog i aktivnog oblika α -heliksa u netopivi i moguće neaktivni oblik β -nabrane ploče. Spajanje GLP-1 spojeva na velike proteine poput Fc područja IgG-a ili albumina ne samo da povećava poluživot GLP-1 spoja, već također doprinosi fizičkoj i konformacijskoj stabilnosti GLP-1 spoja. Na primjer, Val⁸-GLP-1-vezni peptid-HSA u PBS-u je stabilan na 37°C do 30 dana.

Heterologni fuzijski proteini ovoga izuma mogu se oblikovati s jednim ili više ekscipijensa. Aktivni fuzijski proteini ovoga izuma mogu se kombinirati s farmaceutski prihvatljivim puferom, a pH se može podesiti tako da osigura prihvatljivu stabilnost, i pH prihvatljiv za primjenu poput parenteralne primjene.

Po izboru, može se dodati jedno ili više farmaceutski prihvatljivih antimikrobnih sredstava. Preferirana farmaceutski prihvatljiva mikrobnna sredstva su meta-krezol i fenol. Jedna ili više farmaceutski prihvatljivih soli može se dodati radi podešavanja ionske jakosti ili toničnosti. Jedan ili više ekscipijensa može se dodati radi daljnjeg podešavanja izotoničnosti pripravka. Glicerol je primjer ekscipijensa koji podešava izotoničnost. Farmaceutski prihvatljiv znači da je prikladan za primjenu kod ljudi ili drugih životinja, te stoga ne sadrži toksične sastojke ili nepoželjne onečišćivače, te ne interferira s aktivnošću prisutnih aktivnih spojeva.

Oblik farmaceutski prihvatljive soli heterolognih fuzijskih proteina ovoga izuma može se rabiti u ovom izumu. Kiseline koje se obično primjenjuju za stvaranje soli nastalih dodatkom kiseline su anorganske kiseline poput klorovodične kiseline, bromovodične kiseline, jodovodične kiseline, sumporne kiseline, fosforne kiseline, i slično, te organske kiseline poput *p*-toluensulfonske kiseline, metansulfonske kiseline, oksalne kiseline, *p*-bromofenil-sulfonske kiseline, karbamične kiseline, sukcinilne kiseline, limunske kiseline, benzojeve kiseline, octene kiseline, i slično. Preferirane soli nastale dodatkom kiseline su one koje nastaju s anorganskim kiselinama poput klorovodične kiseline i bromovodične kiseline.

Soli koje nastaju dodatkom baza uključuju one koje se izvode iz anorganskih baza, poput hidroksida, karbonata, bikarbonata, i slično, amonija ili alkalijskih ili zemno alkalijskih metala. Takve baze korisne za pripremu soli ovoga izuma stoga uključuju natrijev hidroksid, kalijev hidroksid, amonijev hidroksid, kalijev karbonat, i slično.

Primjena pripravaka:

Primjena se može odvijati bilo kojim putem za koji liječnici osnovnih vještina znaju da je učinkovit. Periferni, parenteralni je jedan od takvih postupaka. Parenteralna primjena obično podrazumijeva u medicinskoj literaturi injekciju doznog oblika u tijelo pomoću sterilne šprice ili neke druge mehaničke sprave poput infuzijske pumpe. Periferni parenteralni putevi mogu uključivati intravenske, intramuskularne, subkutane, te intraperitonealne puteve primjene.

Heterologni fuzijski proteini ovoga izuma mogu također biti podložni primjeni putem oralnih, rektalnih, nazalnih, ili nižih respiratornih puteva, a koji nisu parenteralni putevi. Od tih neparenteralnih puteva, preferiraju se niži respiratorni put i oralni put.

Fuzijski proteini ovoga izuma mogu se rabiti za liječenje raznolikog mnoštva bolesti i stanja. Fuzijski proteini ovoga izuma primarno otkrivaju svoje biološke učinke djelovanjem na receptor, koji se spominje kao "GLP-1 receptor". Osobe koje boluju od bolesti i/ili stanja koja reagiraju povoljno na stimulaciju GLP-1 receptora ili na primjenu GLP-1 spojeva mogu se stoga liječiti s GLP-1 fuzijskim proteinima ovoga izuma. Za te osobe može se reći da "imaju potrebu za liječenjem s GLP-1 spojevima" ili "potrebu za stimulacijom GLP-1 receptora". Uključene su osobe koje boluju od dijabetesa neovisnog o inzulinu, dijabetesa ovisnog o inzulinu, moždanog udara (pogledati WO 00/16797), infarkta miokarda (pogledati WO 98/08531), pretilosti (pogledati WO 98/19698), kataboličkih promjena nakon operacije (pogledati U.S. Patent Br. 6,006,753), funkcionalne dispepsije, te sindroma crijevne iritacije (pogledati WO 99/64060). Također su uključene osobe kojima je potrebno profilaktičko liječenje s GLP-1 spojevima, na primjer, osobe kod kojih postoji rizik za razvoj dijabetesa neovisnog o inzulinu (pogledati WO 00/07617). Kod osoba s oštećenom tolerancijom glukoze, ili oštećenim metabolizmom glukoze kod posta, osoba čija je tjelesna težina oko 25% iznad normalne tjelesne težine za visinu i tjelesnu građu tih osoba, osoba s djelomičnom pankreatektomijom, osoba koje imaju jednog ili više roditelja koji boluju od dijabetesa neovisnog o inzulinu, osoba koje su imale gestacijski dijabetes i osoba koje su imale akutni ili kronični pankreatitis postoji rizik za razvoj dijabetesa neovisnog o inzulinu.

"Učinkovita količina" GLP-1 spoja je količina koja izaziva željeni terapijski i/ili profilaktički učinak bez uzrokovanja neželjenih nuspojava prilikom davanja osobi kojoj je potrebna stimulacija GLP-1 receptora. "Željeni terapijski učinak" obuhvaća jedno ili više od sljedećeg: 1) ublažavanje simptoma povezanih uz bolest ili stanje; 2) odgodu pojave simptoma povezanih uz bolest ili stanje; 3) produžen život u usporedbi s odsustvom liječenja; te 4) bolju kvalitetu života u usporedbi s odsustvom liječenja. Na primjer, "učinkovita količina" GLP-1 spoja za liječenje dijabetesa je količina koja bi izazvala bolju kontrolu koncentracije glukoze u krvi nego kod odsustva liječenja, time izazivajući odgođeno pojavljivanje dijabetičkih komplikacija poput retinopatije, neuropatije ili bolesti bubrega. "Učinkovita količina" GLP-1 spoja za sprječavanje dijabetesa je količina koja bi odgodila, u usporedbi s odsustvom liječenja, pojavu povišene razine glukoze u krvi koja zahtijeva liječenje s lijekovima protiv hipoglikemije poput sulfonil urea, tiazolidindiona, inzulina i/ili bisgvanidina.

Doza fuzijskog proteina koja je učinkovita u normaliziranju glukoze u krvi bolesnika ovisit će o brojnim faktorima, među koje su uključeni, bez ograničenja, spol, težina i dob osobe, stupanj nemogućnosti reguliranja glukoze u krvi, put primjene, te bioraspoloživost, farmakokinetički profil fuzijskog proteina, jačina djelovanja, te priprava.

Ovaj izum obuhvaća GLP-1 spojeve kojima su poboljšana biokemijska i biofizička svojstva putem spajanja na albuminski protein, odsječak albumina, analog albumina, Fc protein, Fc odsječak, ili Fc analog. Ekspresija tih heterolognih proteina može se uspješno izvesti u stanicama domaćinima, uz zadržavanje signalnih aktivnosti povezanih s aktivacijom GLP-1 receptora, te uz produženi poluživot.

Sljedeći primjeri predstavljeni su radi daljnjeg opisivanja izuma. Opseg ovoga izuma ne obuhvaća samo sljedeće primjere. Iskusni stručnjaci će uvidjeti da su pojedini reagensi, oprema, te postupci opisani isključivo radi slikovitog prikaza, te da im nije svrha da ograniče ovaj izum, na bilo koji način.

Primjer 1:

Izrada DNA koja kodira heterologne fuzijske proteine

Primjer 1a: Izrada DNA koja kodira Val⁸-GLP-1 (7-37)-Fc: Fc dio humanog IgG1 izolira se iz knjižnice cDNA, te sadrži potpuno glavno područje, te CH2 i CH3 domene. Načini se podklon odsječka koji sadrži 696 parova baza tog Fc dijela humanog IgG1 na NheI i Eco47III mjestima ekspresijskog vektora sisavaca pJB02 kako bi nastao pJB02/Fc (pogledati Sliku 5). DNA koja kodira signalnu sekvencu za izlučivanje Igκ spojena na Val⁸-GLP-1 (7-37) proizvedena je pomoću *in vitro* hibridizacije četiri komplementarna oligonukleotida koji se preklapaju:

5' – CTAGCCACCA**ATGG**GAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTT
CCAGGTTCCACTGGTGACCAGTG – 3' [SEQ ID NO:12]

5' – GAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTGGAGGGCCAGGCCGCCAAGGA
GTTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGAAGAGGC – 3' [SEQ ID NO:13]

5' – TGAAGGTGCCCTCCACGTGGTCAACAGTGGAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTA
CCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTGG – 3' [SEQ ID
NO:14]

5' – GCCTCTTCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGCGGGCCTGGCCCTCCAGA
TAGGAGGACACGTCGGAGG – 3' [SEQ ID NO:15]

Reakcija hibridizacije provodi se pomoću ekvivalentnih količina svakog oligonukleotida (konačna koncentracija za svaki oligo 1 pm/μl). Smjesa oligonukleotida zagrijava se 5 min na 100°C u puferu za ligaciju (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/ml goveđeg serumskog albumina), te se zatim hladi barem 2 sata na 30°C.

Nastali produkt hibridizacije se podvrgava ligaciji tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi ili preko noći na 16°C na pJB02/Fc vektorsku osnovicu, koja je razgrađena s NheI i Eco47III. Produkti ligacije rabe se za preinaku prikladnih XL-1 Plavih stanica (Stratagene). Rekombinantni plazmidi se testiraju na prisutnost umetaka koji kodiraju peptide pomoću razgradnje klonova s NcoI (kodira Kozak sekvencu, te prvi Met signalnog peptida), te određivanjem sekvence. Nastali ekspresijski plazmid koji se rabi u transfekcijskim testovima označen je kao pJB02-V8-GLP-1-Fc (Slika 5).

Primjer 1b: Izrada DNA koja kodira Val⁸-GLP-1 (7-37)-HSA: Plazmid HSA/pcDNA3.1GS kupljen je od Invitrogen-a (Katalog # H-M12523M-pcDNA3.1/GS), te rabljen kao kalup za izolaciju cDNA koja kodira humani serumski albumin (HSA). HSA cDNA se pripravlja pomoću PCR, pri čemu se DNA koja kodira vodeću sekvencu, kao i pro-peptid od šest aminokiselina uklanja s kraja 5'. Osim toga, stop kodoni se dodaju izravno na kraj 3' sekvence koja kodira HSA. Konačno, mjesta za restrikcijske enzime načinjena su na krajevima 5' i 3' radi olakšavanja kloniranja. HSA DNA sekvencu koja je prisutna u izvornom vektoru kupljenom od Invitrogen-a sadržavala je izmjenu samo jedne baze u 3' području gena (položaj 667) u usporedbi s nativnom humanom sekvencom. Ta promjena daje kodon za Asn umjesto Asp. Stoga, uporabom postupka PCR mutageneze preklapajućih vlakana, kodon se mijenja u kod za Asp na tom položaju. Nastala DNA koja kodira HSA klonira se na NheI i HindIII mjesta u pJB02, kako bi nastao pJB02-HSA (Slika 6).

Igk vodeća sekvencu spojena na Val⁸-GLP-1 (7-37) sekvencu proizvodi se kao što je raspravljeno u Primjeru 1a. Ta DNA se podvrgava ligaciji na NheI i FspI mjesta u pJB02-HSA, kako bi nastao pJB02-Val⁸-GLP-1-HSA.

Primjer 1c: Izrada DNA koja kodira Val⁸-GLP-1 (7-37)-vezni peptid-HSA:

Vektor pJB02-HSA pripravlja se kako je raspravljeno u Primjeru 1b. DNA koja kodira sekvencu za vezni peptid [GGGGS]₃ podvrgava se ligaciji u okviru na 5' kraj DNA koja kodira HSA, kako bi nastao pJB02-vezni peptid-HSA (Slika 7). DNA koja kodira Igk vodeću sekvencu, te koja je spojena na Val⁸-GLP-1 (7-37) sekvencu i dio 5' sekvence veznog peptida, proizvodi se kako je raspravljeno u Primjeru 1a. Ta se DNA podvrgava ligaciji na NheI i BspEI mjesta u pJB02, kako bi nastao pJB02-Val⁸-GLP-1-vezni peptid-HSA.

Primjer 1d: Izrada DNA koja kodira Eksendin-4-Fc:

Plazmid pJB02/Fc pripravlja se prema opisu u Primjeru 1a. DNA koja kodira Igk signalnu sekvencu spojena na Eksendin-4, proizvodi se pomoću *in vitro* hibridizacije sljedećih preklapajućih i komplementarnih oligonukleotida:

```

5' - CTAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTG
    GGTTCACAGGTTCCACCGGTCAC - 3' [SEQ ID NO:16]

5' - GGAGAGGGAACCTTCACCAGCGACCTGAGCAAGCAGATGGAGGAGGAGGCCGT
    GAGACTG - 3' [SEQ ID NO:17]

5' - TTCATCGAGTGGCTGAAGAACGGAGGACCAAGCAGCGGAGCCCCTCCTCCT
    AGC - 3' [SEQ ID NO:18]

5' - GAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCA
    TGGTGG - 3' [SEQ ID NO:19]

5' - CTCCTCCTCCATCTGCTTGCTCAGGTCGCTGGTGAAGGTTCCCTCTCCGTGA
    CCGGTG - 3' [SEQ ID NO:20]

5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTTGGTCCTCCGTTCTTCAGCCACTCGAT
    GAACAGTCTCACGGC - 3' [SEQ ID NO:21]

```

5 Reakcija hibridizacije se izvodi prema opisu u Primjeru 1a. Produkt hibridizacije se podvrgava ligaciji na pJB02 vektor, koji je razgrađen s NheI i Eco47III, prema opisu u Primjeru 1a, a kako bi nastao pJB02-Eksendin-4-Fc.

Primjer 1e: Izrada DNA koja kodira Eksendin-4-HSA:

10 Plazmid pJB02-HSA pripravlja se prema opisu u Primjeru 1b. DNA koja kodira Igκ signalnu sekvencu spojena na Eksendin-4, proizvodi se pomoću *in vitro* hibridizacije istih preklapajućih i komplementarnih oligonukleotida koji su opisani u Primjeru 1d. Reakcije hibridizacije se također izvode prema gornjem opisu. DNA se klonira na jedinstvena NheI i FspI mjesta u pJB02-HSA, kako bi nastao pJB02-Eksendin-4-HSA.

Primjer 1f: Izrada DNA koja kodira Eksendin-4-vezni peptid-HSA:

15 Plazmid pJB02-vezni peptid-HSA izrađuje se prema opisu u Primjeru 1c. DNA koja kodira signalnu sekvencu Igκ spojena na Eksendin-4 i dio 5' sekvence za vezni peptid proizvodi se kao u Primjeru 1d. Ta DNA se klonira na jedinstvena NheI i BspEI mjesta u pJB02-vezni peptid-HSA, kako bi nastao pJB02-Eksendin-4-vezni peptid-HSA.

