

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 033788

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.26

(21) Номер заявки
201590994

(22) Дата подачи заявки
2013.11.20

(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)

(54) СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ ГИДРОДИНАМИЧЕСКОГО ОБЪЕМА ПОЛИПЕПТИДА
ПУТЕМ ПРИСОЕДИНЕНИЯ КАРБОКСИКОНЦЕВОГО ПЕПТИДА ГОНАДОТРОПИНА

(31) 61/728,662

(32) 2012.11.20

(33) US

(43) 2016.03.31

(86) PCT/IL2013/050960

(87) WO 2014/080401 2014.05.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
Гершкович Орен, Бар-Илан Ахува
(IL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KONTERMANN. "Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics". Current Opinion in Biotechnology, Vol. 22, Pg. 868-876, 20 August 2011, entire document

KANDA et al. "Genetic Fusion of an α -Subunit Gene to the Follicle-Stimulating Hormone and Chorionic Gonadotropin-b Subunit Genes: Production of a Bifunctional Protein". Molecular Endocrinology, Vol. 13, No. 11, Pg. 1873-1881. November 1999, entire document

KESSLER et al. "Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin". The Journal of Biological Chemistry. Vol. 254, No. 16, Pg. 7909-7914. 25 August 1979, entire document

US-A1-20070184530

(57) Изобретение относится к применению карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина или его фрагментов для модификации полипептида или его фрагмента с целью увеличения гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента.

B1

033788

033788

B1

Область техники

Настоящее изобретение направлено на применение карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина для увеличения гидродинамического объема полипептида или его фрагмента.

Уровень техники

Доля биотехнологических продуктов, включая моноклональные антитела, вакцины, факторы роста, гормоны, цитокины, факторы свертывания крови, гибридные белки, ферменты и другие белки, среди всех терапевтических лекарственных средств увеличилась. За исключением моноклональных антител и вакцин, многие вещества из этого списка имеют молекулярную массу ниже 50 кДа и короткий период полувыведения в пределах от нескольких минут до нескольких часов.

Эффективность белковых лекарственных средств в значительной мере определяется их фармакокинетическими свойствами, включая период полувыведения из плазмы крови, влияющими на распределение и выведение. Несмотря на то что небольшой размер облегчает их проникновение в ткани, эти молекулы зачастую быстро выводятся из кровотока. Таким образом, чтобы поддерживать терапевтически эффективную концентрацию в течение длительного периода времени, введение осуществляют путем инфузии или с небольшими интервалами либо лекарственный препарат применяют локально - местно или подкожно - с использованием медленного всасывания в кровоток. Такие ограничения низкомолекулярных белковых препаратов привели к разработке и внедрению стратегий, направленных на увеличение периода полувыведения, чтобы продлить время циркуляции таких рекомбинантных антител в крови и улучшить тем самым характеристики введения и фармакокинетики, а также фармакодинамические свойства.

В настоящем изобретении данная стратегия используется для увеличения гидродинамического размера или объема белков, представляющих интерес, или их фрагментов, включая пептиды, на определенную величину, и тем самым обеспечивает улучшение характеристик введения, фармакокинетики, а также фармакодинамических свойств таких белков. Указанное увеличение гидродинамического объема достигается за счет использования технологии на основе пептидов, чтобы продлить период полувыведения белков и пептидов из сыворотки крови. Данная технология основана на использовании природного пептида, С-концевого пептида (СТР) бета-цепи хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), который обеспечивает требуемую продолжительность выведения ХГЧ для поддержания беременности. Бета-цепь лютеинизирующего гормона (ЛГ) - гормона фертильности, который вызывает овуляцию, - почти идентична бета-цепи ХГЧ, но не содержит СТР. В результате ЛГ имеет значительно более короткий период полувыведения из сыворотки крови. Присоединение заранее определенного количества пептидов СТР к белку или пептиду, представляющему интерес, увеличивает его гидродинамический объем на определенную величину и приводит к улучшению свойств, которые включают увеличенный период полувыведения из сыворотки крови и эффективность белка или пептида, представляющего интерес.

Краткое описание изобретения

Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, включающему присоединение от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к указанному полипептиду или его фрагменту, при этом присоединение от одного до десяти пептидов СТР к указанному полипептиду или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента приблизительно на 28-53 кДа на каждый присоединенный СТР, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к способу увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида или его фрагмента, включающему присоединение от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к указанному полипептиду или его фрагменту, при этом присоединение от одного до десяти указанных СТР к указанному полипептиду или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента на величину, которая зависит от конкретного полипептида или его фрагмента, к которому присоединен пептид СТР, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными на основании нижеследующего подробного описания примеров и фигур. Следует понимать, однако, что подробное описание и конкретные примеры, несмотря на то, что они указывают на предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, приведены только в качестве иллюстраций, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники на основании данного подробного описания.

Краткое описание чертежей

Нижеследующие чертежи являются частью настоящего описания и включены, чтобы дополнительно продемонстрировать определенные аспекты настоящего изобретения, объекты которого будут более поняты при ссылке на один или более из этих чертежей в совокупности с подробным описанием кон-

кретных вариантов, представленных в настоящем описании.

На фиг. 1 показаны результаты исследования методом электрофореза в ДСН-ПААГ шести различных очищенных СТР-модифицированных белков и соответствующих им нативных белков. 1. СТР-СТГ человека-СТР-СТР (MOD-4023). 2. Биотропин (рСТГ человека). 3. Маркер молекулярной массы. 4. СТР-ЭП-СТР-СТР. 5. СТР-СТР-ЭП. 6. СТР-СТР-ЭПО-СТР-СТР. 7. ЭПРЕКС® (рЭПО). 8. Маркер молекулярной массы. 9. Апо-А1. 10. Маркер молекулярной массы. 11. Апо-СТР. 12. Апо-СТР-СТР. 13. Маркер молекулярной массы.

На фиг. 2 показаны результаты исследования методом электрофореза в ДСН-ПААГ пяти различных очищенных СТР-модифицированных белков и соответствующих им нативных белков. 1. ФІХ-СТР-СТР-СТР. 2. Маркер молекулярной массы. 3. ФІХ-СТР-СТР-СТР-СТР. 4. ФІХ-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР. 5. Мононин® (гФІХ). 6. Маркер молекулярной массы. 7. ФVІІа-СТР-СТР-СТР. 8. ФVІІа-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР. 9. Маркер молекулярной массы.

На фиг. 3 показано приращение молекулярной массы (кДа) на одну копию пептида СТР для модифицированного белка, содержащего негликозилированный (А) и гликозилированный (В) СТР, согласно результатам измерения с помощью метода масс-спектрометрии с времяпролетной ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF).

На фиг. 4 показано приращение гидродинамического размера модифицированных белков, содержащих гликозилированный СТР, по сравнению с соответствующими нативными белками, согласно результатам измерения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, комбинированной с эксклюзионной хроматографией (ВЭЖХ-ЭХ). (А) Показано полное приращение гидродинамического размера, тогда как на (В) показано рассчитанное приращение на одну копию гликозилированного СТР.

На фиг. 5 показано приращение гидродинамического размера модифицированных белков, содержащих негликозилированный СТР, по сравнению с соответствующими нативными белками, согласно результатам измерения с помощью колонки для ВЭЖХ, комбинированной с эксклюзионной хроматографией. (А) Показано полное приращение гидродинамического размера, тогда как на (В) показано рассчитанное приращение на одну копию негликозилированного СТР.

Подробное описание изобретения

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения гидродинамического объема или гидродинамического размера полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, включающий этап гибридизации указанного полипептида или его фрагмента по меньшей мере с одним С-концевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина на N-конце или С-конце указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно одному варианту реализации термины "протеин" и "полипептид" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Согласно другому варианту реализации термины "полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент" или "белок, представляющий интерес, или его фрагмент" включают нативные полипептиды (продукты расщепления, синтетически синтезированные полипептиды или рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (как правило, синтетически синтезированные полипептиды), а также пептоиды и семипептоиды, являющиеся аналогами полипептидов, которые содержат, в другом варианте, модификации, которые придают модифицированным полипептидам, предложенным в настоящем описании, большую стабильность при локализации в организме или большую способность к проникновению в клетки. Более того, термины также включают пептиды, представляющие интерес. В другом варианте по меньшей мере один пептид СТР, предложенный в настоящем описании, присоединен к полипептидам, представляющим интерес, или их фрагментам, или пептидам, представляющим интерес, предложенным в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации изобретения термин "его фрагмент", в случае использования в отношении белка или полипептида, включает усеченные варианты белка или полипептида, представляющего интерес, включая представляющие интерес пептиды.

Согласно другому варианту реализации изобретения термин "фрагмент" белка или полипептида относится к функциональному фрагменту (например, фрагменту, который обладает биологической активностью, которая аналогична таковой для исходного полипептида, или повышенной активностью по сравнению с исходным полипептидом). Примеры фрагментов белка могут включать варианты полипептида или пептиды, полученные из исходного полипептида. Следовательно, следует понимать, что термин "фрагмент" белка или полипептида и термин "пептид" могут быть использованы взаимозаменяемо в настоящем описании.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента по меньшей мере приблизительно на 28 кДа, включающий этап гибридизации указанного полипептида или его фрагмента по меньшей мере с одним С-концевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина на N-конце или С-конце указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, включающий присоединение от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР)

хорионического гонадотропина к указанному полипептиду или его фрагменту, при этом присоединение от одного до десяти пептидов СТР к указанному полипептиду или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента увеличивается приблизительно на 28-53 кДа на каждую копию гликозилированного СТР, присоединенного к указанному полипептиду или его фрагменту, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента увеличивается приблизительно на 8,0-22 кДа на каждую копию негликозилированного СТР, присоединенного к указанному полипептиду или его фрагменту, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента увеличивается приблизительно на 8,1-21,6 кДа на каждую копию негликозилированного СТР, присоединенного к указанному полипептиду или его фрагменту, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида или его фрагмента, включающий присоединение от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к указанному полипептиду или его фрагменту, при этом присоединение от одного до десяти СТР к указанному полипептиду или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента на величину, которая зависит от конкретного полипептида или его фрагмента, к которому присоединен пептид СТР, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения указанные от одного до десяти пептидов СТР присоединены к N-концу указанного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанные от одного до десяти пептидов СТР присоединены к C-концу указанного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанные от одного до десяти пептидов СТР присоединены к обоим концам, N-концу и C-концу указанного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения один СТР присоединен к N-концу указанного полипептида, и два СТР присоединены к C-концу указанного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения два СТР присоединены к N-концу указанного полипептида, и два СТР присоединены к C-концу указанного полипептида.

Согласно одному варианту реализации в настоящем описании термины "гидродинамический размер" или "гидродинамический объем" используются взаимозаменяемо и каждый из них относится к кажущемуся размеру молекулы (например, молекулы белка) на основании диффузии молекулы через водный раствор. Коэффициент диффузии или движения белка через раствор может быть преобразован, чтобы получить кажущийся размер белка, где размер определяется как "радиус Стокса" или "гидродинамический радиус" белковой частицы. "Гидродинамический размер" белка зависит как от массы, так и от формы (конформации) так, что два белка, имеющие одинаковую молекулярную массу, могут иметь различные гидродинамические размеры на основании общей конформации белка.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения тип гликозилирования представляет собой О-гликозилирование. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный тип О-гликозилирования представляет собой присоединение N-ацетилгалактозамина (GalNAc) к серину (Ser) или треонину (Thr) в белковой цепи с помощью α -гликозидной связи. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный тип О-гликозилирования представляет собой присоединение N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) к остаткам Ser или Thr в белковой цепи. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанный тип О-гликозилирования представляет собой О-фукозилирование, О-маннозилирование, О-гликозилирование по положению 1 главной цепи, О-гликозилирование по положению 2 главной цепи или О-глюкозилирование. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанное О-гликозилирование представляет собой О-гликозилирование муцинового типа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанное О-гликозилирование включает О-связанные гликаны, присоединенные к атому кислорода гидроксильной группы боковых цепей серина, треонина, тирозина, гидроксизина или гидроксипролина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения О-гликозилирование сопровождается добавлением остатка галактозы и/или сиаловой кислоты, при этом, в других вариантах реализации, после О-гликозилирования к белку, представляющему интерес, добавляют по меньшей мере одну молекулу галактозы и/или по меньшей мере одну молекулу сиаловой кислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют приблизительно от 1 до 3 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют приблизительно от 1 до 3 молекул сиаловой кислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 1 до 5 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от

приблизительно 1 до 5 молекул сиаловой кислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 1 до 10 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 1 до 20 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 21 до 30 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 31 до 40 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 41 до 50 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 51 до 60 молекул галактозы.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 61 до 70 молекул галактозы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения добавляют от приблизительно 1 до 10 молекул сиаловой кислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения на каждую добавленную молекулу галактозы добавляют 2 молекулы сиаловой кислоты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения от приблизительно 1 до 5 молекул галактозы добавляют на каждый СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения от приблизительно 1 до 10 молекул сиаловой кислоты добавляют на каждый СТР. Согласно другому варианту реализации в целом от приблизительно 1 до 60 молекул галактозы и от приблизительно 1 до 120 молекул сиаловой кислоты добавляют на каждый СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения от одной до шести молекул галактозы добавляют на каждый СТР. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения от одной до двенадцати молекул сиаловой кислоты добавляют на каждый СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения от одной до шести молекул галактозы и от одной до двенадцати молекул сиаловой кислоты добавляют на каждый СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения тип гликозилирования, предложенный в настоящем описании, представляет собой N-гликозилирование. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения N-связанные гликаны присоединены к атому азота боковых цепей аспарагина или аргинина. N-связанная консенсусная аминокислотная последовательность представляет собой последовательность Asp-любая аминокислота-Set или Thr, при этом любая аминокислота не может быть пролином.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида или его фрагмента, включающий присоединение по меньшей мере одного негликозилированного карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина к N-концу или C-концу полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, при этом присоединение по меньшей мере одного СТР к указанному полипептиду или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента на величину, которая зависит от конкретного полипептида или его фрагмента, к которому присоединен пептид СТР, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента.

В одном варианте реализации настоящего изобретения гликозилированный СТР увеличивает гидродинамический объем белка, к которому он присоединен или с которым он гибризован. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения негликозилированный СТР увеличивает гидродинамический объем белка, к которому он присоединен или с которым он гибризован.

Согласно одному варианту реализации СТР-модифицированные белки, которые содержат гликаны в нативной части белка, обеспечивают большую величину приращения гидродинамического объема в расчете на одну копию гликозилированного пептида СТР, например, в примере 3 и табл. 5 настоящего описания показано, что СТР-модифицированные белки фактора IX и фактора VIIa, которые содержат гликаны в нативной части белка, обеспечивают большую величину приращения гидродинамического объема в расчете на одну копию гликозилированного СТР.