Primjer 1g: Izrada DNA koja kodira Val⁸-GLP-1/C-Ex-Fc:

20 Plazmid pJB02-Eksendin-4-Fc se pripravlja prema opisu u Primjeru 1d. DNA koja kodira Eksendin-4 izrezuje se iz vektora pomoću AgeI i Eco47III. DNA koja kodira Val⁸-GLP-1/C-Ex proizvodi se pomoću *in vitro* hibridizacije sljedećih preklapajućih i komplementarnih oligonukleotida:

```

5' -CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTGGA
      GGGCCAGGCCGCCA - 3' [SEQ ID NO:22]

5' - AGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGCAGCAGCGG
      AGCCCCTCCTCCTAGC - 3' [SEQ ID NO:23]

5' - CTCCAGATAGGAGGACACGTCGGAGGTGAAGGTGCCCTCCAC
      GTGA - 3' [SEQ ID NO:24]

5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTGCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCCGA
      TGAATTCCTTGGCGGCCTGGCC - 3' [SEQ ID NO:25]

```

Reakcija hibridizacije se izvodi prema opisu u Primjeru 1a. Produkt hibridizacije se podvrgava ligaciji na mjesto Eksendina-4 u pJB02-Eksendin-4-Fc ekspresijskom vektoru, kako bi nastao pJB02-Val⁸-GLP-1/C-Ex-Fc.

Primjer 1h: Izrada DNA koja kodira Val⁸-Glu²²-GLP-1-Fc:

Plazmid pJB02-Eksendin-4-Fc pripravlja se prema opisu u Primjeru 1d. DNA koja kodira Eksendin-4 izrezuje se iz vektora pomoću AgeI i Eco47III. DNA koja kodira Val⁸-Glu²²-GLP-1 proizvodi se pomoću *in vitro* hibridizacije sljedećih preklapajućih i komplementarnih oligonukleotida:

```

5' -CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTCGA
      GGAGCAGGCCGCCA - 3' [SEQ ID NO:26]

5' - AGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGC - 3' [SEQ ID NO:27]

5' - GCCCCGGCCCTTCACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGCC
      TGCTC - 3' [SEQ ID NO:28]

5' - CTCGAGATAGGAGGACACGTCGGAGGTGAAGGTGCCCT
      CCACGTGA - 3' [SEQ ID NO:29]

```

Reakcija hibridizacije se izvodi prema opisu u Primjeru 1a. Produkt hibridizacije se podvrgava ligaciji na mjesto Eksendina-4 u pJB02-Eksendin-4-Fc ekspresijskom vektoru, kako bi nastao pJB02-Val⁸-Glu²²-GLP-1-Fc.

Primjer 1i: Izrada DNA koja kodira Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex-Fc:

Plazmid pJB02-Eksendin-4-Fc pripravlja se prema opisu u Primjeru 1d. DNA koja kodira Eksendin-4 izrezuje se iz vektora pomoću AgeI i Eco47III. DNA koja kodira Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex proizvodi se pomoću *in vitro* hibridizacije sljedećih preklapajućih i komplementarnih oligonukleotida:

```

5' - CCGGTCACGTGGAGGGCACCTTCACCTCCGACGTGTCCTCCTATCTCGA
      GGAGCAGGCCGCCA - 3' [SEQ ID NO:30]

5' - AGGAATTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGCAGCAGCGGA
      GCCCCTCCTCCTAGC - 3' [SEQ ID NO:31]

5' - CTCGAGATAGGAGGACACGTCCGAGGTGAAGGTGCCC
      TCCACGTGA - 3' [SEQ ID NO:32]

5' - GCTAGGAGGAGGGGCTCCGCTGCTGCCCCGGCCCTTACCAGCCAGGCGA
      TGAATTCCTTGGCGGCCTGCTC - 3' [SEQ ID NO:33]

```

Reakcija hibridizacije se izvodi prema opisu u Primjeru 1a. Produkt hibridizacije se podvrgava ligaciji na mjesto Eksendina-4 u pJB02-Eksendin-4-Fc ekspresijskom vektoru, kako bi nastao pJB02-Val⁸-Glu²²-GLP-1/C-Ex-Fc.

Primjer 1j: Izrada DNA koja kodira Gly⁸-GLP-1-Fc:

Plazmid pJB02-Eksendin-4-Fc pripravlja se prema opisu u Primjeru 1d. DNA koja kodira Eksendin-4 izrezuje se iz vektora pomoću AgeI i Eco47III. DNA koja kodira Gly⁸-GLP-1 proizvodi se pomoću *in vitro* hibridizacije sljedećih preklapajućih i komplementarnih oligonukleotida:

```

5' - CCGGTCACGGCGAGGGCACCTTCACTAGTGACGTGTCCTCCTATCTGGA
      GGGCCAGGCCGCCA - 3' [SEQ ID NO:34]

5' - AGGAGTTCATCGCCTGGCTGGTGAAGGGCCGGGGC - 3' [SEQ ID NO:35]

5' - CTCCAGATAGGAGGACACGTCACTAGTGAAGGTGCCCTC
      GCCGTGA - 3' [SEQ ID NO:36]

5' - GCCCCGGCCCTTACCAGCCAGGCGATGAACTCCTTGGCGGC
      CTGGCC - 3' [SEQ ID NO:37]

```

Reakcija hibridizacije se izvodi prema opisu u Primjeru 1a. Produkt hibridizacije se podvrgava ligaciji na mjesto Eksendina-4 u pJB02-Eksendin-4-Fc ekspresijskom vektoru, kako bi nastao pJB02-Gly⁸-GLP-1-Fc.

Primjer 2:

Ekspresija heterolognih fuzijskih proteina

Ekspresija fuzijskih proteina koje kodiraju izradene DNA iz Primjera 1 provedena je pomoću prolazne transfekcije stanica HEK 293EBNA (i pričvršćenih i suspendiranih). Stanice se izbroje i nasade 24 sata prije transfekcije. Transfekcijska smjesa se pripravlja miješanjem FuGeneTM6 transfekcijskog reagensa (Roche Molecular Biochemicals, katalog # 1814443) s OptiMEM-om (Gibco/BRL), te inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta, kada se dodaje DNA, te se smjesa inkubira dodatnih 15 minuta. Neposredno prije transfekcije, na ploču se dodaje svježi medij za rast. Tabele 1 i 2 donose daljnje detalje o transfekciji.

Tabela 1: Reagensi koji se rabe u prolaznoj transfekciji stanica 293EBNA.

Posuda za kulturu tkiva	Broj nasađenih stanica	DNA (μg)	FuGene (μl)	OptiMEM medij (ml)	Volumen medija za rast (ml)
35 mm	5×10^5	1,5	9	0,102	2
100 mm	2×10^6	12	73	0,820	10
700 cm ² (RB)	2×10^7	65	400	4,0	100

Tabela 2: Sastav medija

Medij za rast i transfekciju	Medij za prikupljanje stanica
DMEM F12 3:1	Hybritech baza
5% FBS	1 mM Ca ²⁺
20 mM HEPES	20 mM HEPES
2 mM L-glutamin	1 μg/ml Nuselin (humani inzulin)
50 μg/ml geneticin (G418 NEO)	1 μg/ml humani transferin
50 μg/ml tobromicin	50 μg/ml tobromicin

Za transfekcije na maloj površini (posude 35mm-10mm), stanice se isperu s PBS-om, te se prebace u medij za prikupljanje stanica 24 sata nakon transfekcije, a medij se skuplja i mijenja svakih 24 sata tijekom nekoliko dana. U slučaju transfekcija na velikoj površini (boce u obliku valjka, 700 cm²), boce u obliku valjka se isperu s PBS-om 48 sati nakon transfekcije, te se vrši promjena u medij za prikupljanje stanica. Medij se skuplja i mijenja svakih 24 sata tijekom najmanje 10 uzastopnih dana. Rutinski se samo 10 ciklusa prikupljanja stanica rabi za pročišćavanje proteina.

Primjer 3:Pročišćavanje heterolognih fuzijskih proteinaPrimjer 3a: pročišćavanje Val⁸-GLP-1-Fc

Otprilike 4,5 litre prilagođenog medija (razina ekspresije fuzijskih proteina otprilike 20 μg/ml) iz transfekcija na velikoj površini profiltrira se pomoću CUNO filterskog sustava, te se ukoncentrira do 250 ml pomoću ProFlux sustava dodirne protočne filtracije s 10 K filterskom membranom. Val⁸-GLP-1-Fc se uhvati pomoću 5 ml HiTrap protein A kolone u 1× PBS-u, pH 7,4 uz brzinu protoka od 2 ml/min, te se eluira s 50 mM limunskom kiselinom pH 3,3. Frakcije (1 ml) se prikupe u epruvete koje sadrže 4 ml 1× PBS-a i 100 μl 1 M Tris pH 8.

Frakcije koje sadrže fuzijske proteine, kao što je određeno pomoću SDS-PAGE i HPLC obrnute faze na Zorbax-u C8, skupljaju se zajedno, te se nanose na Superdex 75 60/60 kolonu u 1× PBS pH 7,4, uz brzinu protoka od 10 ml/min. Pozitivne frakcije (20 ml/epruveta) se skupljaju i spajaju. Spojene frakcije se tada podvrgavaju C4 Kromatografiji obrnute faze u 0,1% TFA vodi, uz brzinu protoka od 3 ml/min. Val⁸-GLP-1-Fc se eluira pomoću gradijenta od 5% B (0,1% TFA u acetonitrilu) do 100% B za 70 min. Eluirane frakcije (3 ml/epruveta) se skupljaju. Acetonitril se uklanja pomoću sušenja uz podtlak, te se dodaje 1 ml H₂O. Pročišćeni uzorak (otprilike 32 ml) dva puta se dijalizira nasuprot 4 litre 1× PBS-a pH 7,4.

Dijalizirani uzorak se zatim profiltrira pomoću MILLEX-GV 0,22 um Filterske Jedinice, te se odredi koncentracija pomoću apsorpcije na 280 nm.

Primjer 3b: pročišćavanje Val⁸-GLP-1-HSA ili Val⁸-GLP-1-vezni peptid-HSA

Otprilike 6,5 litara prilagođenog medija (razina ekspresije fuzijskih proteina otprilike 10 μg/ml) profiltrira se pomoću CUNO filterskog sustava, te se ukoncentrira do 380 ml pomoću ProFlux sustava dodirne protočne filtracije s 10 K filterskom membranom.

Fuzijski se protein uhvati pomoću 50 ml Fast Flow Q kolone (Pharmacia) u 20 mM Tris pH 7,4 uz brzinu protoka od 5 ml/min. Protein se eluira pomoću gradijenta: od 0% do 50% 20 mM Tris-a pH 7,4, 1M NaCl u 10 CV, zatim do 100% B u 2 CV.

Frakcije koje sadrže fuzijske proteine skupljaju se zajedno, te se podvrgavaju C4 Kromatografiji obrnute faze u 0,1% TFA vodi, uz brzinu protoka od 5 ml/min. Fuzijski protein se eluira pomoću gradijenta od 20% B (0,1% TFA u acetonitrilu) do 90% B za 120 min. Frakcije (3 ml/epruveta) se skupljaju. Acetonitril se uklanja pomoću sušenja uz podtlak.

Otprilike 9 ml uzorka spojenih frakcija se razrijedi s 1× PBS-om pH 7,4 do 40 ml, te se dijalizira nasuprot 4 litre 1× PBS-a pH 7,4, preko noći. Uzorak se profiltrira, te se odredi koncentracija pomoću apsorpcije na 280 nm.

5 **Primjer 3c: pročišćavanje Eksendina-4-Fc**

Otprilike 4 litre prilagođenog medija (razina ekspresije fuzijskih proteina otprilike 8 µg/ml) profiltrira se pomoću CUNO filterskog sustava, te se ukoncentrira do 250 ml pomoću ProFlux sustava dodirne protočne filtracije s 30 K filterskom membranom.

- 10 Eksendin-4-Fc se uhvati pomoću 5 ml HiTrap protein A kolone u 1× PBS, pH 7,4 uz brzinu protoka od 2 ml/min, te se eluira s 50 mM limunskom kiselinom pH 3,3. Frakcije koje sadrže fuzijski protein skupljaju se zajedno, filtriraju, te dijaliziraju nasuprot 4 litre 1× PBS-a, preko noći. Dijalizirani uzorak se tada nanosi na Superdex 75 60/60 kolonu u 1× PBS pH 7,4, 0,5 M NaCl, uz brzinu protoka od 10 ml/min. Frakcije (20 ml/epruveta) koje sadrže fuzijski protein se skupljaju, spajaju, te ukoncentriravaju do oko 1 mg/ml. Ukoncentrirani uzorci tada se profiltriraju pomoću MILLEX-GV 0,22 µm Filterske Jedinice.

Primjer 3d: pročišćavanje Eksendin-4-HSA i Eksendin-4-vezni peptid-HSA:

- 20 Otprilike 1,1 litra prilagođenog medija (razina ekspresije fuzijskih proteina otprilike 6 µg/ml) profiltrira se pomoću CUNO filterskog sustava, te se ukoncentrira do 175 ml pomoću ProFlux sustava dodirne protočne filtracije s 30 K filterskom membranom.

Fuzijski se protein uhvati pomoću 5 ml HiTrap Q-sefaroza kolone (Pharmacia) u 20 mM Tris pH 7,4 uz brzinu protoka od 2 ml/min. Protein se eluira pomoću gradijenta od 0% do 50% 20 mM Tris-a pH 7,4, 1M NaCl u 12 CV, a zatim do 100% B u 4 CV.

- 25 Frakcije koje sadrže fuzijski protein skupljaju se zajedno, te se podvrgavaju C4 Kromatografiji obrnute faze u 0,1% TFA vodi, uz brzinu protoka od 5 ml/min. Fuzijski protein se eluira pomoću gradijenta od 10% B (0,1% TFA u acetonitrilu) do 100% B za 70 min. Skupljaju se frakcije (10 ml/epruveta) koje sadrže fuzijski protein. Acetonitril se uklanja pomoću sušenja uz podtlak.

- 30 Otprilike 8 ml uzorka spojenih frakcija se dijalizira nasuprot 4 litre 1× PBS-a pH 7,4, preko noći. Uzorak se profiltrira, te se odredi koncentracija pomoću apsorpcije na 280 nm. Dijalizirani se uzorak tada nanosi na Superdex 200 26/60 kolonu u 1× PBS pH 7,4, 0,5 M NaCl, uz brzinu protoka od 2 ml/min. Frakcije (3 ml/epruveta) koje sadrže fuzijski protein se skupljaju, spajaju, ukoncentriravaju, te filtriraju.

- 35 **Primjer 4:**
Karakterizacija fuzijskih proteina pomoću SDS-PAGE:

- 40 SDS-PAGE, nakog čega slijedi imunoblot, rabi se za analizu pročišćenih fuzijskih proteina, kao i prilagođenog medija iz stanica koje su transfektirane s raznim ekspresijskim vektorima za fuzijske proteine. SDS-PAGE se izvodi na Novex Powerease 500 sustavu uz uporabu Novex 16% Tris-Glicin *Precast* gelova (EC6498), pufera za odvijanje postupka (10×, LC2675), te pufera za uzorke (L2676). Uzorci se reduciraju s 50 mM DTT-om, te se zagrijavaju 3-5 minuta na 95°C prije nanošenja.