Специалист в данной области техники, руководствуясь описанием настоящего изобретения, сможет понять, что комбинации гликозилированных и негликозилированных пептидов СТР могут быть использованы для увеличения гидродинамического размера или объема полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании. Такие манипуляции могут быть осуществлены с целью увеличения гидродинамического объема полипептидов или их фрагментов до оптимального или желаемого уровня. Согласно одному варианту реализации такой оптимальный или желаемый уровень увеличения гидродинамического объема связан с повышенным временем удержания у субъекта, низкой скоростью клиренса из сыворотки крови субъекта и повышенной биологической активностью полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента. В одном варианте реализации настоящего изобретения от 1 до 5 гликозилированных пептидов СТР и от 1 до 5 негликозилированных пептидов СТР одновременно присоединены к полипептиду или его фрагменту, предложенному в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гликозилированные или негликозилированные пептиды СТР последовательно (тандемным образом) присоединены на N- или C-конце или случайным образом присоединены к обоим концам, N- и C-концу. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что дополнительные комбинации гликозилированных и негликозилированных пептидов СТР могут быть использованы и, следовательно, включены в объем настоящего изобретения. Согласно одному

варианту реализации термин "присоединенный" и его грамматические варианты относятся к связыванию одного белка, полипептида или пептида с другим белком, полипептидом или пептидом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения такое связывание относится к связыванию белка, полипептида или пептида, представляющего интерес, по меньшей мере с одним пептидом СТР, предложенным в настоящем изобретении. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения такое связывание относится к связыванию белка, полипептида или пептида, представляющего интерес, с 1-10 пептидами СТР, предложенными в настоящем описании. Такое связывание может быть осуществлено с помощью многочисленных способов, которые включают, но не ограничиваются ими, ковалентную связь, водородную связь, ионную связь, металлическую связь, полярную ковалентную связь, нековалентную связь (Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и т.д.), связывание за счет использования линкеров и т.п.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения гидродинамического размера или гидродинамического объема полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, включающий присоединение по меньшей мере одного негликозилированного карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина к N-концу или C-концу указанного полипептида или его фрагмента, при этом присоединение по меньшей мере одного СТР к указанному полипептиду или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента на величину, которая зависит от конкретного полипептида или его фрагмента, к которому присоединен пептид СТР, увеличивая, тем самым, гидродинамический размер или гидродинамический объем указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид СТР, предложенный в настоящем описании, дегликозилирован с использованием способов, известных в данной области техники, которые включают, но не ограничиваются ими, дегликозилирование под действием ферментов.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что термины "негликозилирование" и "дегликозилирование" и их грамматические варианты используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения биологической активности в условиях *in vivo*, увеличения периода полувыведения из сыворотки крови, увеличения биодоступности, увеличения эффективности или расширения площади под кривой (AUC) и т.д., как дополнительно предложено в настоящем описании, полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, причем способ включает этап гибридизации по меньшей мере одного гликозилированного пептида СТР с указанным полипептидом или его фрагментом, при этом гибридизация гликозилированного пептида СТР с указанным полипептидом или его фрагментом приводит к увеличению гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента по меньшей мере приблизительно на 28 кДа по сравнению с гидродинамическим объемом немодифицированного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид имеет более низкую биологическую активность в условиях *in vitro*, однако такая более низкая активность компенсируется увеличенным периодом полувыведения из сыворотки крови. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид имеет повышенную биологическую активность в условиях *in vitro*.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического объема полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании, снижает частоту введения указанного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического объема полипептида или его фрагмента также увеличивает кажущуюся молекулярную массу указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно одному варианту реализации кажущуюся молекулярную массу определяют с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, эксклюзионную хроматографию (SEC), методы динамического рассеяния света (ДРС), определение скорости седиментации, дифференциальное центрифугирование в условиях седиментационного равновесия и спектрофотометрическое детектирование. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения теоретическую молекулярную массу определяют с использованием программного обеспечения в области протеомных технологий, доступного в данной области техники. Такое программное обеспечение включает, но не ограничивается ими, портал ExPASy, ProteoIQ, Scaffold 3 и тому подобные. Согласно другому варианту реализации фактическую молекулярную массу определяют с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, MALDI-TOF.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения кажущейся молекулярной массы полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента по меньшей мере на 28 кДа. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения кажущейся молекулярной массы полипептида или его фрагмента приблизительно на 1-14 кДа, включающий присоединение по меньшей мере одного СТР к указанному полипептиду или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения кажущейся молекулярной массы полипептида или его фрагмента приблизительно на 15-27 кДа,

- 6 -

В другом варианте реализации согласно способам, предложенным в настоящем описании, по меньшей мере один СТР является гликозилированным. В другом варианте реализации согласно способам, предложенным в настоящем описании, по меньшей мере один СТР обеспечивает увеличение гидродинамического объема полипептида или его фрагмента, также предложенных в настоящем описании, на величину от приблизительно 28,3 до 38,7 кДа на каждую копию СТР. В другом варианте реализации гликозилированный СТР обеспечивает увеличение на величину от 28,3 до 38,7 кДа на каждую копию пептида СТР, независимо от того, с каким полипептидом или его фрагментом он связан (см. пример 3 в настоящем описании). В другом варианте гликозилированный СТР обеспечивает увеличение на величину от

28,3 до 38,7 кДа на каждую копию СТР, независимо от количества пептидов СТР, присоединенных к указанному полипептиду (см. пример 3 в настоящем описании). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вклад по меньшей мере одного СТР составляет по меньшей мере 20 кДа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вклад по меньшей мере одного СТР составляет по меньшей мере от приблизительно 20 до 27,9 кДа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вклад одного СТР составляет по меньшей мере 28 кДа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вклад одного СТР составляет от приблизительно 28 до 40 кДа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вклад одного СТР составляет от приблизительно 41 до 50 кДа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вклад одного СТР составляет от приблизительно 51 до 60 кДа.

Согласно другому варианту реализации способ увеличения периода полувыведения из сыворотки крови или повышения эффективности полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента включает увеличение гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента приблизительно на 84 кДа, по сравнению с немодифицированным полипептидом или его фрагментом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического объема приблизительно на 84 кДа соответствует полипептиду или его фрагменту, которые модифицированы путем присоединения к ним трех гликозилированных пептидов СТР, в соответствии со способами, предложенными в настоящем описании. В другом варианте реализации из трех гликозилированных СТР пептидов, присоединенных к полипептиду или его фрагменту, предложенному в настоящем описании, один гликозилированный пептид СТР присоединен к N-концу указанного полипептида или его фрагмента, в то время как два гликозилированных пептида СТР последовательно присоединены к C-концу указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно одному варианту реализации способ увеличения периода полувыведения из сыворотки крови или биологической активности полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента включает увеличение гидродинамического размера или объема указанного полипептида или его фрагмента приблизительно на 84-159 кДа по сравнению с немодифицированным полипептидом или его фрагментом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 56-110 кДа достигается путем присоединения двух гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 84-162 кДа достигается путем присоединения трех гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 112-230 кДа достигается путем присоединения четырех гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 140-280 кДа достигается путем присоединения пяти гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 168-330 кДа достигается путем присоединения шести гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 196-390 кДа достигается путем присоединения семи гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 224-425 кДа достигается путем присоединения восьми гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 252-480 кДа достигается путем присоединения девяти гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 280-330 кДа достигается путем присоединения десяти гликозилированных пептидов СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту.

Согласно одному варианту реализации способы, предложенные в настоящем описании, также включают присоединение негликозилированного СТР к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту. Следует понимать, что различные способы модификации полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента могут быть осуществлены с использованием гликозилированного и/или негликозилированного СТР. Согласно одному варианту реализации полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент модифицирован только по меньшей мере одним гликозилированным СТР, или только по меньшей мере одним негликозилированным СТР. Согласно другому варианту реализации полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент модифицирован по меньшей мере одним гликозилированным СТР и по меньшей мере одним негликозилированным СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения усеченные варианты гликозилированных и/или негликозилированных СТР

применяют в соответствии со способами, предложенными в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ повышения биологической активности, периода полувыведения из сыворотки крови, биодоступности, эффективности и т.д. полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента путем увеличения гидродинамического объема указанного полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента на конкретную величину, причем указанный способ включает присоединение по меньшей мере одного карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина к N-концу или С-концу указанного полипептида, при этом присоединение по меньшей мере одного негликозилированного пептида СТР к указанному полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту приводит к увеличению гидродинамического размера или гидродинамического объема указанного полипептида или его фрагмента, по сравнению с немодифицированной формой полипептида или его фрагмента, причем конкретная величина увеличения зависит от полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, к которому присоединен негликозилированный СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, в том случае, если к полипептиду, представляющему интерес, или его фрагменту присоединен по меньшей мере один негликозилированный СТР, величина увеличения кажущейся молекулярной массы или гидродинамического объема определяется типом полипептида, представляющего интерес, к которому присоединен негликозилированный СТР. Согласно другому варианту реализации, в том случае, если один негликозилированный СТР присоединен к СТГ человека, негликозилированный СТР обеспечивает увеличение гидродинамического размера или гидродинамического объема гормона роста человека (СТГ человека) приблизительно на 8 кДа. Согласно другому варианту реализации, в том случае, если один негликозилированный СТР присоединен к эритропоэтину (ЭПО), негликозилированный СТР обеспечивает увеличение гидродинамического размера или гидродинамического объема ЭПО приблизительно на 16 кДа. Согласно другому варианту реализации, в том случае, если один негликозилированный СТР присоединен к аполипопротеину-А1 (апо-А1), негликозилированный СТР обеспечивает увеличение гидродинамического размера или гидродинамического объема апо-А1 приблизительно на 21 кДа. Согласно другому варианту реализации в том случае, если один негликозилированный СТР присоединен к фактору IX, негликозилированный СТР обеспечивает увеличение гидродинамического размера или гидродинамического объема фактора IX приблизительно на 20 кДа. Согласно другому варианту реализации в том случае, если один негликозилированный СТР присоединен к фактору VIIa, негликозилированный СТР обеспечивает увеличение гидродинамического размера или гидродинамического объема фактора IX приблизительно на 20 кДа.

Согласно одному варианту реализации способ увеличения гидродинамического объема полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, предложенного в настоящем описании, повышает биодоступность указанного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации способ увеличения гидродинамического объема полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, предложенного в настоящем описании, снижает частоту дозирования полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента.

Согласно одному варианту реализации полипептид, который модифицирован с использованием способов, предложенных в настоящем описании, представляет собой цитокин, моноклональное антитело, фактор роста, гормон, цитокин, фактор свертывания крови, фермент и т.п.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, к которому присоединен по меньшей мере один пептид СТР, представляет собой эритропоэтин (ЭПО), гормон роста человека (СТГ человека), аполипопротеин А1 (апо-А1), фактор IIa, фактор IX или окситомодулин (ОХМ). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один негликозилированный СТР обеспечивает увеличение приблизительно на 16 кДа для ЭПО. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один негликозилированный СТР обеспечивает увеличение кажущейся молекулярной массы ЭПО приблизительно на 16 кДа, если он присоединен к ЭПО. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один негликозилированный СТР обеспечивает увеличение приблизительно на 8 кДа для СТГ человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один негликозилированный СТР обеспечивает увеличение кажущейся молекулярной массы СТГ человека приблизительно на 8 кДа, если он присоединен к СТГ человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один негликозилированный СТР обеспечивает увеличение приблизительно на 21 кДа для апо-А1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один негликозилированный СТР обеспечивает увеличение кажущейся молекулярной массы апо-А1 приблизительно на 21 кДа, если он присоединен к апо-А1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения негликозилированный СТР обеспечивает различную величину гидродинамического объема для каждого полипептида, с которым связан негликозилированный СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения это различие зависит от полипептида или его фрагмента, с которым связан негликозилированный СТР (см. пример 3 в настоящем описании). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения негликозилированный СТР неожиданно обеспечивает одну и ту же величину увеличения гидродинамического размера на каждую копию пептида СТР на каждом конкретном полипептиде, независимо от количества негликозилированных пептидов СТР, присоединенных к данному полипеп-

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ увеличения периода полувыведения из сыворотки крови или биологической активности фактора VIIa, включающий этап увеличения гидродинамического размера или объема указанного полипептида или его фрагмента приблизительно на 43-50 кДа по сравнению с немодифицированным фактором VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 86-100 кДа достигается путем присоединения двух гликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 129-150 кДа достигается путем присоединения трех гликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 172-200 кДа достигается путем присоединения четырех гликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 215-250 кДа достигается путем присоединения пяти гликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 258-300 кДа достигается путем присоединения шести гликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 301-350 кДа достигается путем присоединения семи гликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 344-400 кДа достигается путем присоединения восьми гликозилированных

достигается путем присоединения девяти негликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического размера или объема приблизительно на 200 кДа достигается путем присоединения десяти негликозилированных пептидов СТР к фактору VIIa. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения повышение гидродинамического объема увеличивает время удержания белка, представляющего интерес, в биологическом образце. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения повышение гидродинамического объема увеличивает площадь под кривой (AUC) белка, представляющего интерес, в биологическом образце. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биологический образец представляет собой кровь, ткани-мишени (например, сустав, ЦНС), спинномозговую жидкость (СМЖ), лимфу или сыворотку крови.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического объема увеличивает биодоступность полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического объема полипептида также продлевает период полувыведения из сыворотки крови указанного полипептида или его фрагмента.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения увеличение гидродинамического объема увеличивает биологическую активность полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в настоящем описании термины "пептид СТР", "карбоксиконцевой пептид" и "последовательность СТР" используются взаимозаменяемо. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения карбоксиконцевой пептид представляет собой полноразмерный СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения карбоксиконцевой пептид представляет собой усеченный СТР. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения сигнальный пептид присоединен к аминоконцу СТР, как описано в патенте США № 7553940, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере один СТР присоединен к полипептиду посредством линкера. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения линкер представляет собой пептидную связь.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гибридный белок образует СТР-модифицированный полипептид. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ увеличения гидродинамического объема полипептидов или их фрагментов включает гибридизацию полипептидов или их фрагментов по меньшей мере с одним пептидом СТР на amino- или карбоксиконце указанных полипептидов или их фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР подвергают рекомбинантной гибридизации с полипептидами или их фрагментами. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР подвергают химической конъюгации с полипептидами или их фрагментами.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид содержит пептид, который содержит менее 50 аминокислот и по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид хорионического гонадотропина, присоединенный к N-(амино) или C-(карбокси) концу пептида. В одном варианте реализации настоящего изобретения модифицированные полипептиды, представляющие интерес, согласно настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один СТР, присоединенный к их N-концу и/или C-концу, являются, по меньшей мере, эквивалентными полипептидам, представляющим интерес, которые не модифицированы СТР, в отношении величины биологической активности. В других вариантах реализации настоящего изобретения модифицированные полипептиды, представляющие интерес, согласно настоящему изобретению, которые содержат по меньшей мере один СТР, присоединенный к N-концу и/или C-концу, являются, по меньшей мере, эквивалентными полипептидам, представляющим интерес, которые не модифицированы СТР, в отношении фармакологических параметров, таких как фармакокинетика и фармакодинамика. Согласно одному варианту реализации последовательность СТР, предложенная в настоящем изобретении, содержит DPRFQDSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 1). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР содержит SSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В еще одном варианте реализации последовательность СТР выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В одном варианте реализации настоящего изобретения карбоксиконцевой пептид (СТР) согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, начиная от аминокислоты в положении 112 до аминокислоты в положении 145 хорионического гонадотропина человека. В другом варианте реализации настоящего изобретения последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, начиная от аминокислоты в положении 118 до аминокислоты в положении 145 хорионического гонадо-

[illegible]

- 15 -

ского гонадотропина не являются гликозилированными.