- 45 Nakon provođenja postupka na SDS-PAGE gelu, rabe se voda i transportni pufer (1× Tris-Glicin Seprabuff (Owl Scientific kat. br. ER26-S) s 20% metanola) za ispiranje SDS-a s gelova. Novex uređaj za prijenos rabi se uz PVDF (BioRad, kat. br. 162-0174) i nitrocelulozne membrane (BioRad, kat. br. 1703965 ili 1703932). Prijenos se provodi na sobnoj temperaturi tijekom 90 minuta na 30-35 V. Membrane se blokiraju u 1× PBS-u s 0,1% Tween-20 (Sigma, kat. br. P-7949), te 5% mlijeka (Biorad, kat.br. 170-6404) tijekom 1-12 sati na 4°C. Antitijela se razrjeđuju u 1× PBS-u + 5% mlijeka, te se blotovi inkubiraju u tim otopinama tijekom 1-2 sata na 4°C. Između inkubacija, blotovi se ispiru četiri puta u trajanju 5 minuta, svaki s 1× PBS-om i 0,2% Tween-20 na sobnoj temperaturi. PBS je načinjen bilo iz GIBCO 10× PBS-a (kat. br. 70011), kako bi se dobio konačni sastav 1 mM monobazičnog kalijeveg fosfata, 3 mM dibazičnog natrijeveg fosfata, 153 mM natrijeveg klorida, pH 7,4, ili iz vrećica PBS-a od Sigme (kat. br. 1000-3), kako bi se dobio 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, te 10 mM fosfat, pH 7,4 pri 25°C.

- 55 Primarna antitijela bila su bilo poliklonalni kozji anti-IgG1 ili zečji anti-HSA. Sekundarno antitijelo bilo je bilo anti-kozji IgG HRP ili anti-zečji IgG HRP. Sekundarno se antitijelo razrijedi 1:5000. ECL sustav (Amersham Pharmacia Biotech, kat. br. RN2108 i kat. br. RPN1674H) rabi se za razvijanje blotova.

Slika 3A uspoređuje pročišćeni Fc protein s prilagođenim medijem iz stanica koje su transfektirane s pJB02-Val⁸-GLP-1-Fc i pJB02-Eksendin-4-Fc. Pad pokretljivosti je spojiv s povećanom veličinom uslijed GLP-1 dijela fuzijskog proteina. Slika 3B slično uspoređuje pročišćeni HSA s prilagođenim medijem iz stanica koje su transfektirane s pJB02-Val⁸-GLP-1-HSA, pJB02-Val⁸-GLP-1-vezni peptid-HSA, pJB02-Eksendin-4-HSA, ili pJB02-Eksendin-4-vezni peptid-HSA. Slika 4 identificira pročišćene pripravke fuzijskih proteina.

Primjer 5:

Karakterizacija fuzijskih proteina pomoću masene spektrometrije:

Svi pokusi su izvedeni na Micromass ToFSpec-2E masenom spektrometru opremljenom s Time Lag Focusing elektronikom, reflektrom (koji se rabi u analizi raspona peptida od 0-8000 Da), linearnim detektorom (koji se rabi tijekom analize velike mase/dobrog signala), te postakceleracijskim detektorom (ili P.A.D., koji se rabi za analize velike mase/izrazito niskog signala). Učinkovita duljina puta za instrument u linearnom modu je 1,2 metra, a u reflektromskom modu iznosi 2,3 metra. Dvije dvostruke mikrokanalne detektorske ploče postavljene su za linearni i reflektromski mod detekcije. Rabljeni laser je Laser Science Inc. VSL-337i dušični laser koji radi na 337 nm, uz 5 laserskih hitaca po sekundi. Svi su podaci dobiveni uz uporabu 2 GHz, 8 bitni unutrašnji *digitizer*, te je po spektru prosječno bilo potrebno najviše do 50 laserskih hitaca.

Uređaj je radio u linearnom modu za analize GLP-1 fuzijskih proteina o kojima je riječ. Linearni detektor je uređaj koji detektira ione koji putuju niz prolaznu cijev MALDI-ToF-MS uređaja. Mjeri količinu iona kroz vrijeme, te šalje signal u *digitizer* na pretvorbu. *Digitizer* pretvara analogni u digitalni signal, te omogućava prijenos signala iz masenog spektrometra u kompjuter, gdje se ponovno konstruira uporabljivi m/z spektar.

Prekristalizirana zasićena otopina sinapinske kiseline (razrijeđena u 50/50 Acn/H₂O te 0,1% TFA) primjenjena je kao ionizacijski matriks. Sinapinska kiselina je prikladan matriks za proteine iznad 10 kDa. Referentni proteini prikladni po masi rabljeni su za unutrašnju i vanjsku kalibraciju radi dobivanja točnih određivanja mase za analizirane uzorke. Svi uzorci su analizirani pomoću 1:2 razrijeđenja uzorka prema matriksu. Uređaj je početno postavljen pod sljedeće uvjete linearnog detektora:

Napon izvora: 20,0 keV	Napon impulsa: 3,0 keV
Napon ekstrakcije: 20,0 keV	Neuglađenost lasera: 50
Napon fokusiranja: 16,0 keV	Uglađenost lasera: 50
Linearni detektor: 3,7 keV	
P.A.D.: (isključen)	

Ove postavke se izmjenjuju (po potrebi) radi dobivanja najboljeg omjera signal/šum, te najveće rezolucije. Tabela 3 donosi karakterizaciju različitih GLP-1 fuzijskih proteina.

Tabela 3

Fuzijski protein	Očekivana masa (kDa)	Masa određena pomoću Mass Spec-a (kDa)
Val ⁸ -GLP-1-IgG1	59,08	61,94
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-IgG1	59,23	63,61
Gly ⁸ -GLP-1-IgG1	59,00	62,93
Val ⁸ -GLP-1-CEX-IgG1	60,45	65,1-65,6
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-IgG1	60,69	65,86
Eksendin-4-IgG1	60,69	65,86
Val ⁸ -GLP-1-vezni peptid-HSA	70,70	69,89, 70,74
Eksendin-4-HSA	70,56	70,62
Eksendin-4-vezni peptid-HSA	71,56	71,62

CEX se odnosi na C-terminalno produženje, te sadrži sekvencu Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser. Vezni peptid je Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser.

Primjer 6:**Aktivnost heterolognih fuzijskih proteina:**

Sposobnost fuzijskih proteina ovoga izuma da aktiviraju GLP-1 receptor procijenjena je pomoću *in vitro* analiza poput onih opisanih u EP 619,322 autora Gelfanda, i sur., odnosno U.S. Patentu br. 5,120,712. Aktivnost tih spojeva u odnosu na aktivnost Val⁸-GLP-1 (7-37)OH predočena je u Tabeli 4. Slika 8 predstavlja krivulje *in vitro* odnosa doze i odgovora za Val⁸-GLP-1 i Eksendin-4 fuzijske proteine. Osim toga, Tabele 5a i 5b donose *in vitro* aktivnost velike skupine GLP-1 analoga koji se mogu spojiti na Fc ili na albuminski protein kako bi nastali biološki aktivni fuzijski proteini. Te su aktivnosti usporedene s GLP-1 (7-37)OH.

Tabela 4: *In vitro* aktivnost GLP-1 fuzijskih proteina

Fuzijski protein	<i>In vitro</i> aktivnost (% Val ⁸ -GLP-1)
Val ⁸ -GLP-1-IgG1	1
Eksendin-4-IgG1	240
Val ⁸ -GLP-1-vezni peptid-HSA	0,2
Eksendin-4-HSA	20
Eksendin-4-vezni peptid-HSA	90
Eksendin-4	500
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-IgG1	3,7
Gly ⁸ -GLP-1-IgG1	3,3
Val ⁸ -GLP-1-CEX-IgG1	3,3
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-IgG1	29
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-C2-IgG1	75
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1	150
Eksendin-4-C2-IgG1	250
Eksendin-4-vezni peptid-IgG1	330
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-vezni peptid-HSA	4
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG4	80

CEX se odnosi na C-terminalno produženje, te sadrži sekvencu Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser.

Vezni peptid je Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser.

C2 je Ser-Ser-Gly-Ala-Ser-Ser-Gly-Ala.

Aminokiselinске sekvence fuzijskih proteina opisanih u Tabelama 3 i 4 predstavljene su u SEQ ID NO: 13 do SEQ ID NO: 31.

Aminokiselinska sekvenca Val⁸-GLP-1-humani serumski albumin predstavljena je u SEQ ID NO: 13.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR GDAHKSEVAH RFKDLGEENF KALVLIAFAQ
61 YLQQCPFEDH VKLVNEVTEF AKTCVADESA ENCDKSLHTL FGDKLCTVAT LRETYGEMAD
121 CCAKQEPERN ECFLQHKDDN PNLPRLVPRPE VDMCTAFHD NEETFLKKYL YEIARRHPYF
181 YAPELLFFAK RYKAAFTECC QAADKAACLL PKLDELREDEG KASSAKQRLK CASLQKFGER
241 AFKAWAVARL SQRFPKAEFA EVSKLVTDLT KVHTECCHGD LLECADDRAD LAKYICENQD
301 SISKLEKECC EKPLLEKSHC IAEVENDEMP ADLPSLAADF VESKDVCCKNY AEAKDVFLGM
361 FLYEYARRHP DYSVVLLRL AKTYETTLK CCAAADPHEC YAKVFDEFKP LVEEPQNLTK
421 QNCELFEQLG EYKFQNALLV RYTKKVPQVS TPTLVEVSRN LGKVGSKCKK HPEAKRMPCA
481 EDYLSVVLNQ LCVLHEKTPV SDRVTCKCTE SLVNRPCFS ALEVDETYVP KEFNAETFTF
541 HADICTLSEK ERQIKQTAL VELVKHKPKA TKEQLKAVMD DFAAFVEKCC KADDKETCFA
601 EEGKKLVAAS QAALGL [SEQ ID NO: 13]

```


Aminokiselinska sekvenca Val⁸-GLP-1-vezni peptid-humani serumski albumin predstavljena je u SEQ ID NO: 14.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EPIAWLVKGR GGGGSGGGG SGGGSDAHK SEVAHRFKDL
61 GEENFKALVL IAFAYLQQC PFEDHVKLVN EVTEFAKTCV ADESAENCDK SLHTLFGDKL
121 CTVATLRETY GEMADCCAKQ EPERNECFLO HKDDNPNLPR LVRPEVDVMC TAFHDNEETF
181 LKKYLYEIAR RHPYFYAPEL LFFAKRYKAA FTECCQAADK AACLLPKLDE LRDEGKASSA
241 KQRLKASLQ KFGERAFAKAW AVARLSQRFK KAEFAEVSKL VTDLTQVHTE CCHGDLLECA
301 DDRADLAKYI CENQDSISSK LKECCEKPLL EKSHCIAEVE NDEMPADLPS LAADFVESKD
361 VCKNYAEAKD VFLGMFLYFY ARRHPDYSV LLLRLAKTYE TTLEKCCAAA DPHECYAKVF
421 DEFKPLVEEP QNLIKQNCLE FEQLGEYKFQ NALLVRYTKK VPQVSTPTLV EVSRNLGKVG
481 SKCKHPEAK RMPCAEDYLS VVLNQLCVLH EKTVPVSDRVT KCCTESLVNR RPCFSALEVD
541 ETVVPKEFNA ETFTFHADIC TLSEKERQIK QQTALVELVK HKPKATKEQL KAVMDDFAAF
601 VEKCKKADDK ETCFAEEGKK LVAASQAALG L [SEQ ID NO: 14]

```

- 5 Aminokiselinska sekvenca Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEx-vezni peptid-humani serumski albumin predstavljena je u SEQ ID NO: 15.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EPIAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGGSGGGGS GGGSDAHKS
61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVE VTEFAKTCVA DESAENCDKS
121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLOH KDDNPNLPRL VRPEVDVMCT
181 AFHDNEETFL KKYLYEIARR HPYFYAPPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACLLPKLDEL
241 RDEGKASSAK QRLKASLQK FGERAFKAWA VARLSQRFK AEFAEVSKLV TDLTKVHTEC
301 CHGDLLECAD DRADLAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN DEMPADLPSL
361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYFYA RRHPDYSVVL LLRLAKTYET TLEKCCAAAD
421 PHECYAKVFD EFKPLVEEPQ NLIKQNCLEF EQLGEYKFQN ALLVRYTKKV PQVSTPTLVE
481 VSRNLGKVGK KCKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTPVSDRVTK CCTESLVNRR
541 PCFSALEVDE TYVPKEFNAE TFTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK
601 AVMDDFAAFV EKCKKADDKE TCFAEEGKKL VAASQAALGL [SEQ ID NO: 15]

```

- 10 Aminokiselinska sekvenca Eksendin-4-humani serumski albumin predstavljena je u SEQ ID NO: 16.

```

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIWLNKNGG PSSGAPPPSD AHKSEVAHRF KDLGEENFKA
61 LVLI AFAQYL QQCPFEDHVK LVNEVTEFAK TCVADESAEN CDKSLHTLFG DKLCTVATLR
121 ETY GEMADCC AKQEPERNEC FLQHKDDNPN LPRLVRPEVD VMCTAFHDNE ETFLKKYLYE
181 IARRHPYFYA PELLFFAKRY KAAFTCECQA ADKAACLLPK LDEL RDEGKA SSAKQRLKCA
241 SLQKFGERAF KAWAVARLSQ RFPKAEFAEV SKLVTDLTQV HTECCHGDL ECADDRADLA
301 KYICENQDSI SSKLKECCEK PLLEKSHCIA EVENDEMPAD LPSLAADFVE SKDVCKNYAE
361 AKDVFLGMFL YEYARRHPDY SVVLLLRLAK TYETTLEKCC AAADPHECYA KVFDEFKPLV
421 EEPQNLIKQN CELFEQLGEY KFQNALLVRY TKKVPQVSTP TLVEVSRNLG KVGSKCKHP
481 EAKRMPCAE YLSVVLNQLC VLHEKTPVSD RVTKCCTESL VNRRPCFSAL EVDETYVPKE
541 FNAETFTFHA DICTLSEKER QIKKQTALVE LVKHKPKATK EQLKAVMDDF AAFVEKCKKA
601 DDKETCFEE GKKLVAAASA ALGL [SEQ ID NO: 16]

```

Aminokiselinska sekvenca Eksendin-4-vezni peptid-humani serumski albumin predstavljena je u SEQ ID NO: 17.

```

1 HEGTFTSDL SKQMBEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPSG GGGSGGGGS GGGSDAHKS
61 EVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQOCP FEDHVKLVNE VTEFAKTCVA DESAENCDSK
121 LHTLFGDKLC TVATLRETYG EMADCCAKQE PERNECFLQH KDDNPNLPRL VRPEVDVMCT
181 AFHDNEETFL KKLYEYIARR HPYFYAPELL FFAKRYKAAF TECCQAADKA ACLLPKLDEL
241 RDEGKASSAK QRLKCASLQK FGERAFKAWA VARLSQRFPK AEFAEVSKLV TDLTKVHTEC
301 CHGDLLECAD DRADIAKYIC ENQDSISSKL KECCEKPLLE KSHCIAEVEN DEMPADLPSL
361 AADFVESKDV CKNYAEAKDV FLGMFLYEYA RRHPDYSVVL LLRLAKTYET TLEKCCAAAD
421 PHECYAKVFD EPKPLVEEPQ NLIKQNCLEF EQLGEYKFQN ALLVRYTKKV PQVSTPTLVE

481 VSRNLGKVG S KCKHPEAKR MPCAEDYLSV VLNQLCVLHE KTFVSDRVTK CCTESLVNRR
541 PCFSALEVDE TYVPKEFNAB TPTFHADICT LSEKERQIKK QTALVELVKH KPKATKEQLK
601 AVMDDFAAAF EKCKADDKE TCFAEEGKKL VAASQAALGL [SEQ ID NO: 17]

```

Aminokiselinska sekvenca Val⁸-GLP-1-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 18.

5

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR GAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF
61 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
121 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV
181 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
241 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK [SEQ ID NO: 18]

```

Aminokiselinska sekvenca Val⁸-GLP-1-CEX-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 19.