В одном варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит два сайта гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит три сайта гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит четыре сайта гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит пять сайтов гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит шесть сайтов гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит семь сайтов гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит восемь сайтов гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит от одного до четырех сайтов гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит от четырех до девяти сайтов гликозилирования. В другом варианте реализации гликозилированная последовательность СТР согласно настоящему изобретению содержит от шести до двенадцати сайтов гликозилирования.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина полностью гликозилирована. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина частично гликозилирована. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения частично гликозилированный означает, что по меньшей мере один из сайтов гликозилирования СТР является гликозилированным. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения сайты гликозилирования представляют собой сайты О-гликозилирования. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения сайты гликозилирования представляют собой сайты N-гликозилирования.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модификация последовательности СТР является предпочтительной, обеспечивая использование более низких дозировок, в случае присоединения к полипептиду, лекарственному препарату или агенту, представляющему интерес. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модификация последовательностей СТР является предпочтительной, обеспечивая использование меньшего числа дозировок полипептида, лекарственного препарата или агента, представляющего интерес. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модификация последовательности СТР является предпочтительной, обеспечивая безопасное пролонгированное действие, при введении СТР-модифицированного полипептида, лекарственного средства или агента, представляющего интерес.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модификации полипептидов, представляющих интерес, и пептидов СТР согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, С-концевые модификации, модификации полипептидной связи, включая, но не ограничиваясь ими, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH или CF=CH , модификации главной цепи и модификации остатка. Способы получения соединений пептидомиметиков хорошо известны в данной области техники и приведены, например, в руководстве Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), которое включено в настоящее описание посредством ссылки, как если бы оно было полностью изложено в настоящем описании. Дополнительные подробности, касающиеся таких способов, приведены в настоящем описании ниже.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи (-CO-NH-) в полипептиде являются замещенными. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены N-метилованными связями ($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены эфирными связями ($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены кетометиленовыми связями ($\text{-CO-CH}_2\text{-}$). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены α -азасвязями (-NH-N(R)-CO-), где R представляет собой любой алкил, например метил, и карбосвязями ($\text{-CH}_2\text{-NH-}$). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены гидроксипропиленовыми связями ($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены тиамидами (-CS-NH-). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены олефиновыми двойными связями (-CH=CH-). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены "ретро" амидными связями (-NH-CO-). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептидные связи замещены полипептидными производными ($\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$), где R представляет собой "линейную" боковую цепь, присутствующую на атоме углерода в природе. Согласно другому варианту реализации на-

стоящего изобретения эти модификации присутствуют в любой из связей на всем протяжении полипептидной цепи и в одном варианте в нескольких (2-3 связях) одновременно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения природные ароматические аминокислоты полипептида, такие как Trp, Tyr и Phe, замещены синтетическими неприродными аминокислотами, такими как фенилглицин, ТИС, нафтилаланин (Nol), метилированными в кольце производными Phe, галогенированными производными Phe или О-метил-Тур. В другом варианте реализации полипептиды согласно настоящему изобретению содержат одну или более модифицированных аминокислот или один или более неаминокислотных мономеров (например, жирную кислоту, сложные углеводы и т.д.).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения следует понимать, что "аминокислота" или "аминокислотная последовательность" включает 20 природных аминокислот; эти аминокислоты обычно подвергаются посттрансляционным модификациям в условиях *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; и другие необычные аминокислоты, включая, но не ограничиваясь ими, 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "аминокислота" включает D- и L-аминокислоты.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированные полипептиды или пептиды согласно настоящему изобретению синтезированы с использованием биохимических методов, например, с использованием стандартных твердофазных методик. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения такие биохимические методы включают полностью твердофазный синтез, частичный твердофазный синтез, конденсацию фрагментов или классический синтез в растворе.

В одном варианте методики получения рекомбинантных белков можно использовать для создания модифицированных полипептидов, представляющих интерес, или их фрагментов согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения рекомбинантные методики описаны в работах Bitter et al., (1987), *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990), *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984), *Nature*, 310:511-514, Takamatsu et al. (1987), *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984), *EMBO J.* 3:1671-1680 и Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 и Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент содержит пептид, который содержит менее 50 аминокислот и по меньшей мере один гликозилированный и/или негликозилированный карбоксиконцевой пептид хорионического гонадотропина, присоединенный к N- или С-концу указанного полипептида. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, содержит пептид, который содержит менее 40 аминокислот и по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид хорионического гонадотропина, присоединенный к N- или С-концу указанного полипептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, содержит пептид, который содержит менее 30, 20 или 10 аминокислот. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, содержащий менее 50 аминокислот, включает пептиды, предложенные в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид, содержащий менее 50 аминокислот, представляет собой СТГ человека, ОХМ, ЭПО, апополипротеин А1 (апо-А1), интерферон, цитокин или фактор свертывания крови.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой ЭПО. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой АРО. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой фактор VIIa. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой фактор IX. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой интерферон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой СТГ человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой ОХМ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой GLP-1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой инсулин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент,

предложенный в настоящем описании, представляет собой энкефалин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой АКТГ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой глюкагон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой инсулиноподобный фактор роста. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой эпидермальный фактор роста. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой кислый или основной фактор роста фибробластов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой тромбоцитарный фактор роста. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой гранулоцитарный-КСФ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой макрофагальный-КСФ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой ИЛ-2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой ИЛ-3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой фактор некроза опухоли. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой гонадотропин-рилизинг гормон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой аналог РФЛГ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой соматостатин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой фактор, высвобождающий гормон роста (рилизинг фактор гормона роста). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой эндорфин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой альвеолярный белок сурфактанта. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой натрийуретический фактор. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой адгезии. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой ангиостатин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой эндостатин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой рецепторный пептид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой лиганд, связывающийся с рецептором. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой антитело. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой фрагмент антитела. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой пептид или белок, включая любую модифицированную форму.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент дополнительно содержит по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР, присоединенный на N-конце, и/или один аминокислотный пептид СТР, присоединенный на С-конце. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент выбран из следующего списка: инсулин, альбумин/альбумин, активиза, альтеплаза/тканевой активатор плазминогена, аденозиндезаминаза, иммуноглобулин, глюкоцереброзидаза, лейкокин-сарграмостим/ГМ-КСФ, Г-КСФ, веноглобулин-S/IgG, пролейкин (альдеслейкин), ДНКаз, фактор VIII, геликат, L-аспарагиназа, WinRho® SDF резус I, ретаваза, ретаплаза/ТАП, фактор IX, ФСГ, глобулин, фибрин, интерлейкин-11, бекаплермин/тромбоцитарный фактор роста, лепирудин/герудин, ФНО,

тимоглобулин, фактор VIIa, интерферон альфа-2a, интерферон альфа-N1, интерферон альфа-N3, интерферон бета-1b, интерферон гамма-1b, ИЛ-2, гормон роста человека или моноклональные антитела.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, дополнительно содержит сигнальный пептид. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент представляет собой гормон роста. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста дополнительно содержит сигнальный пептид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, после экспрессии и секреции, сигнальный пептид отщепляется от модифицированных пептидов/полипептидов-предшественников, что приводит к получению зрелых модифицированных пептидов/полипептидов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения сигнальные последовательности, включают, но не ограничиваются ими, эндогенные сигнальные последовательности.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептиды и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают гормон роста, дополнительно имеющий сигнальный пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 4).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированные или конъюгированные гормоны роста согласно настоящему изобретению применяют в соответствии со способом, который аналогичен таковому для немодифицированных гормонов роста. В другом варианте реализации настоящего изобретения конъюгированные гормоны роста согласно настоящему изобретению имеют увеличенный период полувыведения из сыворотки крови и время удержания в плазме, сниженный клиренс и увеличенную клиническую активность в условиях *in vivo*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, в связи с улучшенными свойствами конъюгированных гормонов роста, описанных в настоящем описании, такие конъюгаты вводят с меньшей частотой, чем немодифицированные гормоны роста. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгированные гормоны роста, описанные в настоящем описании, вводят с частотой от одного раза в неделю до одного раза в две недели. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгированные гормоны роста, описанные в настоящем описании, вводят с частотой от одного раза каждые две недели до одного раза каждые три недели. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгированные гормоны роста, описанные в настоящем описании, вводят с частотой от одного раза в сутки до трех раз в неделю. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение частоты введения приведет к улучшению приверженности пациента схеме лечения, что в свою очередь улучшает результаты лечения, а также улучшает качество жизни пациентов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения было установлено, что, по сравнению с обычными конъюгатами СТГ, связанными с полиэтиленгликолем, конъюгаты гормона роста и СТР, имеющие молекулярную массу и структуру линкера, аналогичную таковой для конъюгатов согласно настоящему изобретению, имеют улучшенную эффективность, улучшенную стабильность, повышенную площадь под кривой (AUC) и увеличенный период полувыведения из циркуляции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения было установлено, что, по сравнению с обычными конъюгатами СТГ, связанными с полиэтиленгликолем, гормоны роста, имеющие молекулярную массу и структуру линкера, аналогичную таковой для конъюгатов согласно настоящему изобретению, имеют улучшенную эффективность, улучшенную стабильность, повышенные уровни AUC, увеличенный период полувыведения из циркуляции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения было установлено, что, по сравнению с обычными конъюгатами СТГ, связанными с полиэтиленгликолем, гормоны роста, имеющие оптимальный гидродинамический объем конъюгатов согласно настоящему изобретению, имеют улучшенную эффективность, улучшенную стабильность, повышенные уровни AUC, увеличенный период полувыведения из циркуляции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество конъюгированного СТГ представляет собой количество конъюгата, необходимое для получения измеримого, ожидаемого уровня биологической активности в условиях *in vivo*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста, использованный в соответствии с принципами настоящего изобретения, проявляет повышенную эффективность. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения присоединение последовательностей СТР к N- и C-концам СТГ приводит к пролонгированной активности в условиях *in vivo*.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста представляет собой любой гормон роста, известный специалисту в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста представляет собой гормон роста человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нуклеотидная последовательность и/или аминокислотная последовательность СТГ доступна в базе данных банка генов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста является гомологом СТГ, предложенного в настоящем описании, и/или СТГ, представленного в базе данных банка генов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гомолог также относится к его варианту, содержащему удаление, вставку или замену, включая замену аминокислоты, и его биологически активным полипептидным фрагментам. Со-

гласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста представляет собой вариант СТГ человека, не имеющий экзонов 2, 3, 4 или любой их комбинации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста содержит сигнальный пептид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста содержит сайт отщепления сигнальной последовательности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептиды, содержащие СТГ, модифицированный пептидами СТР согласно настоящему изобретению, включают рекомбинантный СТГ.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста, описанный в настоящем документе, является членом суперсемейства цитокинов, сходных с гормоном роста (ГР). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста, описанный в настоящем документе, представляет собой гормон роста человека (СТГ человека). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста человека содержит следующую аминокислотную последовательность (номер доступа в GenBank P01241):

MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE
AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

(SEQ ID NO: 5).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста человека содержит следующую аминокислотную последовательность:

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIP
PSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG
QTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRI
VQCRSVEGSCGF

(SEQ ID NO: 6).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста человека содержит следующую аминокислотную последовательность:

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA (SEQ ID NO: 7).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТГ человека содержит следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE
AYIPKVQKYSFLQNPQTSLCFSESIPSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

(SEQ ID NO: 8).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТГ человека представляет собой замещенный вариант, в котором глутамин в положении 65 СТГ человека замещен валином.

Согласно другому варианту реализации гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов AAA72260. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов AAK69708. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов CAA01435. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов CAA01329. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов CAA00380. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов AAA72555. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов NP 000506.2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов NP 072053.1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов NP 072054.1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов NP 072055.1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с регистрационным номером в банке генов NP 072056.1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, описанный в настоящем документе, кодирует любую аминокислотную последовательность СТГ, известную специалисту в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, описанный в настоящем документе, кодирует СТГ человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, содержит нуклеотидную последовательность с регистрационным номером в банке генов NM 000515.3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, содержит нуклеотидную последовательность с регистрационным номером в банке генов NM 022559.2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, содержит нуклеотидную последовательность с регистрационным номером в банке генов NM 022560.2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, содержит нуклеотидную последовательность с регистрационным номером в банке генов NM 022561.2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гормон роста, содержит нуклеотидную последовательность с регистрационным номером в банке генов NM 022562.2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий гормон роста согласно настоящему изобретению, содержит один СТР, присоединенный к С-концу СТГ (СТГ человека-СТР), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE
 AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSEIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
 VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLDGSPTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
 ALLKNYGLLYCFRKDMKDVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTP
 ILPQ

(SEQ ID NO: 9).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий гормон роста согласно настоящему изобретению, содержит два последовательно расположенных СТР, присоединенных к С-концу СТГ (СТГ человека-СТР-СТР), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEE
 AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSEIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
 VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLDGSPTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
 ALLKNYGLLYCFRKDMKDVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTP
 ILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ

(SEQ ID NO: 10).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий гормон роста согласно настоящему изобретению, содержит два последовательно расположенных СТР, присоединенных к С-концу СТГ, и один СТР, присоединенный к N-концу СТГ (СТР-СТГ человека-СТР-СТР), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSR
 FDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSEIPTSPNREETQQ
 KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRL
 DGSPTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMKDVETFLRIVQCRSVEGS
 CGFSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ

(SEQ ID NO: 11).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий гормон роста согласно настоящему изобретению, содержит два последовательно расположенных СТР, присоединенных к С-концу СТГ, при этом один из двух СТР является усеченным СТР и один дополнительный СТР присоединен к N-концу гормона роста (уСТР-СТГ человека-СТР-СТР) и имеет следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFLGCLLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQL
AFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQS
WLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLDGSPRTGQIFKQTY
KFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 12).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий гормон роста согласно настоящему изобретению, содержит один СТР, присоединенный к С-концу СТГ, и один СТР, присоединенный к N-концу СТГ (СТР-СТГ человека-СТР), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFLGCLLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ
KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRL
DGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMKVETFLRIVQCRSVEGS
CGFSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 13).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий гормон роста и один СТР, содержит следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFLGCLLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ
KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRL
DGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMKVETFLRIVQCRSVEGS
CGF
(SEQ ID NO: 14).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий СТР-СТГ человека-СТР, содержит следующую нуклеотидную последовательность:

tctagagacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggaggcagcgcca
gctcttcttctaaggctccaccccatctctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccagtccccac
catccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagtgcagga
agcctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccagacctccctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaa
cagagaggagaccagcagaaggaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcc
tgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatcca
gacctgatggggcggctggaggacggcagccccaggaccggccagatctcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccac
aacgacgacgcctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcag
tgcagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcagaaggccccccccgagcctgccctcccaagcaggctgcctgggc
cctccgacacaccaatctgcctcagtgatgaaggctggatgcggccgc
(SEQ ID NO: 15).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула полинуклеотида, кодирующая полипептид, содержащий СТР-СТГ человека-СТР-СТР, содержит следующую нуклеотидную последовательность:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttctaaggctccacccccctctgctccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccatttgcctccagttccccac
catccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgagga
agcctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccagacctccctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaa
cagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcc
tgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatcca
gacctgatggggcggctggaggacggcagccccaggaccggccagatcttcaagcagacctacagcaagttcgaccaacagccac
aacgacgacgcctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcag
tgagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcagcaagggccccctccccgagcctgccctccccaaagcaggctgcctgggc
cctccgacacaccaatcctgccacagagcagctccttaaggccccctcctccatccctgccatccccctccggctgcctggccccctctgac
accctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc

(SEQ ID NO: 16).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекула полинуклеотида, кодирующая полипептид, содержащий СТР-СТГ человека-СТР-СТР, содержит следующую нуклеотидную последовательность:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttctaaggctccacccccgagcctgcccttccccacatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacagg
ctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatccccaaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccag
acctcctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaacagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctc
cctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaa
cgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagacctgatggggcggctggaggacggcagccccaggaccggccagat
cttcaagcagacctacagcaagttcgaccaacagccacaacgacgacgccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaa
ggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcagtgacagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcagaagggc
cctccccgagcctgccctccccaaagcaggctgcctgggccccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctccttaaggccccctcct
ccatccctgccatccccctccggctgcctggcccccttgacaccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc

(SEQ ID NO: 17).

В другом варианте реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению является гомологичным известной последовательности СТГ. В другом варианте реализации настоящего изобретения гормон роста согласно настоящему изобретению является гомологичным последовательности СТГ, раскрытой в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гомолог в соответствии с настоящим изобретением включает также его варианты, содержащие удаления, вставки или замены, включая замену аминокислоты, и его биологически активные полипептидные фрагменты. В одном варианте замещенный вариант представляет собой вариант, в котором глутамин в положении 65 СТГ человека замещен валином [Gellerfors et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 1989, 7:173-83].

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения выражение "гормон роста человека" (соматотропный гормон, СТГ человека) относится к полипептиду, например, приведенному под регистрационным номером в GenBank P01241, который проявляет активность СТГ человека (т.е. стимуляцию роста). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "гормон роста человека" (СТГ человека) относится к полипептиду, например, приведенному под регистрационным номером в GenBank P01241, который проявляет активность СТГ человека (т.е. стимуляцию роста). В одном варианте реализации настоящего изобретения СТГ человека согласно настоящему изобретению также относится к гомологам. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность СТГ человека согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 50% гомологична последовательности СТГ человека, приведенной под регистрационным номером в GenBank P01241, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность СТГ человека согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 60% гомологична последовательности СТГ человека, приведенной под регистрационным номером в GenBank P01241, согласно результатам определения с помо-

стью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность СТГ человека согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична последовательности СТГ человека, приведенной под регистрационным номером в GenBank P01241, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность СТГ человека согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична последовательности СТГ человека, приведенной под регистрационным номером в GenBank P01241, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность СТГ человека согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична последовательности СТГ человека, приведенной под регистрационным номером в GenBank P01241, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность СТГ человека согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична последовательности СТГ человека, приведенной под регистрационным номером в GenBank P01241, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения пептид, представляющий интерес, предложенный в настоящем описании, представляет собой оксинтомодулин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения оксинтомодулин (OXM) содержит следующую аминокислотную (AA) последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNNIA (SEQ ID NO: 18). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения OXM содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения OXM содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной в CAS № 62340-29-8.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин оксинтомодулин дополнительно включает гомолог известного оксинтомодулина.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гомолог представляет собой функциональный гомолог. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "функциональный" относится к способности гомолога, полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании, подавлять аппетит. Термин также относится к способности гомолога, полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании, продлевать период полувыведения из сыворотки крови другого белка или пептида. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биологический период полувыведения ($T_{1/2}$) белка, пептида или гомолога, предложенного в настоящем описании, относится к времени, которое требуется для расщепления или исчезновения половины количества белка, пептида или гомолога в биологической среде у субъекта. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биологическая среда представляет собой сыворотку, спинномозговую жидкость, ткань, слизистую оболочку и т.п.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения OXM представляет собой OXM человека или OXM любого млекопитающего. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения OXM также упоминается как глюкагон-37 или биоактивный энтероглюкагон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения OXM представляет собой двойной полипептид или его фрагменты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения OXM представляет собой биологически активный фрагмент OXM. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биологически активный OXM расположен, начиная от аминокислоты 30 до аминокислоты 37 в последовательности SEQ ID NO: 18. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения биологически активный OXM расположен, начиная от аминокислоты 19 до аминокислоты 37 в последовательности SEQ ID NO: 18. В другом варианте реализации OXM согласно настоящему изобретению соответствует октапептиду, у которого были удалены две С-концевые аминокислоты. В другом варианте реализации настоящего изобретения OXM согласно настоящему изобретению соответствует любому фрагменту SEQ ID NO: 18, который сохраняет активность OXM, описанную в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение также включает гомологи, например, полипептиды, которые по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичны оксинтомодулину, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической инфор-

мации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию.

В других вариантах реализации термин "модифицированный оксинтомодулин" относится к аминокислотной последовательности зрелого оксинтомодулина. В других вариантах реализации термин "модифицированный оксинтомодулин" относится к аминокислотной последовательности оксинтомодулина, включая его сигнальную последовательность или сигнальный пептид.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, включают сигнальный пептид или сигнальную последовательность.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термины "сигнальная последовательность" и "сигнальный пептид" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения "последовательность", при ссылке на полинуклеотидную молекулу, может относиться к кодирующей части. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В одном варианте полипептид или пептид, представляющий интерес, предложенный в настоящем описании, представляет собой эритропоэтин (ЭПО). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "эритропоэтин" относится к эритропоэтину млекопитающих. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "эритропоэтин" относится к эритропоэтину человека, например, приведенному под регистрационным номером в GenBank AAA52400.

В одном варианте эритропоэтин или последовательность ЭПО согласно настоящему изобретению также относится к гомологам. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность эритропоэтина согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 50% гомологична последовательности эритропоэтина, приведенной под регистрационным номером в GenBank AAA52400, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность эритропоэтина согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 60% гомологична последовательности эритропоэтина, приведенной под регистрационным номером в GenBank AAA52400, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность эритропоэтина согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична последовательности эритропоэтина, приведенной под регистрационным номером в GenBank AAA52400, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность эритропоэтина согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична последовательности эритропоэтина, приведенной под регистрационным номером в GenBank AAA52400, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность эритропоэтина согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична последовательности эритропоэтина, приведенной под регистрационным номером в GenBank AAA52400, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность эритропоэтина согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична последовательности эритропоэтина, приведенной под регистрационным номером в GenBank AAA52400, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 19, дополнительно содержащий по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один дополнительный аминокислотный пептид СТР на С-конце. В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 19:

```
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPRLICDSRVLYLLEAKEAENITTGCAEH
CSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWE
PLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFL
RGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 19).
```

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид ЭПО дополнительно содержит по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один допол-

нительный аминокислотный пептид СТР на С-конце для лечения анемии. В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 20, дополнительно содержащий по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAEENITTGCAEH
CSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWE
PLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFL
RGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLSPSRLP
GPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 20).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 21, дополнительно содержащий по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLIC
DSRVLERYLLEAKEAEENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVW
QGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPD
AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLSPSRLP
GPSDTPILPQSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 21).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 22, дополнительно содержащий по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAEENITTGCAEH
CSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWE
PLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFL
RGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLL
EAKEAEENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAV
LRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTIT
ADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR
(SEQ ID NO: 22).

Согласно другому варианту реализации способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 23, который дополнительно содержит по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLIC
DSRVLERYLLEAKEAEENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVW
QGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPD
AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR
(SEQ ID NO: 23).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 24, который дополнительно содержит по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLIC
DSRVLERYLLEAKEAEENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVW
QGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPD
AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLSPSRLP
GPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 24).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 25, который дополнительно содержит по мень-

шей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH
CSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWE
PLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFL
RGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO: 25).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают нуклеиновую кислоту, приведенную в SEQ ID NO: 26, кодирующую пептид ЭПО, один аминокислотный пептид СТР на N-конце и два аминокислотных пептида СТР на С-конце:

tctagaggc atcatggggg tgcacgaatg tctgcctgg
ctgtggcttc tctgtcccttc tctgtctc cctctgggccc tcccagctct gggtcctct tctcaaagg cccctcccc gagccttcca
agtccatccc gactcccgagg gccctcggac accccaatat taccacaagc cccaccacgc ctcactgtg acagccgagt
cctggagagg tacctcttg aggccaagga ggccgagaat atcacgacgg gctgtcgtga acatgcagc ttgaatgaga
atatcactgt cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gagtcgggc agcaggccgt agaagtctgg
cagggcctgg cctgtctgc ggaagctgc ctgcggggcc aggcctgtt ggtaactct tcccagccgt gggagccct
gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtg ccttcgcagc ctcaccactc tcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag
ccatctccc tccagatgag gccctcagtg ctcactccg aacaatcact gctgacact tccgaaact cttccgagtc tactccaatt
tctccgggg aaagtgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacagg gacagatcct ctctctaaa ggccctccc
ccgagccttc caagtcac cgcactccg ggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct
ctaaggccctctccatcc ctgcatccc cctcccggt gcctggccc tctgacccc ctactctgcc tcagtgatga
aggtctctg gatccgggc cgc
(SEQ ID NO: 26).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают аминокислотную последовательность, содержащую пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 66, содержащий два аминокислотных пептида СТР на N-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPSLPSPSRPSPDTPILPQSSSSKAP
PPSLPSPSRPSPDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP
DTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKA
VSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTG
EACRTGDR
(SEQ ID NO: 66).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 67, кодирующую пептид ЭПО и два аминокислотных пептида СТР на N-конце:

ATGGGCGTGACGAGTGTCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGAGCCTGCTGTCCCTG
CCTCTGGGCTGCTGTGCTGGGCAGCAGCTCTAAGGCCCTCCACCCAGCCTG
CCCAGCCCTTCTAGACTGCCTGGCCCCAGCGACACCCCATCCTGCCTCAGAGCAGC
AGCAGCAAGGCCCAACCACCATCCCTGCCTAGCCCCAGCAGCTGCCAGGCCCTTCC
GATACCCCAATCCTGCCCCAGGCCCTCCAGACTGATCTGCGACAGCCGGGTGCTG
GAAAGATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCAACGGCTGCGCCGA
GCACTGCAGCCTGAACGAGAATATCACCGTGCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACG
CCTGGAAGCGGATGGAAGTGGGCCAGCAGGCCGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGC
CCTGCTGAGCGAGGCCGTGCTGAGAGGACAGGCCCTGCTGGTGAACAGCAGCCAGC
CCTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAGGCCGTGTCGGCCTGCGGAGCCTG
ACCACACTGCTGAGAGCCCTGGGCGCTCAGAAAGAGGCCATCTCTCCCCCTGATGCC
GCCTCTGCCGCCCTCTGAGAACCATCACCGCCGACACCTCCGGAAGCTGTTCCGG
GTGTACAGCAACTTCTGCGGGCAAGCTGAAGCTGTACACCGCGCAGGCCTGCCG
GACCGGCGATAGATAAGCTTGGCGCGCC
(SEQ ID NO: 67).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают пептид ЭПО, приведенный в SEQ ID NO: 68, содержащий два аминокислотных пептида

СТР на N-конце и два аминокислотных пептида СТР на С-конце:

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAP
PPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP
DTKVNIFYAWKRMEVGQQAQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKA
VSGLRSLTTLRALGAQKEAISPDAASAAPLRITTTADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTG
EACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 68).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 69, кодирующую пептид ЭПО, два аминокислотных пептида СТР на N-конце и два аминокислотных пептида СТР на С-конце:

ATGGGCGTGCACGAGTGTCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGAGCCTGCTGTCCCTG
CCTCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGCAGCAGCAGCTCTAAGGCCCTCCACCCAGCCTG
CCCAGCCCTTCTAGACTGCCTGGCCCCAGCGACACCCCATCCTGCCTCAGAGCAGC
AGCAGCAAGGCCCCACCACCATCCCTGCCTAGCCCCAGCAGACTGCCAGGCCCTTCC
GATACCCCAATCCTGCCCCAGGCCCTCCCAGACTGATCTGCGACAGCCGGGTGCTG
GAAAGATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGA
GCACTGCAGCCTGAACGAGAATATCACCGTGCCCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACG
CCTGGAAGCGGATGGAAGTGGGCCAGCAGGCCGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGC
CCTGCTGAGCGAGGCCGTGCTGAGAGGACAGGCCCTGCTGGTGAACAGCAGCCAGC
CCTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAGGCCGTGTCCGGCCTGCGGAGCCTG
ACCACACTGCTGAGAGCCCTGGGCGCTCAGAAAGAGGCCATCTCTCCCCCTGATGCC
GCCTCTGCCGCCCTCTGAGAACCATCACCGCCGACACCTTCCGGAAGCTGTTCCGG
GTGTACAGCAACTTCTGCGGGCAAGCTGAAGCTGTACACCGGCGAGGCCTGCCG
GACCGGCGATAGAAGCAGCTCCAGCAAGGCTCCACCCCCAGCCTGCCATCCCCAA
GTAGACTGCCCCGGGCCCTCTGACACACCTATCCTGCCACAGTCCAGCAGCTCCAAAG
CTCCCCACCATCCCTCCCATCCCCATCCAGACTGCCTGGACCATCCGACACTCCAA
TTCTGCCTCAGTAAGCTTGGCGCGCC
(SEQ ID NO: 69).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "интерферон" относится к полипептиду интерферона I типа млекопитающих. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "интерферон" относится к полипептиду интерферона II типа млекопитающих. В некоторых вариантах реализации используются дополнительные пригодные полипептиды интерферона, известные специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах реализации интерферон представляет собой альфа-интерферон. В некоторых вариантах реализации интерферон представляет собой бета-интерферон. В некоторых вариантах реализации интерферон представляет собой гамма-интерферон. В некоторых вариантах реализации интерферон представляет собой омега-интерферон. В некоторых вариантах реализации интерферон представляет собой подвид интерферона. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения подвид интерферона (ИФН) представляет собой ИФН- α 2a. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения подвид интерферона представляет собой ИФН- α 2b. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения подвид интерферона (ИФН) представляет собой ИФН- β 1a. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения подвид интерферона представляет собой ИФН- β 1b.

В одном варианте реализации настоящего изобретения интерферон согласно настоящему изобретению проявляет характерную для интерферона активность, такую как противовирусная и антипролиферативная активность. В некоторых вариантах реализации регистрационные номера в GenBank неограничивающих примеров интерферонов приведены в табл. 1.

В одном варианте реализации настоящего изобретения интерферон согласно настоящему изобретению также относится к гомологам. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность интерферона согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 50% гомологична последовательностям интерферона, перечисленным в табл. 1, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность интерферона согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 60% гомологична последовательностям интерферонов, перечисленным в табл. 1, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехно-

логической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность интерферона согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична последовательностям интерферонов, перечисленным в табл. 1, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность интерферона согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична последовательностям интерферонов, перечисленным в табл. 1, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность интерферона согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична последовательностям интерферонов, перечисленным в табл. 1, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность интерферона согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична последовательностям интерферонов, перечисленным в табл. 1, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В некоторых вариантах реализации гомолог в соответствии с настоящим изобретением включает также его варианты, содержащие удаления, вставки или замены, включая замену аминокислоты, и его биологически активные полипептидные фрагменты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения цистеин в положении 17 интерферона β замещен серином.