10

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 19]

```

Aminokiselinska sekvenca Val⁸-Glu²²-GLP-1-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 20.

15

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 20]

```

Aminokiselinska sekvenca Val⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 21.

```

1 HVEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 21]

```

20 Aminokiselinska sekvenca Gly⁸-Glu²²-GLP-1-C2-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 22.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGASSGAA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 22]

```

Aminokislinska sekvencija Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 23.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGSG GGGSAEPKSC
61 DKHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
181 QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK [SEQ ID NO: 23]

```

5

Aminokislinska sekvencija Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG4 predstavljena je u SEQ ID NO: 24.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGSG GGGSAESKYG
61 PPCPSCAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSDPEV QFNWYVDGVE
121 VNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNKKEYCKV SNKGLPSSIE KTISKAKQF
181 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS
241 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK [SEQ ID NO: 24]

```

10

Aminokislinska sekvencija Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-2 vezni peptid-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 25.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGSG GGGSGGGSG
61 GGGSGGGGSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
121 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN
181 KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
241 QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP
301 GK [SEQ ID NO: 25]

```

15 Aminokislinska sekvencija Gly⁸-Glu²²-GLP-1-2 vezni peptid-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 26.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GGGGSGGGG SGGGSGGGG SGGGSGGGG
61 SAEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
121 KFNWYVDGVE VNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNKKEYCKV SNKALPAPIE
181 KTISKAKQF REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
241 TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
[SEQ ID NO: 26]

```

Aminokislinska sekvencija Gly⁸-Glu²²-GLP-1-2CEX-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 27.

20

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAAK EFLAWLVKGR GSSGAPPPSS SGAPPPSAEP KSCDKTHTCP
61 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
121 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
181 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY
241 SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK [SEQ ID NO: 27]

```

Aminokiselinska sekvenca Gly⁸-Glu²²-Val²⁵-Ile³³-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 28.

```

1 HEGTFTSDV SSYLEEQAVK EFLAWLIKGR GSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGSSEAPKSC
61 DKHTCPCPP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK [SEQ ID NO: 28]

```

5

Aminokiselinska sekvenca Eksendin-4-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 29.

```

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPPSA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 29]

```

10 Aminokiselinska sekvenca Eksendin-4-C2-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 30.

```

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGASSGAA EPKSCDKTHT CPPCPAPELL
61 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
121 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR
181 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
241 RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTKSLSLSP GK [SEQ ID NO: 30]

```

Aminokiselinska sekvenca Eksendin-4-vezni peptid-IgG1 predstavljena je u SEQ ID NO: 31.

15

```

1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPPSG GGGSGGGGSG GGSSEAPKSC
61 DKHTCPCPP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
121 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
181 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
241 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK [SEQ ID NO: 31]

```

Tabela 5a: *In vitro* aktivnost analoga GLP-1

20

GLP-1 spoji

Aktivacija receptora za GLP-1

GLP-1 (7-37) OH	1.0
Val ⁸ -GLP-1 (7-37) OH	0.47 (n = 6)
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1 (7-37) OH	0.282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1 (7-37) OH	0.021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1 (7-37) OH	0.001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1 (7-37) OH	0.81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0.047

Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.175
Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.33
Gln ²² -GLP-1(7-37)OH	0.42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37)OH	0.56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37)OH	0.50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37)OH	0.40
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH	0.58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37)OH	0.01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37)OH	0.14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	0.53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	1.0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	1.07
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	0.18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.007

Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.02
Val ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.6
Val ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	1.5
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.1
Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1(7-37)OH	0.01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.15

Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1(7-37)OH	0.33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	0.23
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	0.37
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1(7-37)OH	0.35
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	1.02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	1.43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.08
Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	0.09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	0.34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1(7-37)NH ₂	0.53

Tabela 5b. *In vitro* aktivnost analoga GLP-1

GLP-1 Spoj	Aktivacija receptora za GLP-1
GLP-1 (7-37) OH	1.0
Val ⁸ -GLP-1 (7-37) OH	0.47
Gly ⁸ -GLP-1 (7-37) OH	0.80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1 (7-37) OH	0.80
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1 (7-36) NH ₂	0.52
Val ⁸ -Trp ¹² -GLP-1 (7-37) OH	0.52
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0.52
Val ⁸ -Val ¹⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0.52
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1 (7-37) OH	1.18
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.03
Val ⁸ -Leu ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	0.24
Val ⁸ -Tyr ¹² -Tyr ¹⁶ -GLP-1 (7-37) OH	0.70
Val ⁸ -Trp ¹² -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	0.80
Val ⁸ -Tyr ¹² -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.27
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Phe ¹⁹ -GLP-1 (7-37) OH	1.32
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.69, 1.79
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	2.30, 2.16
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	2.02
Val ⁸ -Ile ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.55
Val ⁸ -Phe ¹⁶ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.08
Val ⁸ -Trp ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.50, 3.10
Val ⁸ -Tyr ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	2.40, 2.77
Val ⁸ -Phe ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	0.94
Val ⁸ -Ile ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.88
Val ⁸ -Lys ¹⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.18
Val ⁸ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.50
Val ⁸ -Phe ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	0.70
Val ⁸ -Phe ²⁰ -Glu ²² -GLP-1 (7-37) OH	1.27

Val ⁸ -Glu ²² -Leu ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	1.32
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	1.46
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1 (7-37) OH	2.21, 1.36
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ²⁷ -GLP-1 (7-37) OH	0.94
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37) OH	1.03
Val ⁸ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1 (7-37) OH	2.21, 1.79, 1.60
Val ⁸ -Asp ⁹ -Ile ¹¹ -Tyr ¹⁶ -Glu ²² - GLP-1 (7-37) OH	2.02
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -Trp ¹⁹ -Glu ²² -GLP-1 (7- 37) OH	1.64
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ - GLP-1 (7-37) OH	2.35
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Ile ³³ -GLP-1 (7- 37) OH	1.93
Val ⁸ -Glu ²² -Val ²⁵ -Ile ³³ -GLP-1 (7- 37) OH	2.30, 2.73, 3.15
Val ⁸ -Trp ¹⁶ -Glu ²² -Val ²⁵ -GLP-1 (7- 37) OH	2.07
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -GLP-1 (7-37) OH	1.97
Val ⁸ -Cys ¹⁶ -Lys ²⁶ -Arg ³⁴ -GLP-1 (7- 37) OH	2.4, 1.9

Tabela 6: *In vitro* aktivnost analoga GLP/Eksendina

Peptidna sekvenca	<i>In vitro</i> aktivnost (% Val ⁸ -GLP- 1 (7-37) OH)
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGP-NH2	6.21
HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPP PS-NH2	6.75, 3.25
HVEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIAWLVKGRG	2.86
HVEGTFTSDVSSYLEEEEAVRLFIAWLVKGRG	1.47
HVEGTFTSDLSKQMEGQAAKEFIAWLVKGRG	0.11

HVEGTFTSDVSKQMEGQAAKEFIAWLVKGRG	0.04
HGEGTFTSDLKQMEGQAAKEFIEWLKNNGP-NH2	1.44
HGEGTFTSDLKQMEEEAAKEFIEWLKNNGP-NH2	2.80
HGEGTFTSDVSSYLEEEAVRLFIEWLKNNGP-NH2	5.40
HGEGTFTSDLSSYLEEEAVRLFIEWLKNNGP-NH2	5.07
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRPSSGAPPPS-NH2	3.30
HAEGTFTSDVSKQLEEEAAKEFIAWLVKGRG	2.15
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLKNNGP-NH2	2.36
HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIAWLVKGRG	3.25
HVEGTFTSDVSSYLEEEAAKEFIAWLVKGRG	1.00
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKNRG	0.20
HVEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	1.00
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	2.12

Primjer 7:*In vivo* farmakokinetika Val⁸-GLP-1-IgG1 i Val⁸-GLP-1-HSA:

Farmakokinetičko istraživanje Val⁸-GLP-1-IgG1 i Val⁸-GLP-1-HSA provedeno je na *cynomologus* majmunima. Majmuni su primili dozu od 5,6 nmol/kg bilo pročišćenog Val⁸-GLP-1-IgG1 ili Val⁸-GLP-1-HSA. Spojevi su primjenjeni u obliku davanja intravenske injekcije. Krv je prikupljena prije davanja doze, te 0,083, 0,25, 0,5, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, te 216 sati nakon primjene doze u epruvete koje sadrže EDTA. Plazmatske koncentracije imunoreaktivnog Val⁸-GLP-1 određene su pomoću radioimuno analize koja rabi poliklonalni antiserum čija je primarna specifičnost usmjerena prema N-terminalnom (7-16) području Val⁸-GLP-1 (7-37). Slika 9 prikazuje plazmatsku koncentraciju Val⁸-GLP-1-Fc i Val⁸-GLP-1-vezni peptid-HSA nakon samo jedne intravenske doze kod dva *cynomologus* majmuna. Fc fuzijski protein imao je poluživot otprilike 45 sati, a albuminski fuzijski protein imao je poluživot otprilike 87 sati.

Primjer 8:*In vivo* farmakodinamika Eksendina-4-IgG1:

Dva trajno kanulirana normalna muška psa zečara izučavana su nakon gladovanja preko noći. Osiguran je pristup arterijskim i venskim pristupnim otvorima, te je kateter umetnut perkutano u cefaličku venu i osiguran. Životinje su stavljene u kaveze, te su njihovi kateteri pričvršćeni na nepropusni sustav katetera koji se sastoji od dva dijela, pri čemu je jedan pomičan u odnosu na drugi. Otopina koja sadrži fuzijski protein Eksendin-4-IgG1 (11,8 µM) ubrizgana je intravenski (1,0 nmol/kg) kroz kateter u cefaličkoj veni. Kateter je zatim ispran s 10 ml soli. Dva sata kasnije, započeto je davanje hiperglikemičke (150 mg/dl) infuzije, što je nastavljeno tijekom tri sata. Uzorci arterijske krvi su vadeni tijekom tog 5-satnog razdoblja za određivanje plazmatskih koncentracija fuzijskog proteina, glukoze i inzulina.

Rezultati tog istraživanja uspoređeni su s rezultatima iz sličnih, prethodnih istraživanja u kojima su obje životinje primile intravensku injekciju soli, s.c., te su tri sata kasnije izučavani uz uporabu 3-satne hiperglikemičke (150 mg/dl) infuzije.

U obje skupine istraživanja, plazmatske koncentracije glukoze su određene pomoću Beckmanovog analizatora za glukozu. Plazmatske koncentracije inzulina odredili su zaposlenici tvrtke Linco Research, Inc. pomoću RIA kompleta koji je razvijen u njihovim laboratorijima. Podaci su slikovito prikazani na Slikama 10 i 11.

Primjer 9:***In vivo* farmakokinetika Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1:**

5 Dvije skupine po tri normalna muška psa zečara primile su 0,1 mg/kg Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 subkutanom (SC) ili intravenskom (IV) primjenom. Plazmatske koncentracije Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 imunoreaktivnosti određene su radioimuno analizom u uzorcima koji su prikupljeni počevši s 30 minuta prije doze do 216 sati nakon doze i za IV i za SC skupinu. Te koncentracije zatim su rabljene za određivanje prijavljenih farmakokinetičkih parametara. Prosječni poluživot uklanjanja IV primjenjenog Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 iznosio je otprilike 55 sati, a ukupno izlučivanje iz tijela bilo je 1,5 mL/h/kg. Prosječni poluživot uklanjanja SC primjenjenog Gly⁸-Glu²²-GLP-1-CEX-vezni peptid-IgG1 iznosio je otprilike 38 sati.

PATENTNI ZAHTEJEVI

- 15 1. Heterologni fuzijski protein, **naznačen time** da sadrži prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se izabire iz skupine koja se sastoji od:
- 20 a) humanog albumina;
b) analoga humanog albumina; te
c) odsječaka humanog albumina,
te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida.
2. Heterologni fuzijski protein, **naznačen time** da sadrži prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se izabire iz skupine koja se sastoji od:
- 25 a) humanog albumina;
b) analoga humanog albumina; te
c) odsječaka humanog albumina,
te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida putem veznog peptida.
3. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 2, **naznačen time** da se vezni peptid izabire iz skupine koja se sastoji od:
- 30 a) peptida bogatog glicinom;
b) peptida koji ima sekvencu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n pri čemu je n 1, 2, 3, 4, 5 ili 6; te
c) peptida koji ima sekvencu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.
4. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevima 1, 2 ili 3, **naznačen time** da GLP-1 spoj sadrži sekvencu prikazanu formulom I [SEQ ID NO: 2]:
- 35

7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
His	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Phe	Thr	Xaa	Asp	Xaa	Xaa
18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
40	41	42	43	44	45					
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa					

Formula I (SEQ ID NO: 2)

pri čemu:

- Xaa na položaju 8 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
- 40 Xaa na položaju 9 je Glu, Asp, ili Lys;
- Xaa na položaju 11 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
- Xaa na položaju 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
- Xaa na položaju 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, ili Lys;
- Xaa na položaju 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
- 45 Xaa na položaju 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr, ili Lys;
- Xaa na položaju 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, ili Lys;

Xaa na položaju 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr, ili Lys;

Xaa na položaju 21 je Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, ili Lys;

5 Xaa na položaju 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, ili His;

Xaa na položaju 27 je Leu, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

10 Xaa na položaju 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, ili Lys;

Xaa na položaju 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, ili His;

Xaa na položaju 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

15 Xaa na položaju 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His;

Xaa na položaju 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

Xaa na položaju 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;

Xaa na položaju 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;

Xaa na položaju 40 je Gly, Asp, Glu, ili Lys, ili je izbrisan;

20 Xaa na položaju 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

Xaa na položaju 42 je Ser, Pro, Lys, Glu, ili Asp, ili je izbrisan;

Xaa na položaju 43 je Ser, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

Xaa na položaju 44 je Gly, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan; te

Xaa na položaju 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

25

uz uvjet da se pri brisanju aminokiseline na položaju 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, ili 44, svaka aminokiselina nizvodno od te aminokiseline također izbriše.

5. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 4, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 6 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.

30 6. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 5, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 5 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.

7. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 6, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 4 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.

8. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 7, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 3 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.

35 9. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 8, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 2 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiseline u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.

10. Heterologni fuzijski protein, **naznačen time** da sadrži prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se

40 izabire iz skupine koja se sastoji od:

a) Fc dijela imunoglobulina;

b) analoga Fc dijela imunoglobulina; te

c) odsječaka Fc dijela imunoglobulina,

te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida.

45 11. Heterologni fuzijski protein, **naznačen time** da sadrži prvi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom spojen na drugi polipeptid s N-završetkom i C-završetkom, pri čemu je prvi polipeptid GLP-1 spoj, a drugi polipeptid se izabire iz skupine koja se sastoji od:

a) Fc dijela imunoglobulina;

b) analoga Fc dijela imunoglobulina; te

50 c) odsječaka Fc dijela imunoglobulina,

te gdje je C-završetak prvog polipeptida spojen na N-završetak drugog polipeptida putem veznog peptida.

12. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 11, **naznačen time** da se vezni peptid izabire iz skupine koja se sastoji od:

a) peptida bogatog glicinom;

55 b) peptida koji ima sekvencu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n pri čemu je n 1, 2, 3, 4, 5 ili 6; te

c) peptida koji ima sekvencu [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₃.