В табл. 1 перечислены примеры интерферонов с соответствующими номерами последовательностей в базе NCBI

Таблица 1

<i>Название интерферона</i>	<i>Номер последовательности в базе NCBI</i>
Интерферон, $\alpha 1$	NP_076918.1
Интерферон, $\alpha 10$	NP_002162.1
Интерферон, $\alpha 13$	NP_008831.2
Интерферон, $\alpha 14$	NP_002163.1
Интерферон, $\alpha 16$	NP_002164.1
Интерферон, $\alpha 17$	NP_067091.1
Интерферон, $\alpha 2$	NP_000596.2
Интерферон, $\alpha 21$	NP_002166.1
Интерферон, $\alpha 4$	NP_066546.1
Интерферон, $\alpha 5$	NP_002160.1
Интерферон, $\alpha 6$	NP_066282.1
Интерферон, $\alpha 7$	NP_066401.2
Интерферон, $\alpha 8$	NP_002161.2
Интерферон-бета, предшественник	NP_002167.1
Интерферон, $\epsilon 1$	NP_795372.1
Интерферон, γ	NP_000610.2
Интерферон, ϵ	NP_064509.1
Интерферон, $\Omega 1$	NP_002168.1

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения интерферон (ИФН), предложенный в настоящем описании в качестве пептида или полипептида, представляет собой интерферон I типа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения интерферон представляет собой ИФН- α . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения интерферон представляет собой ИФН- β . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения интерферон представляет собой ИФН- γ . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона, описанный в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 27. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 28 содер-

жит следующую аминокислотную (AA) последовательность:

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMN
FDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHL
KTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFN
RLTGYLRN

(SEQ ID NO: 27, интерферон-β1а человека).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона (ИФН), описанный в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность интерферона β1а человека (чИФН-β1а). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона, описанный в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность, приведенную под регистрационным номером в GenBank NP 002167.1.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона, описанный в настоящем документе, кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 28. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 28 содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты (НК):

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatgcctctgctgtgcttcagcaccaccgcctgagcatgagctacaacctgctg
ggcttctgcagaggccagcaactccagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatg
aacttcgacatccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgcctgacctctacgagatgctgcagaacat
cttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatca
accacctgaaaacctgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggta
ctacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggacctcgtgagggtggagatcctgaggaacttcta
cttcataacaggctgaccggctacgtgaggaaatgatgagtcggcgccgc

(SEQ ID NO: 28, интерферон-β1а человека).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона (ИФН), описанный в настоящем документе, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты (НК) интерферона β1а человека (чИФН-β1а). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона, описанный в настоящем документе, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, приведенную под регистрационным номером в GenBank NM 002176. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона, описанный в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 29 содержит следующую аминокислотную (AA) последовательность:

TF*LQPFEAFALAQQVVGDTVRVNMNTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSS
NFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFIDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQ
DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHL
YLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN

(SEQ ID NO: 29).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептид интерферона (ИФН), описанный в настоящем документе, кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 30. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 30 содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты (НК):

acattctaactgcaaccttctgaagccttgcctgacacaggtagtaggcgacactgttcgtgttcaacatgaccaacaagtgtctct
ccaaattgctctcctgtgtgcttctcactacagctcttccatgagctacaacttgcttgattcctacaaagaagcagaattttcagtgtag
aagctcctgtggcaattgaatggaggcttgaatactgcctcaaggacaggatgaactttgacatccctgaggagattgaagcagctgcagca
gttcagaaggaggacgccgattgacctctatgagatgctccagaacatcttgcattttcagacaagattcatctagcactggctggaat
gagactattgttgagaacctctggctaattgtctatcatcatgataaacctatcgaagacagctcctggaagaaaactggagaagaagatttc
accaggggaaaactcatgagcagctgcacctgaaaagataattatgggagattctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcactgtg
cctggaccatagtcagagtggaatcctaaggaacttttactcattaacagacttacaggttacctccgaaactga

(SEQ ID NO: 30).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН) и блок СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона и блок СТР, присоединенный к С-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона и по меньшей мере один блок СТР, присоединенный к С-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего

го изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона и блок СТР, присоединенный к N-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона и по меньшей мере один блок СТР, присоединенный к N-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона, по меньшей мере один блок СТР, присоединенный к N-концу, и/или по меньшей мере один блок СТР, присоединенный к С-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона, по меньшей мере один блок СТР, присоединенный к N-концу, и два блока СТР, последовательно присоединенных к С-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона, по меньшей мере один блок СТР, присоединенный к N-концу, и два блока СТР, присоединенных к С-концу.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН), один СТР блок, присоединенный к N-концу, и по меньшей мере два блока СТР, присоединенных к С-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона, один блок СТР, присоединенный к N-концу, и по меньшей мере два блока СТР, последовательно присоединенных к С-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона и по меньшей мере три блока СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона и три блока СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН)-полипептид СТР, кодируемый аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 31 содержит следующую аминокислотную (АА) последовательность:

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMN
FDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHL
KTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFIN
RLTGYLNRSSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 31).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержащий пептид интерферона (ИФН) и СТР, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 32. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 32 содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты (НК):

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgcccctgagcatgagctacaacctgctg
ggctctctgcagaggctccagcaactccagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcagggctggaatactgcctgaaggacagcatg
aacttcgacatccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccctgacctctacgagatgctgcagaacat
cttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatca
accacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggta
ctacggcagaatctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggacctcgtgagggtggagatctgaggaacttcta
cttcatcaacaggetgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccctccaccttccctgccagtcgaagccgactccctgg
gccctcgatcaccaattctgccacagtgatga
(SEQ ID NO: 32).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН) и два блока СТР, присоединенных к его карбокси-концу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН)-СТР (×2), кодируемый аминокислотной последовательностью, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 33 содержит следующую аминокислотную (АА) последовательность:

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMN
FDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHL
KTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFIN
RLTGYLNRSSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPRLPGSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 33).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержащий пептид интерферона (ИФН) и два блока СТР, присоединенных к его кар-

боксийконцу, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 34. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 34 содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты (НК):

```
tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatgcacctgctgctgtcttcagcaccaccgccctgagcatgagctacaacctgctg
ggcttcctgcagaggtccagcaactccagtgcagaaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatg
aacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacggccctgaccatctacgagatgctgcagaacat
cttcgcatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatca
accacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaagaggagacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaaggaggtg
ctacggcagaatctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgaggggtggagatcctgaggaacttcta
cttcataacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccctccacctccctgcccagtcgaagccgactccctgg
gccctccgacacaccaatctgccaacagagcagctcctctaagggccctcctccatccctgccatccccctccccggctgcctggccctct
gacacccctatcctgcctcagtgatgaaggcttgatccgcgccgc
```

(SEQ ID NO: 34).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН), один блок СТР, присоединенный к аминоконцу ИФН, и два блока СТР, присоединенных к карбоксиконцу ИФН. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН), один блок СТР, присоединенный к аминоконцу ИФН, и два блока СТР, последовательно присоединенных к карбоксиконцу ИФН. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит (от аминоконца к карбоксиконцу): СТР (×1)-пептид интерферона (ИФН)-СТР (×2), содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 35 содержит следующую аминокислотную (АА) последовательность:

```
MTNKLQIALLCFSTTALSSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSS
NFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQFQKEDAALTIYEMLNIFAIFRQ
DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILH
YLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLNRSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILP
QSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ
```

(SEQ ID NO: 35).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержащий пептид интерферона (ИФН), один блок СТР, присоединенный к аминоконцу ИФН, и два блока СТР, присоединенных к карбоксиконцу ИФН, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 36. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 36 содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты (НК):

```
tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatgcacctgctgctgtcttcagcaccaccgccctgagcagcagcagctccaaggc
ccccccccccagctgccagccccagcagactgccaggccccagcgacacccccctgccccagatgagctacaacctgctgggc
ttctgcagaggtccagcaactccagtgcagaaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaac
ttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacggccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttc
gccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaacc
acctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtacta
cggcagaatctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgaggggtggagatcctgaggaacttctactt
catcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccctccacctccctgcccagtcgaagccgactccctgggc
cctccgacacaccaatctgccaacagagcagctcctctaagggccctcctccatccctgccatccccctccccggctgcctggccctctgac
accctatcctgcctcagtgatgaaggcttgatccgcgccgc
```

(SEQ ID NO: 36).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН), один СТР, присоединенный к аминоконцу ИФН, и один СТР, расположенный в пределах последовательности, кодирующей ИФН. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит (от аминоконца к карбоксиконцу): СТР (×1)-пептид интерферона (ИФН) (фрагмент 1)-СТР-пептид интерферона (ИФН) (фрагмент 2), содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 37 содержит следующую аминокислотную (АА) последовательность:

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILQMSYNLLGFLQRSS
 NFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIRQ
 DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILH
 YLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILP
 QMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAAL
 TIYEMLQNIFAIRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLM
 SSLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN
 (SEQ ID NO: 37).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержащий пептид интерферона (ИФН), один блок СТР, присоединенный к аминоконцу ИФН, и один блок СТР, расположенный в пределах последовательности, кодирующей ИФН, кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 38. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 38 содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты (НК):

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtcttcagcaccaccgccctgagcagcagcagctccaaggc
 cccacccccagcctgcccagccccagcaggctgccaggccccagcgacacccccatcctgcccagatgagctacaacctgctgggc
 ttctgcagaggctccagcaactccagtccagaaactgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgctgaaggaccggatgaac
 ttgcacatccccgaagagatcaagcagctgcagcagctccagaaaggacgccgccctgacctctacagatgctgcagaacatcttc
 gccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaacc
 acctgaaaacctgctggaagagaagctggaagaaaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggctacta
 cggcagaatcctgcactacctgaaggccaagagtagcagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcctgcggaactctacttc
 atcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaagccccctccacctccctgccctccccaaagcagactgccggacc
 ctccgacacaccaattctgccacagatgtcctacaatctgctcggaattctgcagcgcctcccaactttcagtgctcagaagctcctctggcag
 ctcaatggccgcctggaatattgtctgaaagacagaatgaattttgacatcccagaggaaattaacagctccagcagtttcagaagaagat
 gctgctctcacaatctatgaaatgctccagaatactttgcaatctttgccaggacagctcctccaccgggtggaatgagacaattgtcgaga
 atctgctcgccaatgtctatcatcagatcaatcacctcaagacagctcctgaagaaaaactcgaagaaagaagatttcacacgcggcaactg
 atgtcctccctgcatctgaagcgctactatggcgcatcctgcattatctgaaagctaagaataactcccactgtgcttgacaattgtgcgcg
 tcgagatcctgagaaacttttatttcattaaccgctgacaggatacctgcgcaactgatgaaggctggtgagcgccgcg
 (SEQ ID NO: 38).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН) и один блок СТР, присоединенный к его аминоконцу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, описанный в настоящем документе, содержит пептид интерферона (ИФН)-СТР, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения SEQ ID NO: 39 содержит следующую аминокислотную (АА) последовательность:

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILQMSYNLLGFLQRSS
 NFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIRQ
 DSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILH
 YLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN*
 (SEQ ID NO: 39).

эффективности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения присоединение СТР к обоим amino- и карбоксиконцам пептида приводит к пролонгированной активности в условиях *in vivo*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения присоединение СТР к обоим amino- и карбоксиконцам глюкагоноподобного пептида приводит к пролонгированной активности в условиях *in vivo*.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "глюкагоноподобный пептид-1" (GLP-1) относится к полипептиду млекопитающих. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "глюкагоноподобный пептид-1" (GLP-1) относится к полипептиду человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения GLP-1 отщепляется от препробелка глюкагона (GenBank ID NP 002045), который способен связываться с рецептором GLP-1 и инициировать передачу сигналов, что приводит к инсулинотропной активности. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "инсулинотропная активность" относится к способности стимулировать секрецию инсулина в ответ на повышенные уровни глюкозы, что вызывает поглощение глюкозы клетками и снижение уровня глюкозы в плазме крови. В некоторых вариантах реализации полипептиды GLP-1 включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в патенте США № 5118666, который включен в настоящее описание посредством ссылки. В одном варианте реализации настоящего изобретения GLP-1 согласно настоящему изобретению также относится к гомологу GLP-1. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность GLP-1 согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 50% гомологична последовательностям GLP-1, приведенным под регистрационным номером в Genbank NP 002045, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность GLP-1 согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 60% гомологична последовательностям GLP-1, приведенным под регистрационным номером в Genbank NP 002045, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность GLP-1 согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична последовательностям GLP-1, приведенным под регистрационным номером в Genbank NP 002045, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность GLP-1 согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична последовательностям GLP-1, приведенным под регистрационным номером в Genbank NP002045, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность GLP-1 согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична последовательностям GLP-1, приведенным под регистрационным номером в Genbank NP002045, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. В одном варианте реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность GLP-1 согласно настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична последовательностям GLP-1, приведенным под регистрационным номером в Genbank NP 002045, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой аполипептопротеин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой аполипептопротеин A1 (апо-A1). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аполипептопротеин присоединен по меньшей мере к одному пептиду СТР на N- и/или C-конце. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аполипептопротеин представляет собой аполипептопротеин AI, аполипептопротеин AII, аполипептопротеин AIV или его аналог или вариант.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конструкции аполипептопротеина согласно настоящему изобретению в целом можно рассматривать как аналоги ЛВП ввиду их способности образовывать комплексы с холестерином и другими липидами и облегчать транспортировку этих соединений в печень.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения функциональная эквивалентность природному аполипептопротеину AI, A-II или A-IV может быть измерена подходящим образом с помощью исследования связывания липидов. Способность СТР-модифицированного аполипептопротеина вызывать, по существу, аналогичную физиологическую реакцию у млекопитающего может быть оценена подходящим образом путем измерения способности осуществлять обратный транспорт холестерина в исследуемом организме, таком как кролики или грызуны, такие как мыши. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий СТР-модифицированный аполипептопротеин, способен

осуществлять обратный транспорт холестерина аналогичным образом или даже лучше, чем нативные аполипопротеины в условиях *in vivo*, несмотря на модификацию, вызванную добавлением по меньшей мере одного СТР. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный аполипопротеин имеет более низкую биологическую активность в условиях *in vitro*, однако это компенсируется более длительным периодом полувыведения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения период полувыведения СТР-модифицированного аполипопротеина предпочтительно увеличен по сравнению с аполипопротеином дикого типа. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения увеличенный период полувыведения обусловлен гидродинамическим размером конструкции аполипопротеина, который может уменьшить скорость фильтрации через почки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность апо-А1 представляет собой последовательность:

DEPPQSPWDRVKDKATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSAGKGLNLKLLDNWDSVTSTFS
KLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRGEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELY
RQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQR
LAARLEALKENGARLAHEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGGLPVLESFKVSFLSA
LEEYTKKLNTQ

(SEQ ID NO: 44) или ее гомолог, вариант или фрагмент.