13. Heterologni fuzijski protein prema bilo kojem od Zahtjeva 10, 11 ili 12, **naznačen time** da GLP-1 spoj sadrži sekvencu prikazanu formulom 1 [SEQ ID NO: 2]:

```

7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Phe-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-
18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe-
29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39
Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-
40  41  42  43  44  45
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

```

Formula I (SEQ ID NO: 2)

pri čemu:

- Xaa na položaju 8 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 9 je Glu, Asp, ili Lys;
5 Xaa na položaju 11 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 14 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 16 je Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, ili Lys;
Xaa na položaju 17 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 18 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr, ili Lys;
10 Xaa na položaju 19 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, ili Lys;
Xaa na položaju 20 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr, ili Lys;
Xaa na položaju 21 je Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 22 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 23 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, ili Lys;
15 Xaa na položaju 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 25 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 26 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, ili His;
Xaa na položaju 27 je Leu, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 30 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
20 Xaa na položaju 31 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 32 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 33 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, ili Lys;
Xaa na položaju 34 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, ili His;
Xaa na položaju 35 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;
25 Xaa na položaju 36 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His;
Xaa na položaju 37 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
Xaa na položaju 38 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;
Xaa na položaju 39 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;
Xaa na položaju 40 je Gly, Asp, Glu, ili Lys, ili je izbrisan;
30 Xaa na položaju 41 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
Xaa na položaju 42 je Ser, Pro, Lys, Glu, ili Asp, ili je izbrisan;
Xaa na položaju 43 je Ser, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
Xaa na položaju 44 je Gly, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan; te
Xaa na položaju 45 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;
35
- uz uvjet da se pri brisanju aminokiseline na položaju 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, ili 44, svaka aminokiselina nizvodno od te aminokiseline također izbriše.
14. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 13, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 6 aminokiselina koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.
40 15. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 14, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 5 aminokiselina koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.
16. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 15, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 4 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.
17. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 16, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 3 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.
45

18. Heterologni fuzijski protein prema Zahtjevu 17, **naznačen time** da GLP-1 spoj nema više od 2 aminokiseline koje se razlikuju od odgovarajućih aminokiselina u GLP-1 (7-37)OH, GLP-1 (7-36)OH ili Eksendinu-4.
19. Uporaba heterolognog fuzijskog proteina kako je zahtjevan u bilo kojem od Zahtjeva 1 do 18, **naznačena time** da je usmjerena prema proizvodnji lijeka za liječenje bolesnika koji boluju od diabetesa mellitusa koji nije ovisan o inzulinu.
20. Uporaba heterolognog fuzijskog proteina kako je zahtjevan u bilo kojem od Zahtjeva 1 do 18, **naznačena time** da je usmjerena prema proizvodnji lijeka za liječenje bolesnika koji boluju od pretilosti.

SAŽETAK

Ovaj se izum odnosi na skupinu 1 spojeva nalik glukagonu, koji su spojeni na proteine, a koji imaju učinak produljenja in vivo poluživota peptida. Ti fuzijski proteini mogu se rabiti za liječenje diabetesa mellitusa koji nije ovisan o inzulinu, kao i mnoštva drugih stanja.

Slika 1

1/17

Slika 1.

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

[SEQ ID NO: 32]

Slika 2

2/17

Slika 2.

5					10					15							
Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn
20						25					30					35	
Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe
			40				45						50				
Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val
55					60					65					70		
Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp
		75					80					85					90
Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys
				95				100						105			
Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp
110						115					120					125	
Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met	Cys	Thr	Ala
			130				135						140				
Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg
145				150						155					160		
Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys
		165				170						175					180
Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro
			185					190						195			
Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu
200						205					210					215	
Lys	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val
		220					225						230				
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu
235				240						245					250		
Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu	Glu
		255				260						265					270
Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp	Ser
			275					280						285			
Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	His
290						295					300					305	
Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala
		310						315					320				
Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp
325				330						335					340		
Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser
		345				350						355					360
Val	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Thr	Tyr	Glu	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys	Cys
			365					370						375			
Cys	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys	Tyr	Ala	Lys	Val	Phe	Asp	Glu	Phe	Lys
380						385					390					395	
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Gln	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu	Phe	Glu
		400					405						410				
Asn	Leu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Asn	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys
415					420					425					430		
Val	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys
		435					440					445					450
Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Lys	Arg	Met	Pro	Cys	Ala	Glu
			455					460					465				
Asp	Tyr	Leu	Ser	Val	Val	Leu	Asn	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	His	Glu	Lys	Thr	Pro
470						475					480					485	
Val	Ser	Asp	Arg	Val	Thr	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Ser	Leu	Val	Asn	Arg	Arg	Pro

Slika 2. Nastavak

3/17

Slika 2. Nastavak

			490					495					500						
Cys	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Val	Pro	Lys	Glu	Phe	Asn	Ala		
505					510					515					520				
Glu	Thr	Phe	Thr	Phe	His	Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Glu	Arg	Gln		
		525					530					535					540		
Ile	Lys	Lys	Gln	Thr	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr		
				545					550					555					
Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Ala	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Lys	Cys		
	560					565				570						575			
Cys	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Glu	Thr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Lys	Leu	Val		
			580				585												
Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu											

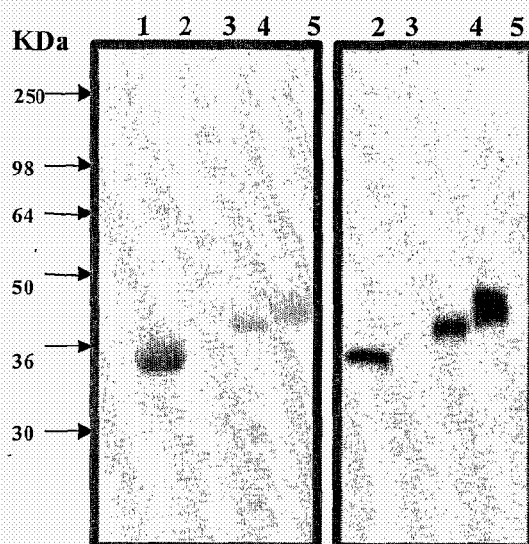
[SEQ ID NO: 34]

Slika 3

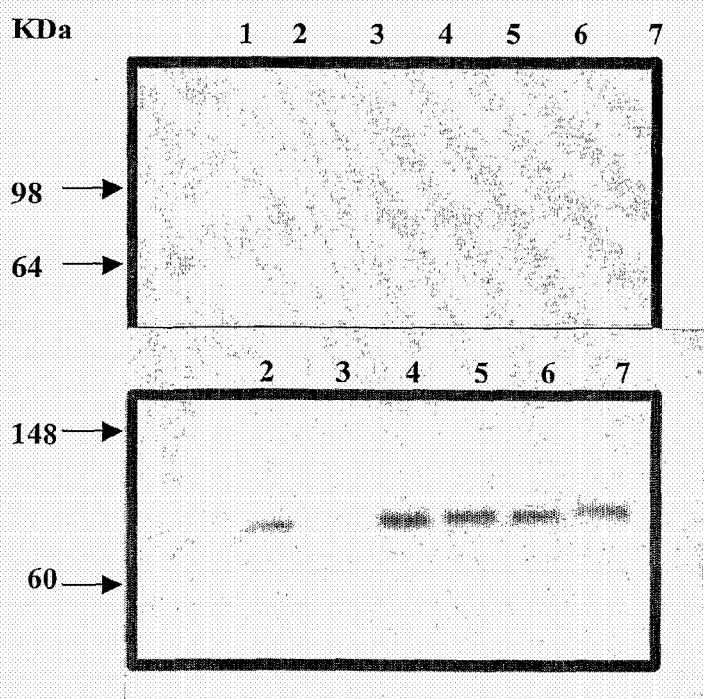
4/17

Slika 3.

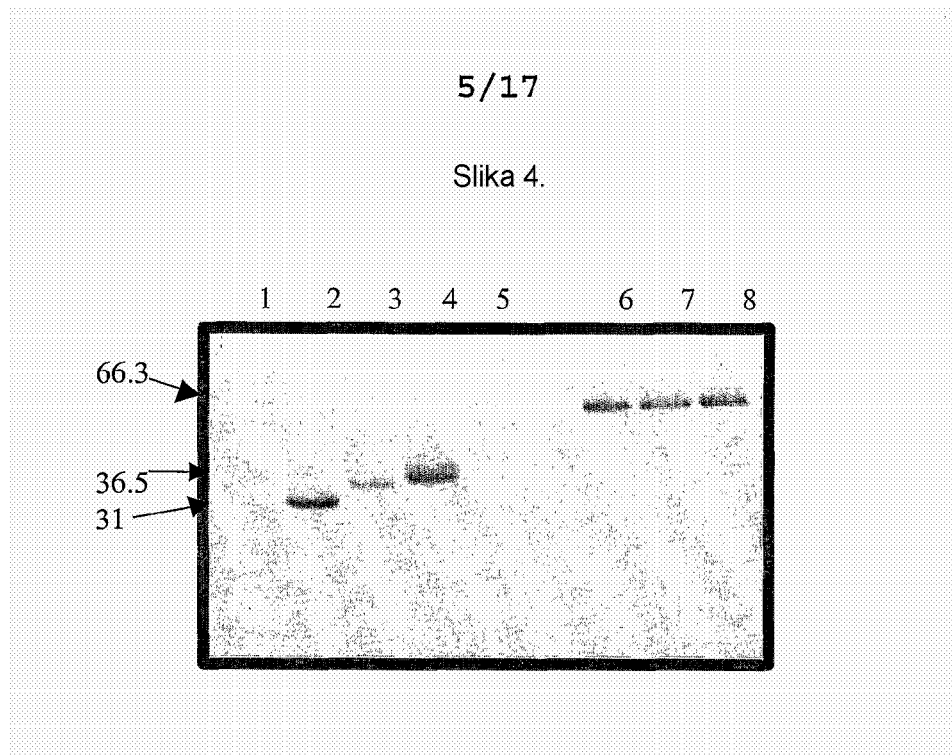
A.



B.



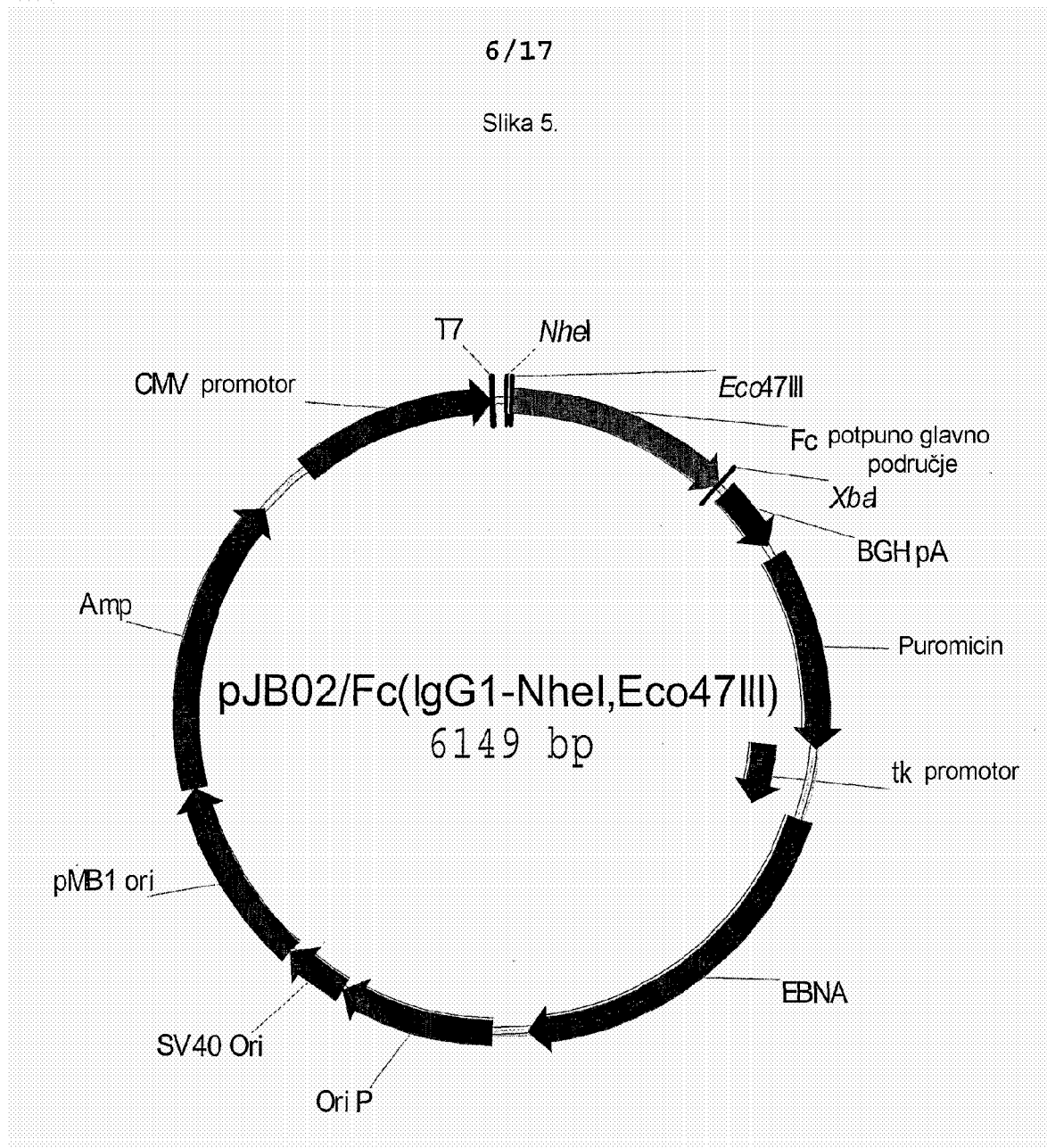
SLUGS 4



51755 0

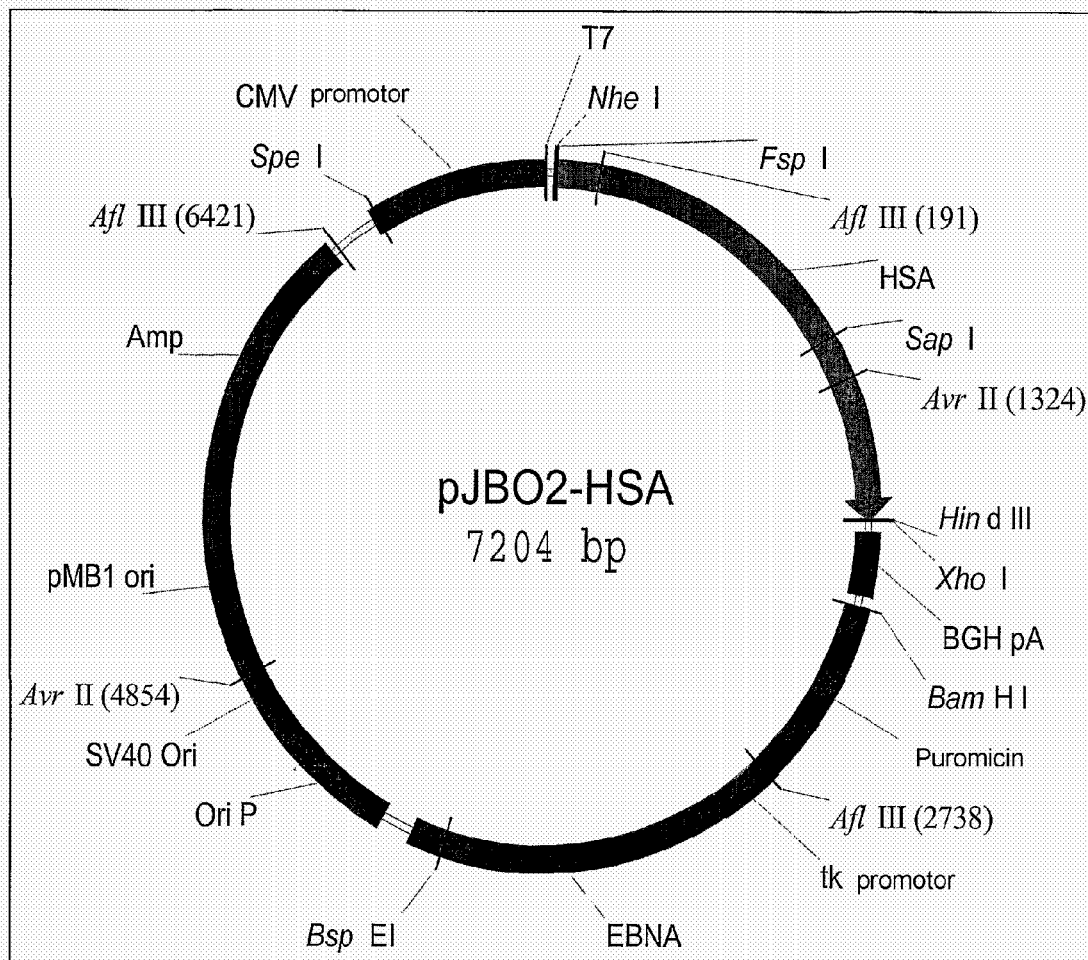
6/17

Slika 5.



7/17

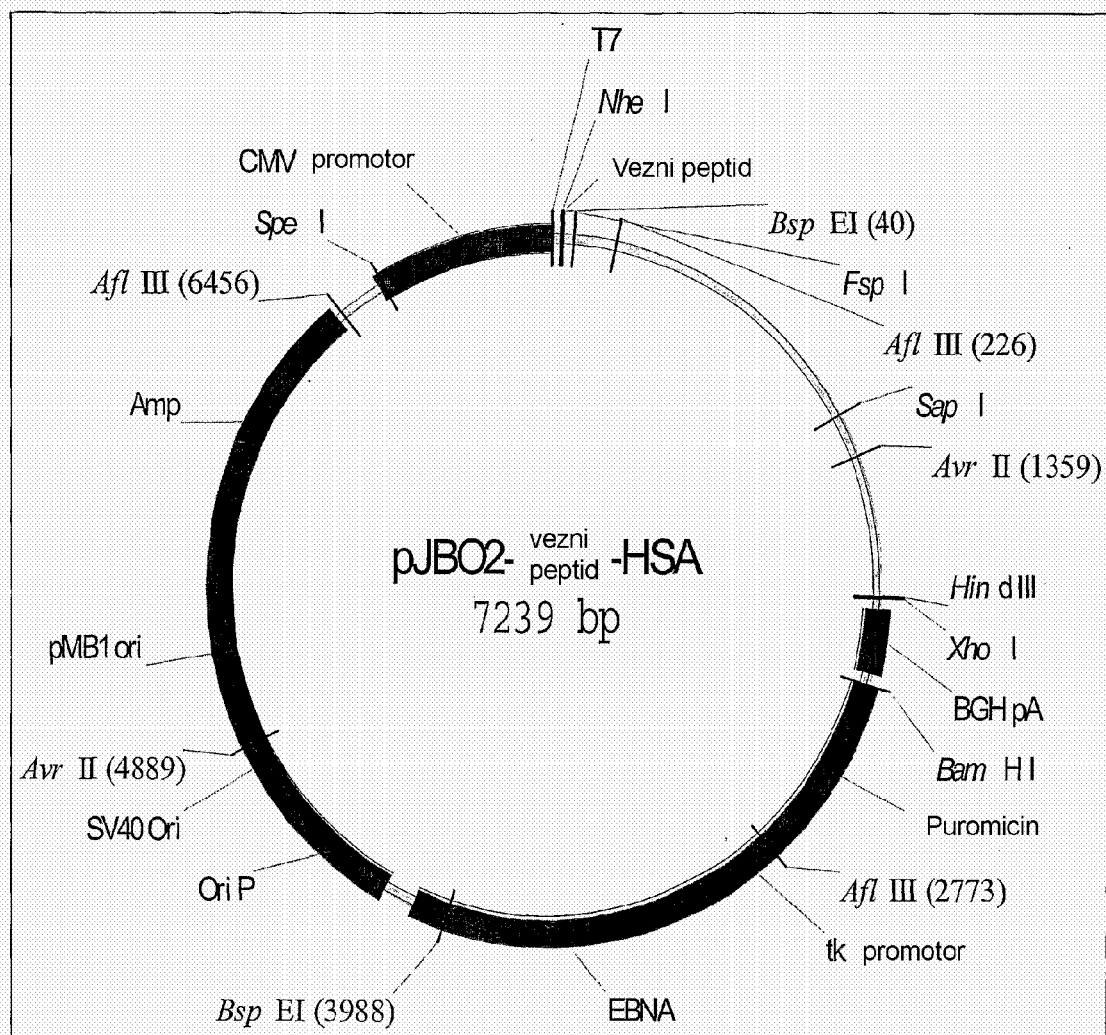
Slika 6



SLIKA 7

8/17

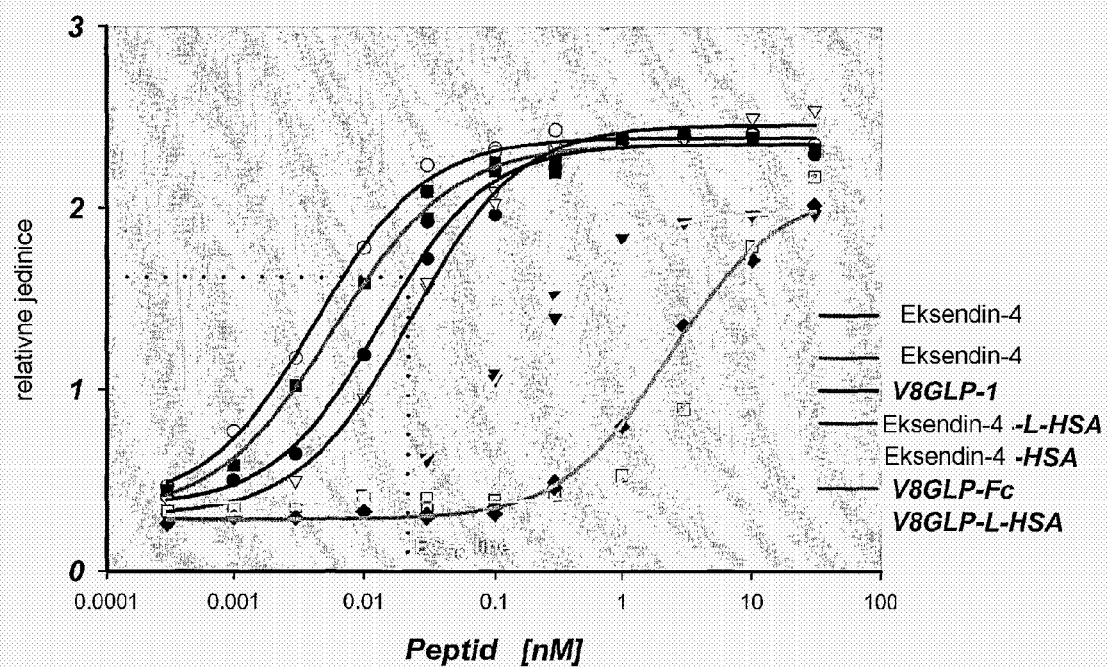
Slika 7



WIKAS

9/17

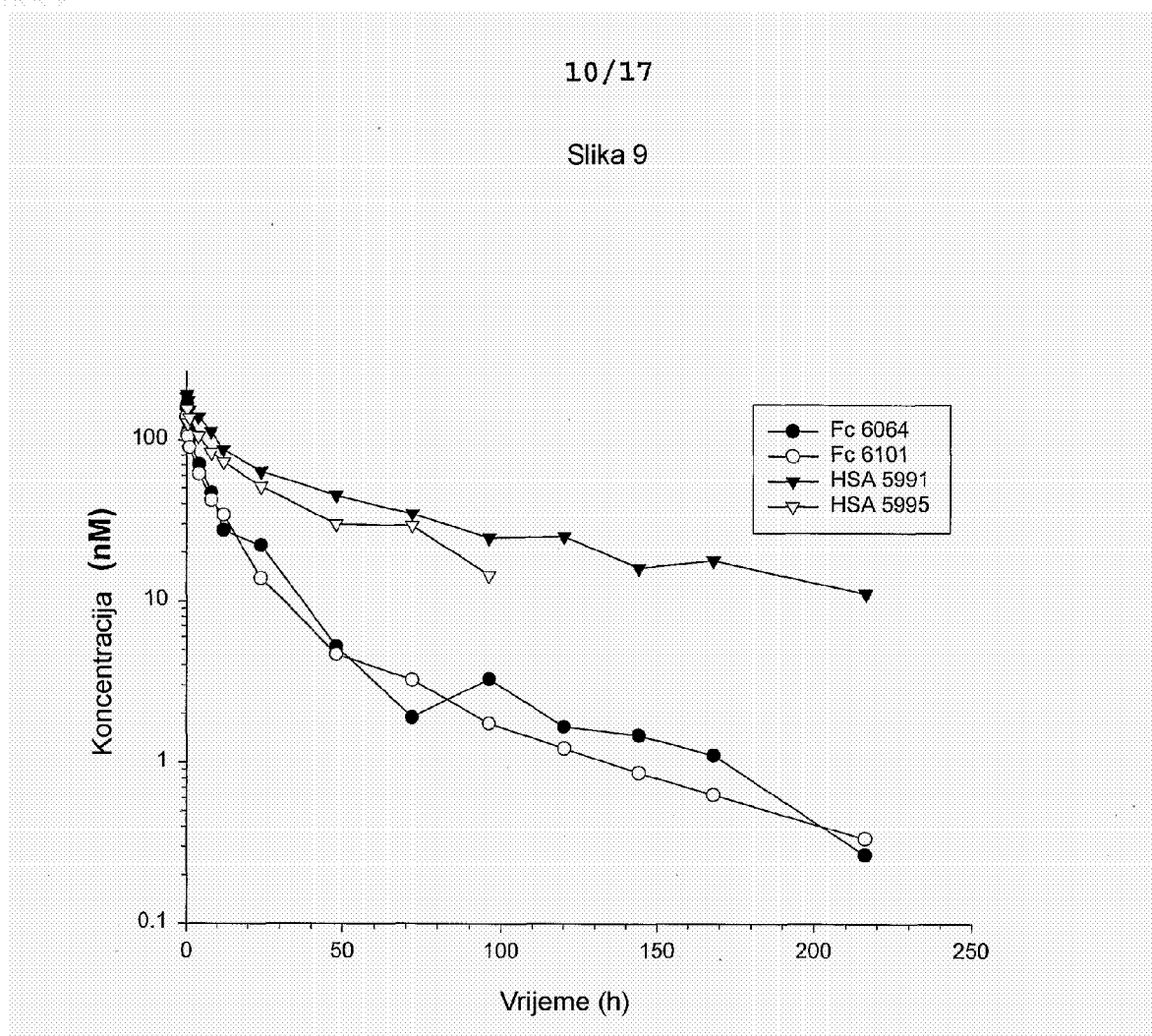
Slika 8



MIKA 9

10/17

Slika 9

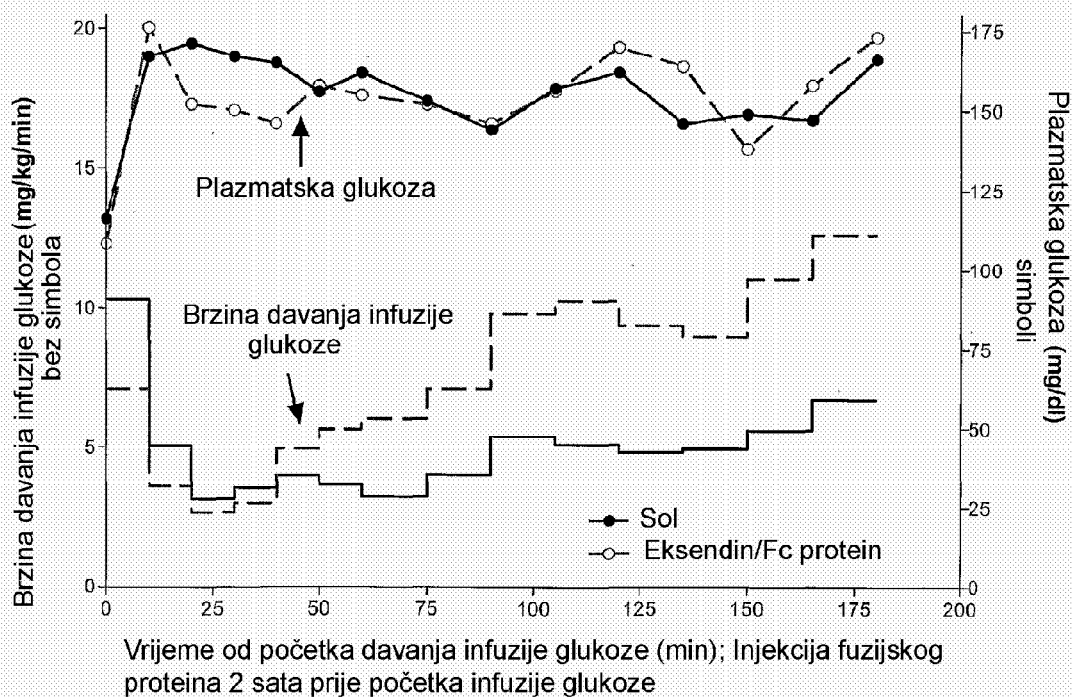


Slika 10

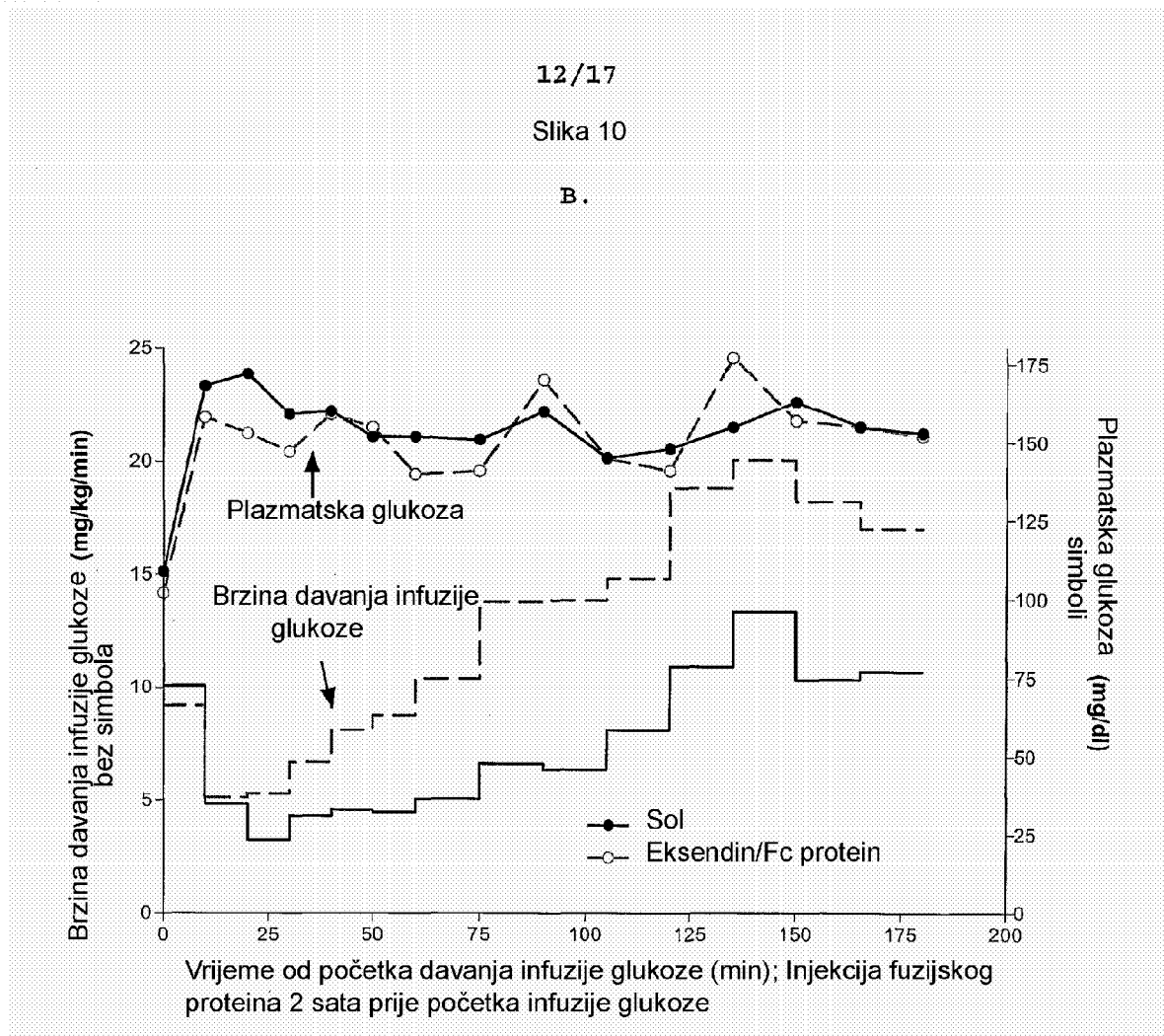
11/17

Slika 10

A.