В одном варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают аминокислотную последовательность, содержащую пептид апо-А1, имеющий один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

MKAAVLTAVLFLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQF
EGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLE
EVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEM
RDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGARLAHEYHAKATEHLSTLSEK
AKPALEDLRQGGLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDPTI
LPQ

(SEQ ID NO: 70).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 71, кодирующую пептид апо-А1 и один аминокислотный пептид СТР на С-конце:

ATGAAGGCCGCCGTGCTGACCCTGGCCGTGCTGTTTCTGACCGGCTCTCAGGCCCGG
CACTTCTGGCAGCAGGACGAGCCTCCCCAGTCCCCCTGGGACAGAGTGAAGGACCT
GGCCACCGTGACGTGGACGTGCTGAAGGACTCCGGCAGAGACTACGTGTCCCAGT
TCGAGGGCTCTGCCCTGGGCAAGCAGCTGAACCTGAAGCTGCTGGACAACCTGGGAC
TCCGTGACCTCCACCTTCTCCAAGCTGCGCGAACAGCTGGGACCTGTGACCCAGGAA
TTCTGGGACAACCTGGAAAAAGAGACAGAGGGCCTGAGACAGGAAATGTCCAAGG
ACCTGGAAGAGGTCAAAGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAA
TGGCAGGAAGAGATGGAAGTGTACCGGCAGAAAGGTGGAACCCCTGCGGGCCGAGCT
GCAGGAAGGCGCTAGACAGAAGCTGCACGAAGTGCAGGAAAAGCTGTCCCCCTGG
GCGAGGAAATGCGGGACAGAGCCAGAGCCACGTGGACGCCCTGAGAACCCACCT
GGCCCCCTACTCTGACGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCCGCCAGACTGGAAGCCCTGA
AAGAGAACGGCGGAGCCCGGCTGGCCGAGTACCACGCTAAGGCTACCGAGCACCTG
TCCACCCTGTCCGAGAAGGCCAAGCCCGCCCTGGAAGATCTGCGGCAGGGCCTGCT
GCCCCGTGCTGGAATCCTTCAAGGTGTCTTCTGTCCGCTCTGGAAGAGTACACCAA
GAAGCTGAACACCCAGTCCTCCAGCTCCAAGGCCCTCCACCCTCCCTGCCTAGCCC
TAGTAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACCCCATCCTGCCCCAGTGATGAGGATCCGC
GGCCGCGAGCTC

(SEQ ID NO: 71).

В одном варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают аминокислотную последовательность, содержащую пептид апо-А1, имеющий два аминокислотных пептида СТР на С-конце:

MKAAVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQF
EGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLE
EVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEM
RDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLAARLEALKENG GARLA EYHAKATEHLSTLSEK
AKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
LPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 72).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 73, кодирующую пептид апо-А1 и два аминокислотных пептида СТР на С-конце:

ATGAAGGCCGCCGTGCTGACCCCTGGCCGTGCTGTTTCTGACCGGCTCTCAGGCCCGG
CACTTCTGGCAGCAGGACGAGCCTCCCCAGTCCCCCTGGGACAGAGTGAAGGACCT
GGCCACCGTGACGTGGACGTGCTGAAGGACTCCGGCAGAGACTACGTGTCCCAGT
TCGAGGGCTCTGCCCTGGGCAAGCAGCTGAACCTGAAGCTGCTGGACAACCTGGGAC
TCCGTGACCTCCACCTTCTCCAAGCTGCGCGAACAGCTGGGACCTGTGACCCAGGAA
TTCTGGGACAACCTGGAAAAAGAGACAGAGGGCCTGAGACAGGAAATGTCCAAGG
ACCTGGAAGAGGTCAAAGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAA
TGGCAGGAAGAGATGGAACCTGTACCGGCAGAAGGTGGAACCCCTGCGGGCCGAGCT
GCAGGAAGGCGCTAGACAGAAGCTGCACGAAGTGCAGGAAAAGCTGTCCCCCTGG
GCGAGGAAATGCGGGACAGAGCCAGAGCCACGTGGACGCCCCTGAGAACCCACCT
GGCCCCCTACTCTGACGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCCGCCAGACTGGAAGCCCTGA
AAGAGAACGGCGGAGCCCGGCTGGCCGAGTACCACGCTAAGGCTACCGAGCACCTG
TCCACCCTGTCCGAGAAGGCCAAGCCCGCCCTGGAAGATCTGCGGCAGGGCCTGCT
GCCCCGTGCTGGAATCCTTCAAGGTGTCCTTCTGTCGCTCTGGAAGAGTACACCAA
GAAGCTGAACACCCAGTCTCTCAGCTCCAAGGCCCTCCACCCTCCCTGCCTAGCCC
TAGTAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGAGCAGCTCCTCTAA
GGCCCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCCCCCTCTGACACCCCT
ATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC
(SEQ ID NO: 73).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения функциональный эквивалент апо-липопротеина или его фрагментов может быть получен путем добавления, замены или удаления по меньшей мере одной аминокислоты. В том случае, если аминокислотная последовательность содержит замену одной аминокислоты на другую, такая замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену. Фрагменты SEQ ID NO: 44 могут содержать более одной такой замены, например две консервативные аминокислотные замены, например, три или четыре консервативные аминокислотные замены, например, пять или шесть консервативных аминокислотных замен, например, семь или восемь консервативных аминокислотных замен, например, от 10 до 15 консервативных аминокислотных замен, например, от 15 до 25 консервативных аминокислотных замен, например, от 25 до 75 консервативных аминокислотных замен, например, от 75 до 125 консервативных аминокислотных замен, например, от 125 до 175 консервативных аминокислотных замен. Замены могут быть сделаны в пределах одной или более групп заранее определенных аминокислот.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фрагмент аполипопротеина содержит область связывания липидов.

В настоящем изобретении термин "функциональная эквивалентность" используется в соответствии с одним предпочтительным вариантом реализации, установленным с помощью ссылки на соответствующую функциональность заранее определенного фрагмента последовательностей, предложенных в настоящем описании. Будет понятно, что функциональные эквиваленты вариантов последовательностей, предложенных в настоящем описании, имеют аминокислотные последовательности, постепенно отличающиеся от предпочтительной заранее определенной последовательности, поскольку возрастает количество и объем вставок, удалений и замен, включая консервативные замены. Это различие измеряется как уменьшение степени гомологии между предпочтительной заранее определенной последовательностью и фрагментом или функциональным эквивалентом.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой цитокин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения цитокин представляет собой цитокин гематопоэтин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения цитокин представляет собой цитокин интерферон. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения цитокин представляет собой хемокин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения цитокин представляет собой такой цитокин как фактор некроза опухоли. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в настоящем описании цитокин имеет биологическую активность и клиническую эффективность. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в настоящем описании цитокин является терапевтическим белком.

Фрагменты АП или функциональные эквиваленты апополипротеина включены в объем настоящего изобретения, независимо от степени гомологии, которую они проявляют в отношении предпочтительной заранее определенной последовательности апополипротеина. Причина этого заключается в том, что некоторые области последовательности SEQ ID NO: 44, наиболее вероятно, легко подвергаются мутациям или могут быть полностью удалены без какого-либо существенного влияния на связывающую активность полученного фрагмента. Способы получения функционально эквивалентных вариантов SEQ ID NO: 44 описаны в патенте США № 6897039, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения полипептид, представляющий интерес, или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой фактор свертывания крови. В другом варианте реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой белок. В другом варианте реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой пептид. В другом варианте реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой полипептид. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фермент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой сериновую протеазу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой гликопротеин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой трансглутаминазу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой неактивный зимоген. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой любой фактор свертывания крови, известный специалисту в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор VIII. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор V. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор XIII. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор X. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой тромбин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фибрин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор VIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор VII. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор IX. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор X. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор XIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор XII. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор Ха. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор Va. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой протромбин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой тромбин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор V. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор XI. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор Виллебранда. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор VIIIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор VIII с удаленным В-доменом (FVIIIБDD). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой фактор XIa. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой прекалликреин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой калликреин. Согласно дру-

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения доменная структура фактора свертывания крови сходна или идентична доменной структуре ФІХ, ФVІІ, фактора Х, белка С и протромбина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови синтезируется в виде предшественников с N-концевым пропептидом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в настоящем описании фактор свертывания крови находится в неактивной проферментной форме. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови вырабатывается в гепатоцитах. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови содержит участок стыковки с гамма-карбоксилазой, которая превращает глутаминовую кислоту (Glu) в гамма-карбоксиглутаминовую кислоту (Gla). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фактор свертывания крови представляет собой коммерчески доступный фактор свертывания крови.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSR
KVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPR PGVLLRAPFP
(SEQ ID NO: 45).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSR
KVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP*GCGR.
(SEQ ID NO: 46).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор VII, содержит последовательность нуклеиновой кислоты:

CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCTCTGCA
CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCTGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAAGTG
TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT

AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
 GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
 GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
 GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
 AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
 AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
 AGCCCGTGGTCCCTCACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTT
 CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
 CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC
 TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA
 TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
 GGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGAC
 GGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTA
 CACCAGGGTCTCCAGTACATCGAGTGGCTGCAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCC
 ACGCCAGGAGTCCCTCTGCGAGCCCCATTTCCCTGAGGATGCGGCCCGC
 (SEQ ID NO: 47).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор VII-СТР (присоединенный к карбоксиконцу), содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
 GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCTTGCA
 CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCTGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
 GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
 GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
 TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTAT
 ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATG
 ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
 ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAG
 ACGGGGTGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGAAAAATACCTATTCT
 AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
 GCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
 GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
 GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
 AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
 AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
 AGCCCGTGGTCCCTCACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTT
 CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
 CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC
 TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA
 TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
 GGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACCG
 GCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGCCACTTCGGCGTGTACACC
 AGGGTGTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAACTGATGAGAAGCGAGCCCAGACC
 CGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCCCAGCAGCAGCTCCAAGGCCCTCCCCCTAG
 CCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCAGCGACACCCCCATCCTGCCCCAGTG
 AGGATCCGCGGCCCGC
 (SEQ ID NO: 48).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII-СТР (присоединенного к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSR
KVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

*
(SEQ ID NO: 49).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор VII-СТР-СТР (присоединенный к карбоксиконцу), содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

CTCGAGGACATGGTCTCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA
GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCTCTGCA
CCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCTCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGA
GAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCAA
GGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTG
TGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCCTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATG
ACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGCGCGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACC
ACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTA CTCTCTGCTGGCAG
ACGGGGTGTCTGACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCT
AGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGT
GCCCCAAAGGGGAGTGTCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTT
GTGTGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTC
GACAAAATCAAGAACTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTC
AGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCC
AGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACC
AGCCCGTGGTCTCACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTT
CTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAG
CTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATA
TCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAA
GGGGGACAGTGAGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACGTGGTACCTGAC
CGGCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGCCACTTCGGCGTGTA
CACCAGGGTGTCCAGTACATCGAGTGCTGCAGAAACTGATGAGAAGCGAGCC
CAGACCCGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCCCAGCAGCAGCTCCAAGGCCCT
CCCCCTAGCCTGCCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCC
TGCCACAGAGCAGCTCCTCTAAGGCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCG
GCTGCCAGGCCCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCC
GCGGCCGC

(SEQ ID NO: 50).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII-СТР-СТР (присоединенного к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR
KVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ
SSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ**

(SEQ ID NO: 51).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII-СТР-СТР-СТР (три блока присоединены к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR
KVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ
SSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ

(SEQ ID NO: 52).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII-СТР (×4) (четыре блока присоединены к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR
KVGDSNPITEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ
SSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPS
LPSRLPGPSDTPILPQ

(SEQ ID NO: 53).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора VII-СТР (×5) (пять блоков присоединены к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQR

KVGDSPNITEYMFAGYSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ
SSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPS
LPSPRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 54).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор IX, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
ACCATTCGCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCAT
GAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTG
GAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGT
TTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACGAATTTTGG
AAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCA
GTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGG
AAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCA
GTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGTCTCCTGTACTGAGGGATAT
CGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
AGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTGA
TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACCTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
CAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
AGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCCTGTGTTGAACT
GGTGTTAAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
ACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACAACTACAATGCA
GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAG
TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACAT
CTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAA
GGGAGATCAGCTTTAGTTCTCCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCA
CATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTC
CATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACT
GAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
GCAATGAAAGGCAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
ATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTTGAACGCGGCCGC
(SEQ ID NO: 55).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора IX содержит следующую аминокислотную последовательность:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTFEWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC
WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP
FPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKP
GQFPWQVVLNGKVDAFCGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTQK
RNVIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
WGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYITKVSRYVNWIEKTKLT*
(SEQ ID NO: 56).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая фактор IX-СТР (присоединенный к карбоксиконцу), содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
 ACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCA
 TGAACACGCCAACAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATT
 GGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
 TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAACAACTGAAAGAACAACCTGAATTTTG
 GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC
 AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAG
 GAAAGAAGTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
 AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATA
 TCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
 AGAGTTTCTGTTTCAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTGA
 TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
 AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACCTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
 CAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
 AGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCTGCCCCACTGTGTTGAACT
 GGTGTTAAATACAGTTGTTCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
 ACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGCAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCA
 GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCCTTAG
 TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACAT
 CTTCTCAAAATTTGGATCTGGCTATGTAAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTCCACAAA
 GGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCA
 CATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTC
 CATGAAGGAGGTAGAGATTGATGCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACT
 GAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
 GCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
 ATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCCGAGC
 CTGCCCTCCCCAAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGT
 GATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC
 (SEQ ID NO: 57).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора IX-СТР (присоединенного к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
 LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYEC
 WCPFGFEGKNCELDVTNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP
 FPCGRVSVSQSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQK
 RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSG
 WGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYNWIKETKLTSSSSKAPPPSLPS
 PSRLPGPSDTPILPQ**
 (SEQ ID NO: 58).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор IX-СТР-СТР (присоединенный к карбоксиконцу), содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATC
 ACCATCTGCCTTTTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCA
 TGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATT
 GGAAGAGTTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
 TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA AAAACACTGAAAGAACA AACTGAATTTTG
 GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC
 AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAG
 GAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
 AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATA
 TCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
 AGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTGA
 TGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAA
 AGCACCCAATCATTTAATGACTTCACCTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAAC
 CAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGG
 AGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCCTGTGTTGAACT
 GGTGTTAAAAATTACAGTTGTGCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACAT
 ACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACA AACTACAATGCA
 GCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAG
 TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTACAAGGAATACACGAACATC
 TTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAG
 GGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCAC
 ATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCC
 ATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTG
 AAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTG
 CAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGA
 TTAAGGAAAAAACAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCCCTCCCCGAGCC
 TGCCCTCCCCAAGCAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGAG
 CAGCTCCTCTAAGGCCCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCC
 CCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC
 (SEQ ID NO: 59).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора IX-СТР-СТР (присоединенного к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
 LERECMEEKCSFEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYEC
 WCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFC KNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP
 FPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
 GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK
 RNVIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSG
 WGRVFHKGSRALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
 PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPS
 PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ**
 (SEQ ID NO: 60).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора IX-СТР (×3) (три блока присоединены к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYEC
WCPFGFEGKNCELDVTCTNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP
FPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQK
RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
WGRVFHKGSRALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYGIYTKVSRVYNWIEKTKLTSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSD
TPILPQ
(SEQ ID NO: 61).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора IX-СТР (×4) (четыре блока присоединены к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYEC
WCPFGFEGKNCELDVTCTNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP
FPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQK
RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
WGRVFHKGSRALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYGIYTKVSRVYNWIEKTKLTSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSD
TPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 62).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фактора IX-СТР (×5) (пять блоков присоединены к карбоксиконцу) содержит следующую аминокислотную последовательность:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYEC
WCPFGFEGKNCELDVTCTNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVP
FPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQK
RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
WGRVFHKGSRALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYGIYTKVSRVYNWIEKTKLTSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSD
TPILQSSSSKAPPPSLPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO: 63).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения к клетке, экспрессирующей фактор свертывания-СТР согласно настоящему изобретению, добавляют фурин. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фурин увеличивает эффективность выработки фактора свертывания-СТР согласно настоящему изобретению в клетке. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фурин совместно трансфецируют с помощью вектора, содержащего кодирующую последовательность фактора свертывания-СТР согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фурин кодируется отдельным вектором. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фурин и фактор свертывания-СТР кодируются одним вектором. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность, кодирующая фурин, вставлена в pCI-DHFR. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность, кодирующая фурин, модифицирована в pCI-dhfr/smaI+NotI, Furin/AsiSI F.I.+NotI.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фурин, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

TCTAGAGTCGACCCCGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGC
AACAGGAACCTTGGTCCTGCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTTCACCA
ACACGTGGGCTGTGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGG
AAGCATGGGTTCTCAACCTGGGCCAGATCTTCGGGGACTATTACCACTTCTGGCAT
CGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTGCGCTCACCGCCCCGCGGCACAGCCGGCTGCA
GAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGACTAAA
CGGGACGTGTACCAGGAGCCACAGACCCCAAGTTTCTCAGCAGTGGTACCTGTCT
GGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGGCGGCCTGGGCGCAGGGCTACACAGG
GCACGGCATTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCACCCGGACTT
GGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAATGACCAGGACCCTGACCC
CCAGCCTCGGTACACACAGATGAATGACAACAGGCACGGCACACGGTGTGCGGGGG
AAGTGGCTGCGGTGGCCAACAACGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGGCCTACAACGCC
CGCATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGGAGGCACG
CTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACATCTACAGTGCCAGCTGGGGCCCCGA
GGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGCCAGCCCGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCC
GTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCCTCGGGG
AACGGGGGCGCGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTA
CACGCTGTCCATCAGCAGCGCCACGCAGTTTGGCAACGTGCCGTGGTACAGCGAGG
CCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACCTACAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAG
ATCGTGACGACTGACTTGCGGCAGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGC
CTCTGCCCCCTTAGCAGCCGGCATCATTGCTCTCACCCCTGGAGGCCAATAAGAACCT
CACATGGCGGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCACCTCA
ATGCCAACGACTGGGCCACCAATGGTGTGGGCCGGAAGTGAGCCACTCATATGGC
TACGGGCTTTTGGACGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACAGT
GGCCCCCAGCGGAAGTGATCATCGACATCCTCACCGAGCCCAAAGACATCGGGA
AACGGCTCGAGGTGCGGAAGACCGTGACCGCGTGCCTGGGCGAGCCCAACCACATC
ACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGCGGCTCACCCGTGCTCTATAATCGCCGTGGCGAC
CTGGCCATCCACCTGGTACAGCCCCATGGGCACCCGCTCCACCCTGCTGGCAGCCAGG
CCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTTAATGACTGGGCCTTCATGACAACTCATTCC
TGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGGTCTTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAG
CCAACAACATATGGGACGCTGACCAAGTTCACCCTCGTACTCTATGGCACCGCCCC
TGAGGGGCTGCCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCCTACGTCCAG
TCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTC
CAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCCCCAAGTCCTCGATACGCACTATAGCACCG
AGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCTCAT
GTGCCACATGCCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACG
CCTCCTTGGACCCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGGCAAAGCCAGAGCAGCCGAG
AGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCCCGGAGGTGGAGGCGGGGG
AACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCCTCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCC
TCAGCTGCGCCTTCATCGTGCTGGTCTTCGTCACTGTCTTCTGGTCCTGCAGCTG
CGCTCTGGCTTTAGTTTTCGGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCA
TCTCCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGGCCGTCTGACTC
AGAAGAGGACGAGGGCGGGGCGAGAGGACCGCCTTTATCAAAGACCAGAGCG
CCCTCTGAACGCGGCCGC
(SEQ ID NO: 64).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фурина содержит следующую аминокислотную последовательность:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLN
 LGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDVYQEPT
 DPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGA
 SFDVNDQDPDPQPRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRL
 DGEVTDAVEARSLGLNPNHIHYSASWGPEDDGKTVDPARLAEAEAFFRGVSQGRGGL
 GSIFVWASGNGGREHDSNCNDGYTNSIYTLSSSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGN
 QNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIALTLEANKNLTWDRMQHLVVQTSKPA
 HLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDI
 GKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGRSTRSTLLAARP
 HDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPGSEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAPPEGL
 PVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRA
 SVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCRSQSQSSRESPPQQPPRLPPEVE
 AGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISY
 KGLPPEAWQECPDSEEDGREGERTAFIKDQSA*
 (SEQ ID NO: 65).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения термин фактор свертывания также включает гомологи известных факторов свертывания, которые имеют свертывающую активность. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гомолог в соответствии с настоящим изобретением также включает его варианты, содержащие удаления, вставки или замены, включая замену аминокислоты, и его биологически активные полипептидные фрагменты. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение включает гомологи фактора свертывания крови, которые имеют свертывающую активность. Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение включает гомологи фактора свертывания крови, описанного в настоящем описании, имеющие свертывающую активность. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гомологи представляют собой, например, полипептиды, которые по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95% или более, например, на 99% гомологичны фактору свертывания крови, согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение включает гомологи фурина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения гомологи представляют собой, например, полипептиды, которые по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95% или более, например, на 99% гомологичны фурину согласно результатам определения с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию.

Согласно одному варианту реализации гомологи полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании, также относятся к их вариантам, содержащим удаления, вставки или замены, включая замену аминокислоты, и их биологически активным полипептидным фрагментам.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина присоединены к С-концу пептида или полипептида, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения четыре карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина присоединены к С-концу полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пять карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина присоединены к С-концу полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения 1-10 СТР присоединены к amino- или карбоксиконцу полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения 1-10 СТР присоединены к N-концу полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения 1-10 СТР присоединены к С-концу полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании.

Следует понимать, что композиции и способы согласно настоящему изобретению, включающие элементы или этапы, описанные в настоящем описании, могут, согласно другому варианту реализации,

состоять из этих элементов или этапов или в другом варианте состоять по существу из этих элементов или этапов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "содержит" относится к включению указанного активного агента, например, СТР-модифицированного полипептида или его фрагмента, а также включению других активных агентов и фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, вспомогательных веществ, смягчителей, стабилизаторов и т.д., известных в фармацевтической промышленности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "состоящий по существу из" относится к композиции, единственным действующим ингредиентом которой является указанный действующий ингредиент, однако в нее могут быть включены другие соединения, которые предназначены для стабилизации, сохранения и т.д. состава, но непосредственно не участвуют в обеспечении терапевтического эффекта указанного действующего ингредиента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "состоящий по существу из" может относиться к компонентам, которые облегчают высвобождение действующего ингредиента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "состоящий из" относится к композиции, которая содержит действующий ингредиент и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный по меньшей мере к одному карбоксиконцевому пептиду гонадотропина (СТР), присоединенному к N- или С-концу указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 1-3 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 1-5 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 1-10 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 2 или 3 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 2-5 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 2-10 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 3-5 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 3-8 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагмент, присоединенный к 3-10 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагменты, присоединенные к 6-10 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагменты, присоединенные к 1 карбоксиконцевому пептиду гонадотропина (СТР), присоединенному на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы, предложенные в настоящем описании, включают полипептид или его фрагменты, присоединенные к 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 карбоксиконцевым пептидам гонадотропина (СТР), присоединенным на N- и/или С-конце указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пептиды СТР последовательно присоединены на любом конце (N-конце или С-конце) указанного полипептида или его фрагментов. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, предложенный в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая вектор экспрессии. Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая указанный вектор экспрессии.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая клетку, описанную в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанная клетка является эукариотической клеткой. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения указанная клетка является прокариотической клеткой.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов обеспечивает указанному полипептиду или его фрагментам улучшенную защиту от расщепления.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов обеспечивает улучшенную защиту против клиренса. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов обеспечивает более длительное время клиренса. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов повышает его S_{\max} . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов повышает его T_{\max} . Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов продлевает его $T^{1/2}$. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность СТР на С-конце полипептида или его фрагментов продлевает (увеличивает) его AUC.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения конъюгированный полипептид или его фрагмент согласно настоящему изобретению применяют аналогичным способом, что и немодифицированный полипептид или его фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид или его фрагмент согласно настоящему изобретению применяют аналогичным способом, что и немодифицированный полипептид или его фрагмент. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид или его фрагмент согласно настоящему изобретению имеет увеличенный период полувыведения из сыворотки крови и время удержания в плазме, сниженный клиренс и повышенную клиническую активность в условиях *in vivo*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения благодаря улучшенным свойствам полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании, такой конъюгат вводят с меньшей частотой, чем полипептид или его фрагмент.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение частоты введения приводит к улучшенной стратегии лечения, это, в одном варианте реализации, приводит к улучшению приверженности пациента схеме лечения, что обеспечивает улучшение результатов лечения, а также улучшение качества жизни пациентов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, по сравнению с обычными конъюгатами, конъюгаты, предложенные в настоящем описании, имеющие гидродинамический объем, который также предусмотрен в настоящем описании, обладают улучшенной эффективностью в условиях *in vivo*, улучшенной стабильностью, повышенными уровнями AUC и более длительным периодом полувыведения из сыворотки крови.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид, содержащий один гликозилированный карбоксиконцевой пептид гонадотропина (СТР), присоединенный к N-концу, и два гликозилированных СТР, присоединенных к С-концу указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения следует понимать, что комбинации гликозилированных и негликозилированных пептидов СТР могут быть использованы для модификации полипептидов, представляющих интерес, или их фрагментов, дополнительно предложенных в настоящем описании. Такие комбинации могут включать, например, по меньшей мере один негликозилированный СТР, присоединенный к N-концу указанного полипептида или его фрагментов, и по меньшей мере один гликозилированный СТР, присоединенный к С-концу указанного полипептида или его фрагментов, и наоборот. Более того, в другом варианте также предусмотрены комбинации по меньшей мере одного гликозилированного СТР и по меньшей мере одного негликозилированного СТР, присоединенных к одному концу (N- или С-концу). Эти комбинации также могут включать усеченные формы гликозилированного и/или негликозилированного СТР. Такие комбинации могут быть определены специалистом в данной области техники, руководствуясь изобретением, предложенным в настоящем описании, для того чтобы достичь оптимального гидродинамического объема или гидродинамического размера для полипептидов, представляющих интерес, или их фрагментов. В результате реализации полипептиды, представляющие интерес, или их фрагменты, имеющие оптимальный гидродинамический объем, могут обладать оптимальными желаемыми характеристиками, т.е. улучшенной эффективностью, улучшенной стабильностью, повышенными уровнями AUC, повышенной биодоступностью и более длительным периодом полувыведения из циркуляции. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество СТР-модифицированного полипептида, представляющего интерес, или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество СТР-модифицированного полипептида или его фрагментов определяется в соответствии с такими факторами, как конкретное заболевание, подлежащее лечению, состояние пациента, подлежащего лечению, а также

других ингредиентов в составе композиции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения терапевтическая эффективность СТР-модифицированного полипептида или его фрагмента оптимально подобрана путем добавления или удаления гликозилированных и/или негликозилированных пептидов СТР, чтобы получить оптимальный гидродинамический объем. Следует понимать, что при реализации данного варианта специалист может получить СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, который обладает оптимальной терапевтической эффективностью.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, имеет терапевтическое применение. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, имеет профилактическое применение.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термины "снижающий, снижение, уменьшение и т.д." при использовании в отношении способов, предложенных в настоящем описании, относятся к 100% снижению относительно ранее измеренного или определенного уровня или нормального уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 89-99% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 79-88% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 69-78% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 59-68% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 49-58% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 39-48% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 29-38% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 19-28% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 9-18% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 5-8% относительно заранее определенного уровня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение составляет 1-4% относительно заранее определенного уровня.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения тканеспецифичные промоторы, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают последовательности, которые являются функциональными в одной или более конкретных клеточных популяций. Примеры включают, но не ограничиваются ими, промоторы, такие как альбумин, который специфичен для печени [Pinkert et al., (1987), *Genes Dev.* 1:268-277], специфичные для лимфоидной ткани промоторы [Calame et al., (1988), *Adv. Immunol.* 43:235-275]; в частности промоторы Т-клеточных рецепторов [Winoto et al., (1989), *EMBO J.* 8:729-733] и иммуноглобулинов; [Banerji et al. (1983), *Cell*, 33:729-740], специфичные для нейронов промоторы, такие как промотор нейрофиламентов [Byrne et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5473-5477], специфичные для поджелудочной железы промоторы [Edlunch et al. (1985), *Science*, 230:912-916] или специфичные для молочной железы промоторы, такие как промотор молочной сыворотки (патент США № 4873316 и европейская публикация патентной заявки № 264166.). Индуцируемые промоторы, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают, например, тетрациклин-индуцируемый промотор (Srouf, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90:398-405).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения выражение "полинуклеотидная молекула" относится к одно- или двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты, которая выделена и представлена в виде последовательности РНК, комплементарной полинуклеотидной последовательности (кДНК), геномной полинуклеотидной последовательности и/или составных полинуклеотидных последовательностей (например, комбинация упомянутых выше последовательностей).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "комплементарная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая получена в результате обратной транскрипции РНК с использованием обратной транскриптазы или любой другой РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность затем может быть амплифицирована в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro* с использованием ДНК-полимеразы.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "геномная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, полученной (выделенной) из хромосомы и, следовательно, она представляет собой непрерывную часть хромосомы.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения "составная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая является, по меньшей мере частично, комплементарной и, по меньшей мере частично, геномной. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения составная

последовательность может включать некоторые последовательности экзонов, необходимые для кодирования полипептида согласно настоящему изобретению, а также некоторые последовательности интронов, расположенные между ними. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения

последовательности интронов могут быть получены из любого источника, включая другие гены, и, как правило, включают консервативные сигнальные последовательности сплайсинга. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательности интронов включают цис-действующие регуляторные элементы экспрессии.