SLIKA 10 B

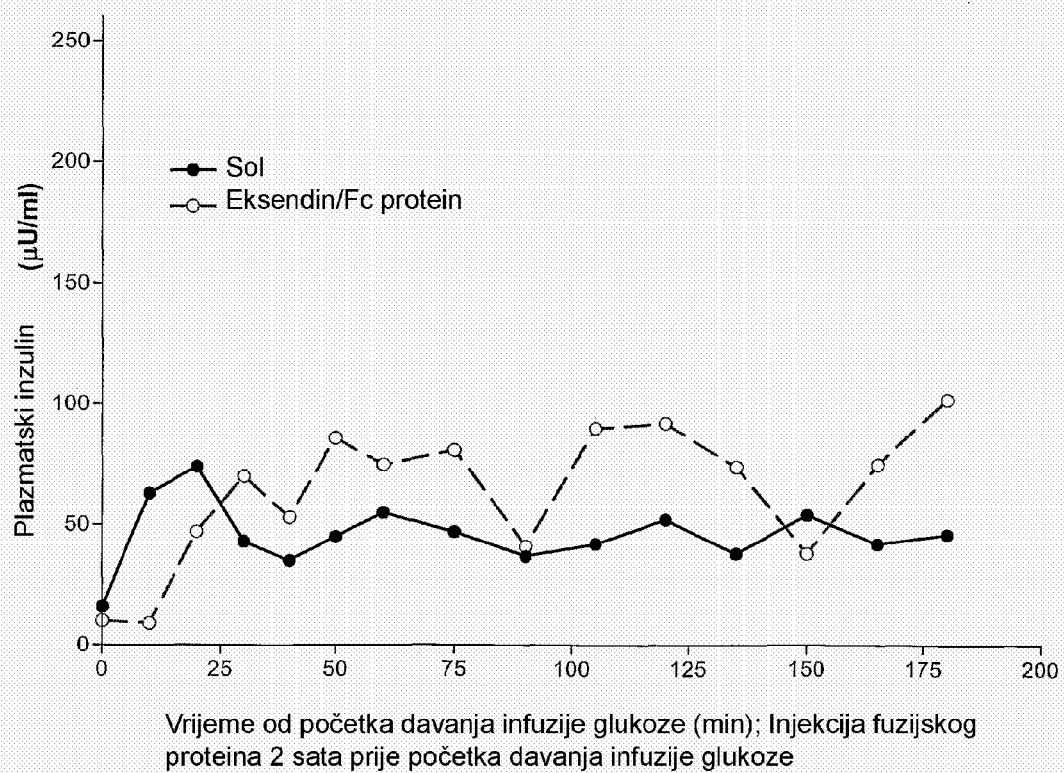


Slika 11 A

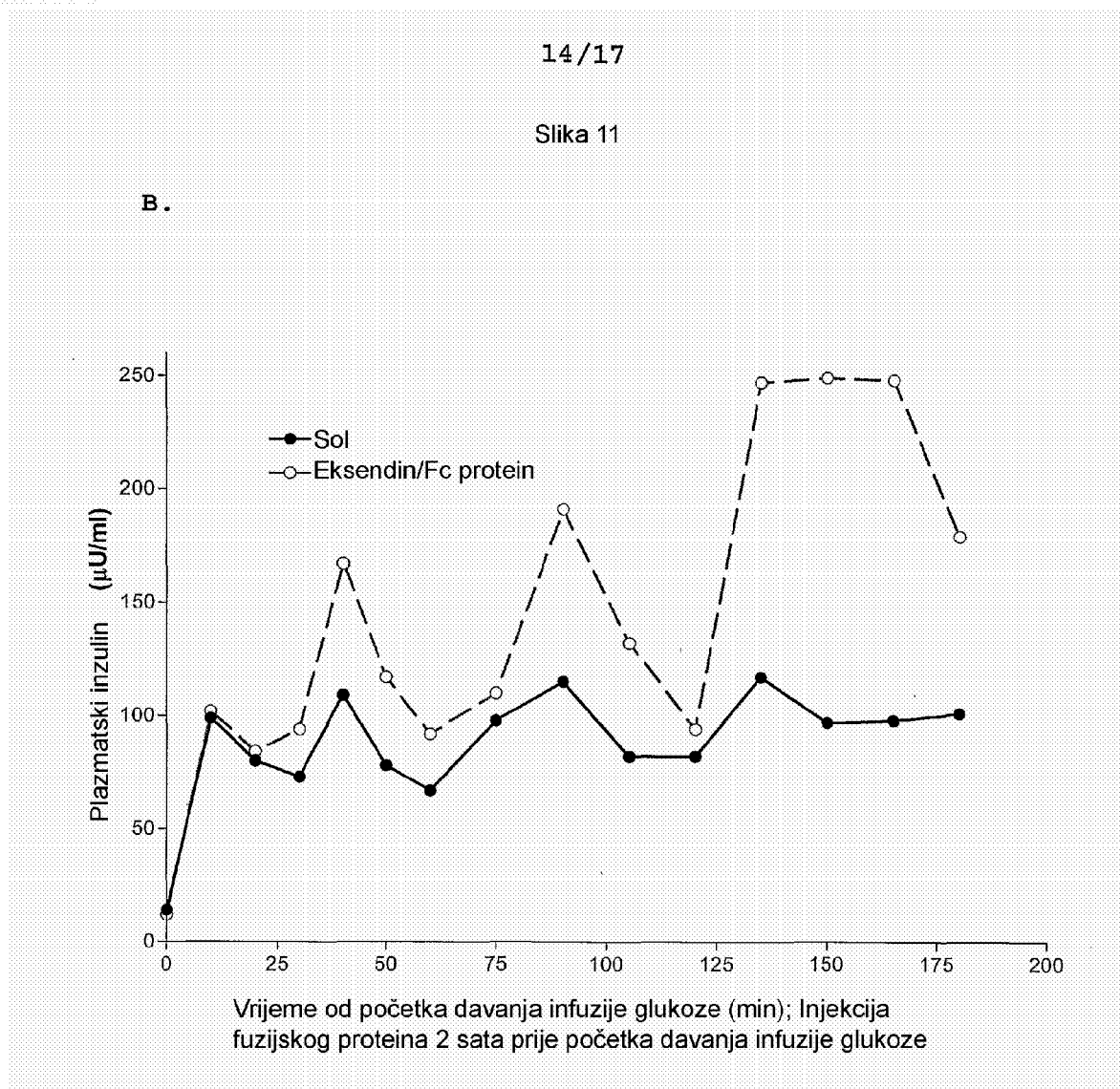
13/17

Slika 11

A.



SLIKA 11



NJEVS 12

15/17

Slika 12

```

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

```

Slika 13

16/17

Slika 13

```

1
GATGCGCACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTGGGAGAAGA
50
AAATTTCAAAGCCTTGGTGTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGT
100
GTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCA
150
AAAACATGTGTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCA
200
TACCCTTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCT
250
ATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAA
300
TGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAG
350
ACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGACAATGAAGAGACAT
400
TTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTAT
450
GCCCCGGAACCTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGA
500
ATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATG
550
AACTTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGT
600
GCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGC
650
TCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGT
700
TAGTGACAGATCTTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTG
750
CTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAA
800
TCAAGATTGATCTCCAGTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGT
850
TGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAATAATGATGAGATGCCTGCT
900
GACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTGAAAGTAAGGATGTTTGCAA
950
AAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATGAAT
1000
ATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCC

```

Slika 13 Nastavak

17/17

Slika 13 Nastavak

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

LISTA SPOJENICI

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and company

<120> GLP-1 FUZIJSKI PROTEINI

<130> X-13991

<150> US 60/251,954

<151> 2000-06-12

<160> 35

<170> Oblik patenta 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

- <222> (2)..(2)
- <223> xaa na položaju 2 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp,
ili Lys;
- <220>
- <221> RAZNI OBLICI
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa na položaju 3 je Glu, Asp, ili Lys;
- <220>
- <221> RAZNI OBLICI
- <222> (5)..(5)
- <223> xaa na položaju 5 je Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp,
ili Lys;
- <220>
- <221> RAZNI OBLICI
- <222> (8)..(8)
- <223> xaa na položaju 8 je ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp,
ili Lys;
- <220>
- <221> RAZNI OBLICI
- <222> (10)..(10)
- <223> xaa na položaju 10 je val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu
, Asp, ili Lys;
- <220>
- <221> RAZNI OBLICI
- <222> (11)..(11)
- <223> xaa na položaju 11 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
, ili Lys;
- <220>
- <221> RAZNI OBLICI
- <222> (12)..(12)

<223> xaa na položaju 12 je Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
, Lys, Trp ili Tyr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (13)..(13)

<223> xaa na položaju 13 je Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (14)..(14)

<223> xaa na položaju 14 je Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp
, Met, Lys, Trp ili Tyr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (15)..(15)

<223> xaa na položaju 15 je Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (16)..(16)

<223> xaa na položaju 16 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
, Trp ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (17)..(17)

<223> xaa na položaju 17 je Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (18)..(18)

<223> Xaa na položaju 18 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa na položaju 19 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa na položaju 20 je Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa na položaju 21 je Leu, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa na položaju 24 je Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (25) .. (25)

<223> Xaa na položaju 25 je Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (26) .. (26)

<223> xaa na položaju 26 je Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp
, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (27)..(27)

<223> xaa na položaju 27 je Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp
, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (28)..(28)

<223> Xaa na položaju 28 je Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (29)..(29)

<223> xaa na položaju 29 je Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp
, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na položaju 30 je Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31)..(31)

<223> xaa na položaju 31 je Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu
, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (32) .. (32)

<223> Xaa na položaju 32 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (33) .. (33)

<223> Xaa na položaju 33 je Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, ili His, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa na položaju 34 je Gly, Asp, Glu, ili Lys, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (35) .. (35)

<223> Xaa na položaju 35 je Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (36) .. (36)

<223> Xaa na položaju 36 je Ser, Pro, Lys, Glu, ili Asp, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (37) .. (37)

<223> Xaa na položaju 37 je Ser, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (38) .. (38)

<223> xaa na položaju 38 je Gly, Pro, Glu, Asp, ili Lys, ili je izbrisan;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (39) .. (39)

<223> xaa na položaju 39 je Ala, Ser, Val, Glu, Asp, ili Lys,
ili je izbrisan;

<400> 2

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

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1) .. (1)

<223> xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2) .. (2)

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

<220>

<221> RAZNI OBLICI
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa na položaju 3 je Thr, Ser, Arg, Lys, Trp, Phe, Tyr, Glu, ili His;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa na položaju 5 je Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, ili His;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa na položaju 6 je His, Trp, Phe, ili Tyr;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa na položaju 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu, ili Ala;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa na položaju 12 je His, Pro, Asp, Glu, Arg, Ser, Ala, ili Lys;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa na položaju 13 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa na položaju 17 je His, Asp, Lys, Glu, Gln, ili Arg;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa na položaju 18 je Glu, Arg, Ala, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (20) .. (20)

<223> Xaa na položaju 20 je Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (21) .. (21)

<223> xaa na položaju 21 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa na položaju 24 je Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (25) .. (25)

<223> Xaa na položaju 25 je Asp, Glu, Ser, Thr, Arg, Trp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (27) .. (27)

<223> Xaa na položaju 27 je Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (28) .. (28)

<223> Xaa na položaju 28 je Glu, Lys, ili Asp;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (29) .. (29)

<223> Xaa na položaju 29 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (30) .. (30)

<223> Xaa na položaju 30 je Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31) .. (31)

<223> Xaa na položaju 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (32) .. (32)

<223> Xaa na položaju 31 je Pro ili je izbrisan.

<400> 3

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

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

10

<210> 4
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2)..(2)

<223> Xaa na položaju 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (5)..(5)

<223> Xaa na položaju 5 je Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na položaju 6 je His, Trp, Phe, ili Tyr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (10)..(10)

<223> Xaa na položaju 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, ili Ala;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (16) .. (16)

<223> xaa na položaju 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (17) .. (17)

<223> xaa na položaju 17 je His, Asp, Lys, Glu, ili Gln;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (18) .. (18)

<223> xaa na položaju 18 je Glu, His, Ala, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (19) .. (19)

<223> xaa na položaju 19 je Asp, Lys, Glu, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (21) .. (21)

<223> xaa na položaju 21 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24) .. (24)

<223> xaa na položaju 24 je Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (27)..(27)

<223> Xaa na položaju 27 je Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (28)..(28)

<223> Xaa na položaju 28 je Glu, Lys, ili Asp;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na položaju 29 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na položaju 30 je Arg, Glu, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na položaju 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na položaju 32 je Pro, ili je izbrisan.

<400> 4

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

13

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

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2)..(2)

<223> xaa na položaju 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Met, ili Thr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (6)..(6)

<223> Xaa na položaju 6 je His, Trp, Phe, ili Tyr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (10)..(10)

<223> Xaa na položaju 10 je Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, ili Ala;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na položaju 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na položaju 17 je His, Asp, Lys, Glu, ili Gln;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (20)..(20)

<223> Xaa na položaju 20 je Asp, Lys, Glu, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na položaju 24 je Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (29)..(29)

<223> Xaa na položaju 29 je Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31)..(31)

<223> Xaa na položaju 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na položaju 32 je Pro ili je izbrisan.

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2)..(2)

<223> Xaa na položaju 2 je Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (16)..(16)

<223> Xaa na položaju 16 je Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, ili Cys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (17)..(17)

<223> Xaa na položaju 17 je His, Asp, Lys, Glu, ili Gln;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (18)..(18)

<223> xaa na položaju 18 je Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24)..(24)

<223> Xaa na položaju 24 je Ala, Glu, Asp, Ser, ili His;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31)..(31)

<223> xaa na položaju 31 je Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, Gly, Gly-Pro, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (32)..(32)

<223> Xaa na položaju 32 je Pro ili je izbrisan.

<400> 6

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

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

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1)..(1)

<223> Xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2)..(2)

<223> Xaa na položaju 2 je Ala, Gly, Val, Thr, Ile, te alfa-metil-Ala;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (15)..(15)

<223> Xaa na položaju 15 je Glu, Gln, Ala, Thr, Ser, te Gly;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (21)..(21)

<223> Xaa na položaju 21 je Glu, Gln, Ala, Thr, Ser, te Gly;

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (19)..(19)

<223> Xaa na položaju 19 je Lys ili Arg;

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> ACETILACIJA

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (30)..(30)

<223> Xaa na položaju 30 je Gly;

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> AMIDACIJA

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 9

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 10

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1) .. (1)

<223> xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa na položaju 2 je Gly, Ala, ili Val;

<220>

<221> RAZNI OBLICI
 <222> (10) . . (10)
 <223> Xaa na položaju 10 je Leu ili Val;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (12) . . (12)
 <223> Xaa na položaju 12 je Lys ili Ser;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (13) . . (13)
 <223> Xaa na položaju 13 je Gln ili Tyr;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (14) . . (14)
 <223> Xaa na položaju 14 je Met ili Leu;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (16) . . (16)
 <223> Xaa na položaju 16 je Glu ili Gln;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (17) . . (17)
 <223> Xaa na položaju 17 je Glu ili Gln;

<220>
 <221> RAZNI OBLICI
 <222> (19) . . (19)
 <223> Xaa na položaju 19 je Val ili Ala;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (20) . . (20)

<223> Xaa na položaju 20 je Arg ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (21) . . (21)

<223> Xaa na položaju 21 je Leu ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24) . . (24)

<223> Xaa na položaju 24 je Glu ili Ala;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (27) . . (27)

<223> Xaa na položaju 27 je Val ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (28) . . (28)

<223> Xaa na položaju 28 je Asn ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (30) . . (30)

<223> Xaa na položaju 30 je Gly ili Arg; te

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31) . . (31)

<223> Xaa na položaju 31 je Gly ili Pro;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (32) .. (32)

<223> Xaa na položaju 32 je Ser, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (33) .. (33)

<223> Xaa na položaju 33 je Ser, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa na položaju 34 je Gly, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (35) .. (35)

<223> xaa na položaju 35 je Ala, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (36) .. (36)

<223> xaa na položaju 36 je Pro, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (37) .. (37)

<223> xaa na položaju 37 je Pro, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (38) .. (38)

<223> Xaa na položaju 38 je Pro, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (39) .. (39)

<223> Xaa na položaju 39 je Pro, ili je odsutan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (39) .. (39)

<223> Xaa na položaju 39 je Ser, ili je odsutan.

<400> 11

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

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa na položaju 1 je L-histidine, D-histidine, ili je izbrisan.

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa na položaju 2 je Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser, ili Thr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa na položaju 6 je Phe, Trp, ili Tyr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa na položaju 10 je Val, Trp, Ile, Leu, Phe, ili Tyr;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa na položaju 12 je Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa na položaju 13 je Tyr, Trp, ili Phe;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (14) .. (14)

<223> Xaa na položaju 14 je Leu, Phe, Tyr, ili Trp;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (16) .. (16)

<223> Xaa na položaju 16 je Gly, Glu, Asp, ili Lys;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (19) .. (19)

<223> Xaa na položaju 19 je Ala, Val, Ile, ili Leu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa na položaju 21 je Glu, Ile, ili Ala;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa na položaju 24 je Ala ili Glu;

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (27) .. (27)

<223> Xaa na položaju 27 je Val ili Ile; te

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30) .. (30)

<223> AMIDACIJA

<220>

<221> RAZNI OBLICI

<222> (31) .. (31)

<223> Xaa na položaju 31 je Gly, His ili je odsutan.

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 616

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
145 150 155 160

Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
165 170 175

His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr
180 185 190

Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys
195 200 205

Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser
210 215 220 27

Ala 225	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys 230	Cys	Ala	Ser	Leu	Gln 235	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg 240
Ala	Phe	Lys	Ala	Trp 245	Ala	Val	Ala	Arg	Leu 250	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro 255	Lys
Ala	Glu	Phe	Ala 260	Glu	Val	Ser	Lys	Leu 265	Val	Thr	Asp	Leu	Thr 270	Lys	Val
His	Thr	Glu 275	Cys	Cys	His	Gly	Asp 280	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala 285	Asp	Asp	Arg
Ala	Asp 290	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile 295	Cys	Glu	Asn	Gln	Asp 300	Ser	Ile	Ser	Ser
Lys 305	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys 310	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu 315	Glu	Lys	Ser	His	Cys 320
Ile	Ala	Glu	Val	Glu 325	Asn	Asp	Glu	Met	Pro 330	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser 335	Leu
Ala	Ala	Asp	Phe 340	Val	Glu	Ser	Lys	Asp 345	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr 350	Ala	Glu
Ala	Lys	Asp 355	Val	Phe	Leu	Gly	Met 360	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr 365	Ala	Arg	Arg
His	Pro 370	Asp	Tyr	Ser	Val	Val 375	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu 380	Ala	Lys	Thr	Tyr
Glu 385	Thr	Thr	Leu	Glu	Lys 390	Cys	Cys	Ala	Ala 395	Ala	Asp	Pro	His	Glu	Cys 400
Tyr	Ala	Lys	Val	Phe 405	Asp	Glu	Phe	Lys	Pro 410	Leu	Val	Glu	Glu	Pro 415	Gln
Asn	Leu	Ile	Lys 420	Gln	Asn	Cys	Glu	Leu 425	Phe	Glu	Gln	Leu	Gly 430	Glu	Tyr
Lys	Phe	Gln 435	Asn	Ala	Leu	Leu	Val 440	Arg	Tyr	Thr	Lys	Lys 445	Val	Pro	Gln
Val	Ser 450	Thr	Pro	Thr	Leu	Val 455	Glu	Val	Ser	Arg	Asn 460	Leu	Gly	Lys	Val
Gly 465	Ser	Lys	Cys	Cys	Lys 470	His	Pro	Glu	Ala	Lys 475	Arg	Met	Pro	Cys	Ala 480
Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser 485	Val	Val	Leu	Asn	Gln 490	Leu	Cys	Val	Leu	His 495	Glu

Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu
500 505 510

Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr
515 520 525

Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile
530 535 540

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu
545 550 555 560

Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys
565 570 575

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

Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala
595 600 605

Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
610 615

<210> 14

<211> 631

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 14

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ala
35 40 45

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

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys
65 70 75 80

29

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

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala
 355 360 365
 Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His
 370 375 380
 Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu
 385 390 395 400
 Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr
 405 410 415
 Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn
 420 425 430
 Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys
 435 440 445
 Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
 450 455 460
 Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly
 465 470 475 480
 Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu
 485 490 495
 Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys
 500 505 510
 Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val
 515 520 525
 Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val
 530 535 540
 Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val
 565 570 575
 Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala
 580 585 590
 Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp
 595 600 605
 Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala
 610 615 620
 31

Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
625 630

<210> 15

<211> 640

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1 32

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

Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 465 470 475 480
 Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
 485 490 495
 Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
 500 505 510
 Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
 515 520 525
 Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 530 535 540
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
 545 550 555 560
 Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
 565 570 575
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
 580 585 590
 Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
 595 600 605
 Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
 610 615 620
 Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 625 630 635 640

<210> 16

<211> 624

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 16

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 34

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His
	35						40					45			
Arg	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Phe	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Ile
	50					55					60				
Ala	Phe	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys
65					70					75					80
Leu	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu
				85					90					95	
Ser	Ala	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys
			100					105					110		
Leu	Cys	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp
		115					120					125			
Cys	Cys	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His
	130					135					140				
Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp
145					150					155					160
Val	Met	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys
				165					170					175	
Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu
			180					185					190		
Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys
		195					200					205			
Gln	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu
	210					215					220				
Arg	Asp	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala
225					230					235					240
Ser	Leu	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala
				245					250					255	
Arg	Leu	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys
			260					265					270		
Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp
		275					280					285			
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys
	290					295					300				
											35				

Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys
 305 310 315 320
 Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu
 325 330 335
 Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys
 340 345 350
 Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met
 355 360 365
 Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu
 370 375 380
 Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys
 385 390 395 400
 Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe
 405 410 415
 Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu
 420 425 430
 Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val
 435 440 445
 Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu
 450 455 460
 Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro
 465 470 475 480
 Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu
 485 490 495
 Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val
 500 505 510
 Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser
 515 520 525
 Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu
 530 535 540
 Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg
 545 550 555 560
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro
 565 570 575

Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
580 585 590

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala
595 600 605

Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
610 615 620

<210> 17

<211> 640

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

37

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

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

<210> 18

<211> 264

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 18

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ala
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 35 40 45
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 50 55 60
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 65 70 75 80
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 85 90 95
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 100 105 110
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 115 120 125
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 130 135 140
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 165 170 175
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 210 215 220
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 225 230 235 240
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 245 250 255
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260

40

<210> 19

<211> 272

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

41

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

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

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

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

<210> 20

<211> 264

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
130 135 140 42

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

<210> 21

<211> 272

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 21

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 35 40 45
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 50 55 60
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 272

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 22

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

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 35 40 45
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 50 55 60
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 85 90 95
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 100 105 110
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 115 120 125
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 130 135 140
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 165 170 175
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 180 185 190
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 195 200 205
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 210 215 220
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 245 250 255
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 260 265 270
 <210> 23

<211> 287

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

46

Gly 225	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 230	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 235	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 240
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 245	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 250	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 255	Arg
Trp	Gln	Gln	Gly 260	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 265	Ser	Val	Met	His	Glu 270	Ala	Leu
His	Asn	His 275	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 280	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro 285	Gly	Lys	
<210> 24															
<211> 284															
<212> PRT															
<213> Umjetna sekvenca															
<220>															
<223> sintetska konstrukcija															
<400> 24															
His 1	Gly	Glu	Gly	Thr 5	Phe	Thr	Ser	Asp	Val 10	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu 15	Glu
Gln	Ala	Ala	Lys 20	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp 25	Leu	Val	Lys	Gly	Arg 30	Gly	Ser
Ser	Gly	Ala 35	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly 40	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 45	Gly	Gly	Gly
Ser	Gly 50	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala 55	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly 60	Pro	Pro	Cys	Pro
Ser 65	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 70	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro 75	Ser	Val	Phe	Leu	Phe 80
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 85	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 90	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu 95	Val
Thr	Cys	Val	Val 100	Val	Asp	Val	Ser	Gln 105	Glu	Asp	Pro	Glu	Val 110	Gln	Phe
Asn	Trp	Tyr 115	Val	Asp	Gly	Val	Glu 120	Val	His	Asn	Ala	Lys 125	Thr	Lys	Pro
Arg	Glu 130	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser 135	Thr	Tyr	Arg	Val	Val 140	Ser	Val	Leu	Thr
47															

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

<210> 25

<211> 302

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 25

His 1 Gly Glu Gly Thr 5 Phe Thr Ser Asp Val 10 Ser Ser Tyr Leu Glu Glu 15
 Gln Ala Ala Lys 20 Glu Phe Ile Ala Trp 25 Leu Val Lys Gly Arg Gly Ser 30
 Ser Gly Ala 35 Pro Pro Pro Ser Gly 40 Gly Gly Gly Ser Gly 45 Gly Gly Gly
 Ser 50 Gly Gly Gly Ser Gly 55 Gly Gly Gly Ser Gly 60 Gly Gly Gly Ser
 48

Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 65 70 75 80
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 85 90 95
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 100 105 110
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 115 120 125
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 130 135 140
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 165 170 175
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 180 185 190
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 195 200 205
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 210 215 220
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 225 230 235 240
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 245 250 255
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 260 265 270
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 275 280 285
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295 300
 <210> 26
 <211> 294
 <212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 26

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro
50 55 60

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
65 70 75 80

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
85 90 95

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
100 105 110

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
145 150 155 160

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
165 170 175

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
180 185 190

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

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

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
225 230 235 240
50

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
260 265 270

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
275 280 285

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290

<210> 27

<211> 280

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 27

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

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

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

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
65 70 75 80

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
85 90 95

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
100 105 110

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
115 120 125

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
130 135 140 51

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

<210> 28

<211> 287

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 28

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Val Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Ile Lys Gly Arg Gly Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 50 55 60 52

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 85 90 95
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 115 120 125
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 130 135 140
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 145 150 155 160
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 165 170 175
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 180 185 190
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 195 200 205
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 210 215 220
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 225 230 235 240
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 245 250 255
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 260 265 270
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280 285
 <210> 29
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

54

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

<210> 30

<211> 272

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 287

<212> PRT

<213> Umjetna sekvenca

<220>

<223> sintetska konstrukcija

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

56

Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	130					135					140				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
145					150					155					160
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				165					170					175	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			180					185					190		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		195					200					205			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	210					215					220				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
225					230					235					240
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				245					250					255	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			260					265					270		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		275					280					285			
<210>	32														
<211>	232														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	32														
Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1				5					10					15	
Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		
Lys	Asp	Thr	Lys	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
		35					40					45			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
	50					55					60				
										57					

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

<210> 33

<211> 703

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 60
 gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 120
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360

58

```

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccggtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaagtat agt 703

```

<210> 34

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

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

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

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

59

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

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 35

<211> 1762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

gatgcgcaca agagtgaggt tgctcatcgg tttaaagatt tgggagaaga aaatttcaaa	60
gccttggtgt tgattgcctt tgctcagtat cttcagcagt gtccatttga agatcatgta	120
aaattagtga atgaagtaac tgaatttgca aaaacatgtg ttgctgatga gtcagctgaa	180
aattgtgaca aatcacttca tacccttttt ggagacaaat tatgcacagt tgcaactctt	240
cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaaac aagaacctga gagaaatgaa	300
tgcttcttgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattggtgag accagagggt	360
gatgtgatgt gcactgcttt tcatgacaat gaagagacat ttttgaaaaa atacttatat	420
gaaattgccca gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt tgctaaaagg	480
tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg cctgttgcca	540
aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag actcaagtgt	600

gccagtcctcc	aaaaatttgg	agaaagagct	ttcaaagcat	gggcagtagc	tcgcctgagc	660
cagagatttc	ccaaagctga	gtttgcagaa	gtttccaagt	tagtgacaga	tcttaccaaa	720
gtccacacgg	aatgctgcca	tggagatctg	cttgaatgtg	ctgatgacag	ggcggacctt	780
gccaagtata	tctgtgaaaa	tcaagattcg	atctccagta	aactgaagga	atgctgtgaa	840
aaacctctgt	tggaataatc	ccactgcatt	gccgaagtgg	aaaatgatga	gatgcctgct	900
gacttgcctt	cattagctgc	tgattttggt	gaaagtaagg	atgtttgcaa	aaactatgct	960
gaggcaaagg	atgtcttcct	gggcatgttt	ttgtatgaat	atgcaagaag	gcacccctgat	1020
tactctgtcg	tgctgtctgt	gagacttgcc	aagacatatg	aaaccactct	agagaagtgc	1080
tgtgccgctg	cagatcctca	tgaatgctat	gccaaagtgt	tcgatgaatt	taaacctctt	1140
gtggaagagc	ctcagaatct	aatcaaaca	aattgtgagc	tttttgagca	gcttgagag	1200
tacaaattcc	agaatgcgct	attagttcgt	tacaccaaga	aagtaccca	agtgtcaact	1260
ccaactcttg	tagaggtctc	aagaaaccta	ggaaaagtgg	gcagcaaata	ttgtaaaca	1320
cctgaagcaa	aaagaatgcc	ctgtgcagaa	gactatctat	ccgtgggtcct	gaaccagtta	1380
tgtgtgttgc	atgagaaaac	gccagtaagt	gacagagtca	ccaaatgctg	cacagaatcc	1440
ttggtgaaca	ggcgaccatg	cttttcagct	ctggaagtgc	atgaaacata	cgttcccaaa	1500
gagtttaatg	ctgaaacatt	caccttccat	gcagatatat	gcacactttc	tgagaaggag	1560
agacaaatca	agaaacaaac	tgactttggt	gagctcgtga	aacacaagcc	caaggcaaca	1620
aaagagcaac	tgaaagctgt	tatggatgat	ttcgcagctt	ttgtagagaa	gtgctgcaag	1680
gctgacgata	aggagacctg	ctttgccgag	gagggtaaaa	aacttggtgc	tgcaagtcaa	1740
gctgccttag	gcttataatg	ac				1762