В одном варианте полинуклеотиды согласно настоящему изобретению получают с использованием методик ПЦР или любого другого метода или процедуры, известных специалистам в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения процедура включает лигирование двух различных последовательностей ДНК (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

В одном варианте полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, которые кодируют модифицированные полипептиды, представляющие интерес, или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, вставлены в векторы экспрессии (т.е. конструкцию нуклеиновой кислоты), чтобы обеспечить экспрессию рекомбинантного пептида/полипептида. В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор экспрессии согласно настоящему изобретению содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор пригодным для репликации и интеграции у прокариотов. В одном варианте реализации настоящего изобретения вектор экспрессии согласно настоящему изобретению содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор пригодным для репликации и интеграции у эукариотов. В другом варианте реализации настоящего изобретения вектор экспрессии согласно настоящему изобретению содержит бифункциональный вектор, который делает этот вектор пригодным для репликации и интеграции у прокариотов и эукариотов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения векторы для клонирования содержат последовательности инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения множество прокариотических или эукариотических клеток могут быть использованы в качестве систем-хозяев для экспрессии СТР-модифицированных полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения такие системы включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, вектором экспрессии, содержащим последовательность, кодирующую полипептид; дрожжи, трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии в клетках дрожжей, содержащими последовательность, кодирующую полипептид; системы на основе растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, ВТМ) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии, такими как Ti-плазида, содержащая последовательность, кодирующую полипептид.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения небактериальные системы экспрессии используют (например, системы экспрессии в клетках млекопитающих, такие как клетки линии СНО), чтобы экспрессировать полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вектор экспрессии, используемый для экспрессии полинуклеотидов согласно настоящему изобретению в клетках млекопитающих, представляет собой вектор pCI-dhfr. Конструкция вектора pCI-dhfr описана в соответствии с одним вариантом реализации в разделе "Материалы и методы" примеров, приведенных ниже.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, в бактериальных системах согласно настоящему изобретению, ряд векторов экспрессии может быть предпочтительно выбран в зависимости от предполагаемого применения экспрессированного полипептида. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения желательными являются большие количества полипептида. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения желательными являются векторы, которые направляют экспрессию высоких уровней белкового продукта, возможно, в виде гибрида с гидрофобной сигнальной последовательностью, которая направляет экспрессированный продукт в периплазму бактерий или в культуральную среду, из которой легко очистить белковый продукт. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения некоторые гибридные белки модифицированы для включения специфического участка рестрикции, чтобы облегчить выделение полипептида. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения векторы, которые могут быть приспособлены для такой манипуляции, включают, но не ограничиваются ими, серию pET векторов экспрессии E.coli [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения используются системы экспрессии в клетках дрожжей. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, может быть использован в дрожжах, как раскрыто в патентной заявке США № 5932447, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используют векторы, которые способствуют интеграции чужеродной последовательности ДНК в хромосому дрожжей.

В одном варианте реализации вектор экспрессии согласно настоящему изобретению также может

содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые обеспечивают, например, трансляцию нескольких белков с одной мРНК, такие как участок внутренней посадки рибосомы (IRES) и последовательности для геномной интеграции промотора-химерного полипептида. В одном варианте реализации векторы экспрессии млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, которые доступны от Invitrogen, pCI, который доступен от Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV и pBK-CMV, которые доступны от Stratagene, pTRES, который доступен от Clontech, и их производные.

В одном варианте реализации используют векторы экспрессии, содержащие регуляторные элементы из эукариотических вирусов, таких как ретровирусы. Векторы SV40 включают pSVT7 и pMT2. В другом варианте реализации векторы, полученные из бычьего вируса папилломы, включают pBV-1MTHA и векторы, полученные из вируса Эпштейна-Бар, включают pHEBO и p2O5. Другие типичные векторы включают pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, бакуловирус pDSVE и любой другой вектор, обеспечивающий экспрессию белков под контролем раннего промотора SV-40, позднего промотора SV-40, промотора металлотионеина, промотора мышинного вируса опухоли молочной железы, промотора вируса саркомы Рауса, промотора полиэдрина, или других промоторов, которые, как было показано, являются эффективными для экспрессии в эукариотических клетках.

В одном варианте рекомбинантные вирусные векторы являются пригодными для экспрессии пептидов/полипептидов согласно настоящему изобретению в условиях *in vivo*, поскольку они обеспечивают ряд преимуществ, таких как латеральная инфекция и направленная специфичность. Согласно одному варианту латеральная инфекция присуща жизненному циклу, например ретровируса, и представляет собой процесс, посредством которого одна инфицированная клетка производит множество потомков-вирионов, которые отпочковываются и инфицируют соседние клетки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в результате такого процесса большая область быстро становится инфицированной, большая часть которой первоначально не была инфицирована посредством исходных вирусных частиц. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения получают вирусные векторы, которые не могут распространяться латерально. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения эта особенность может быть полезной, если желаемая цель представляет собой введение конкретного гена только в локализованном количестве клеток-мишеней. В одном варианте реализации настоящего изобретения для введения в клетки вектора экспрессии согласно настоящему изобретению могут быть использованы различные способы. Такие способы в общих чертах описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa et al. [*Biotechniques*, 4(6):504-512, 1986] и включают, например, устойчивую или кратковременную трансфекцию, липофекцию, электропорацию и инфицирование рекомбинантными вирусными векторами. Также см. патенты США № 5464764 и 487992, которые включены в настоящее описание посредством ссылки, в которых описаны положительные/отрицательные методы отбора.

В одном варианте введение нуклеиновой кислоты посредством вирусной инфекции обеспечивает несколько преимуществ по сравнению с другими методами, такими как липофекция и электропорация, поскольку благодаря инфекционной природе вирусов может быть достигнута более высокая эффективность трансфекции.

Следует иметь в виду, что модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, также могут быть экспрессированы с конструкции нуклеиновой кислоты, введенной индивидууму с применением любого подходящего способа введения (например, подкожного введения, перорального введения, интраназального введения, внутривенного введения или с помощью генной терапии в условиях *in vivo*). В одном варианте конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в подходящую клетку с помощью соответствующего носителя/способа доставки генов (трансфекции, трансдукции, гомологичной рекомбинации и т.д.) и системы экспрессии, в случае необходимости, а затем модифицированные клетки размножают в культуре и вводят индивидууму (т.е. генная терапия в условиях *ex vivo*).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения используют векторы экспрессии в клетках растений. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия последовательности, кодирующей полипептид, контролируется рядом промоторов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используют вирусные промоторы, такие как промоторы 35S РНК и 19S РНК CaMV [Brisson et al., *Nature*, 310:511-514 (1984)], или промотор белка оболочки ВТМ [Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используют растительные промоторы, такие как, например, малая субъединица RUBISCO [Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984) и Brogli et al., *Science*, 224:838-843 (1984)], или промоторы белков теплового шока, например hsp17.5-Е или hsp17.3-В сои [Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 (1986)]. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конструкции вводят в клетки растений с помощью Ti плазмиды, Ri плазмиды, вирусных векторов для растений, прямой трансформации ДНК,

микроинъекции, электропорации и других методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. См., например, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, p. 421-463 (1988)]. Другие системы экспрессии, такие как системы на основе клеток-хозяев насекомых и млекопитающих, которые хорошо известны в данной области техники, также могут быть использованы согласно настоящему изобретению.

Будет понятно, что, помимо включения элементов, необходимых для транскрипции и трансляции внедренной кодирующей последовательности (кодирующей полипептид), конструкция для экспрессии согласно настоящему изобретению также может содержать последовательности, модифицированные для оптимизации стабильности, получения, очистки, выхода или активности экспрессированного полипептида.

В одном варианте реализации трансформированные клетки культивируют в эффективных условиях, которые обеспечивают экспрессию больших количеств рекомбинантных модифицированных пептидов оксинтомодулина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения эффективные условия культивирования включают, но не ограничиваются ими, эффективные среды, биореактор, температуру, pH и снабжение кислородом, которые обеспечивают получение белка. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения эффективная среда относится к любой среде, в которой клетки культивируют для получения рекомбинантного полипептида согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения среда, как правило, включает водный раствор, имеющий источники усваиваемого углерода, азота и фосфата, а также соответствующие соли, минералы, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. Клетки согласно настоящему изобретению можно культивировать в обычных биореакторах для ферментации, встряхиваемых колбах, пробирках, планшетах для микротитрования и чашках Петри. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения культивирование проводят при температуре, pH и содержании кислорода, которые подходят для рекомбинантной клетки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения определение условий культивирования находится в пределах квалификации среднего специалиста в данной области техники.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в зависимости от вектора и системы-хозяина, используемых для получения, готовый полипептид или его фрагмент, или, в другом варианте, готовый СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, экспрессируется в рекомбинантной клетке для гликозилирования СТР, секретируется в ферментационную среду или удерживается на внешней поверхности клетки млекопитающих.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, после культивирования в течение заранее определенного периода времени, производят выделение рекомбинантного полипептида или его фрагмента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения выражение "выделение рекомбинантного модифицированного полипептида или его фрагмента" относится к сбору всей ферментационной среды, содержащей полипептид или его фрагмент, и не должно подразумевать дополнительные этапы разделения или очистки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дополнительные этапы разделения или очистки, хорошо известные в данной области техники, осуществляют с целью выделения рекомбинантного модифицированного полипептида или его фрагмента. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модифицированные полипептиды или их фрагменты или варианты, предложенные в настоящем описании, очищают с использованием различных стандартных методик очистки белков, включая, но не ограничиваясь ими, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, фильтрацию, электрофорез, хроматографию гидрофобных взаимодействий, гель-фильтрационную хроматографию, хроматографию с обращенной фазой, хроматографию с использованием конканавалина А, хроматографическое фокусирование и дифференциальную солюбилизацию.

Для того чтобы облегчить выделение, экспрессированная кодирующая последовательность может быть модифицирована, чтобы кодировать полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и гибридный отщепляемый фрагмент. Также гибридный белок может быть модифицирован, так, что полипептид может быть легко выделен с помощью аффинной хроматографии; например, путем иммобилизации на колонке, содержащей сорбент, который специфичен для отщепляемого фрагмента. Участок рестрикции находится между модифицированными полипептидами или их фрагментами и отщепляемым фрагментом, и полипептид может быть элюирован из хроматографической колонки с помощью обработки соответствующим ферментом или агентом, который специфически расщепляет гибридный белок в этом участке [например, см. Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988) и Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859(1990)].

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модифицированный пептид или полипептид, предложенный в настоящем описании, выделяют "по существу в чистой" форме.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения выражение "по существу чистый" относится к чистоте, которая обеспечивает эффективное использование белка в соответствии со способами, описанными в настоящем описании.

Модифицированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, также

может быть синтезирован с использованием систем экспрессии в условиях *in vitro*. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения методы синтеза в условиях *in vitro* хорошо известны в данной области техники и компоненты системы являются коммерчески доступными.

В одном варианте реализации рекомбинантные модифицированные полипептиды или их фрагменты синтезируют и очищают; их терапевтическая эффективность может быть оценена в условиях *in vivo* или в условиях *in vitro*. Величины связывающей активности рекомбинантных модифицированных полипептидов или их фрагментов согласно настоящему изобретению можно определить с помощью различных количественных исследований, известных специалистам в данной области техники. В другом варианте реализации настоящего изобретения полипептиды или их фрагменты согласно настоящему изобретению могут быть обеспечены индивидууму сами по себе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, могут быть обеспечены индивидууму как часть фармацевтической композиции, в которой они смешаны с фармацевтически приемлемым носителем.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения "фармацевтическая композиция" относится к препарату одного или более действующих ингредиентов, описанных в настоящем описании, содержащему другие химические компоненты, такие как физиологически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Цель фармацевтической композиции заключается в том, чтобы облегчить введение соединения в организм.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения "действующий ингредиент" относится к полипептидной последовательности, представляющей интерес, которая обеспечивает биологический эффект.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения выражения "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые в настоящем описании используются взаимозаменяемо, относятся к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения в организме и не подавляет биологическую активность и свойства вводимого соединения. Эти выражения также подразумевают адъювант. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один из ингредиентов, включенных в фармацевтически приемлемый носитель, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), биосовместимый полимер с широким диапазоном растворимости в органических и водных средах (Mutter et al. (1979)).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "вспомогательное вещество" относится к инертному веществу, добавленному к фармацевтической композиции, чтобы дополнительно облегчить введение действующего ингредиента. Согласно одному варианту реализации вспомогательные вещества включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

Методики приготовления и введения лекарственных препаратов можно найти в "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, последнее издание, которое включено в настоящее описание посредством ссылки.

Различные варианты диапазонов дозировки включены в область настоящего изобретения. Дозировка СТР-модифицированного полипептида или его фрагментов, предложенных в настоящем описании, составляет 0,005-100 мг/сутки согласно одному варианту реализации. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,005-5 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,01-50 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,1-20 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,1-10 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,01-5 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,001-0,01 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,001-0,1 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,1-5 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,5-50 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,2-15 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 0,8-65 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 1-50 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 5-10 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 8-15 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 10-20 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 20-40 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 60-120 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 12-40 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 40-60 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 50-100 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 1-60 мг/сутки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка составляет 15-25 мг/сутки. Согласно другому

[illegible]

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту в дозе, варьирующейся от 0,2 до 2 мг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту в дозе, варьирующейся от 2 до 6 мг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту в дозе, варьирующейся от 4 до 10 мг. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту в дозе, варьирующейся от 5 до 15 мг.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения дозировка СТР-модифицированных полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании, имеет такую величину, что она содержит 65% от количества агониста, которое вводят с использованием поли-

варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, вводят субъекту с двухнедельным интервалом (один раз каждые две недели). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, вводят субъекту два раза в месяц. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, вводят субъекту один раз в месяц. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, вводят субъекту ежедневно. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения СТР-модифицированные полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, вводят субъекту один раз в два дня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз в три дня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз в четыре дня. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз в пять дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз в шесть дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз каждые 7-14 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз каждые 10-20 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз каждые 5-15 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят субъекту один раз каждые 15-30 дней.

В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению включают увеличение приверженности схеме лечения пациентов, страдающих хроническими заболеваниями, которые нуждаются в терапии полипептидом или его фрагментами, предложенными в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения улучшения приверженности пациентов схеме лечения достигают путем увеличения гидродинамического размера СТР-модифицированного полипептида или его фрагмента на величину, предусмотренную в настоящем описании. В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению обеспечивают снижение частоты дозирования полипептида или его фрагмента.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения термин "приверженность схеме лечения" включает соблюдение медицинских указаний. В другом варианте реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению включают повышение приверженности схеме лечения пациентов, нуждающихся в терапии, за счет увеличения гидродинамического размера полипептида или его фрагмента на коэффициент или величину приращения, предусмотренную в настоящем изобретении, что приводит к снижению частоты введения указанного полипептида или его фрагмента. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение частоты введения полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании, достигается за счет модификаций СТР и последующего увеличения гидродинамического размера на коэффициент или величину приращения, предусмотренную в настоящем описании, что придает указанному полипептиду или его фрагменту большую стабильность. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение частоты введения полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем изобретении, достигается за счет модификаций СТР и последующего увеличения гидродинамического размера на коэффициент или величину приращения, предусмотренную в настоящем описании, что увеличивает период полувыведения ($T_{1/2}$) указанного полипептида или его фрагментов. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение частоты введения полипептида или его фрагментов, предложенных в настоящем описании, достигается за счет увеличения гидродинамического размера полипептида или его фрагмента на коэффициент или величину приращения, предусмотренную в настоящем описании, что приводит к увеличению времени клиренса или уменьшению скорости клиренса указанного полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения снижение частоты введения полипептида или его фрагмента, предложенного в настоящем описании, достигается за счет увеличения гидродинамического размера полипептида или его фрагмента на коэффициент или величину приращения, предусмотренную в настоящем изобретении, что приводит к увеличению значения AUC указанного полипептида или его фрагментов. В одном варианте реализации пероральное введение включает стандартную лекарственную форму, включающую таблетки, капсулы, пастилки, жевательные таблетки, суспензии, эмульсии и т.п. Такие стандартные лекарственные формы содержат безопасное и эффективное количество желаемых полипептидов или их фрагментов, предложенных в настоящем описании, каждое из которых, в одном варианте реализации, варьируется от приблизительно 0,7

или 3,5 мг до приблизительно 280 мг/70 кг, или, в другом варианте реализации, от приблизительно 0,5 или 10 мг до приблизительно 210 мг/70 кг. Фармацевтически приемлемые носители, пригодные для приготовления стандартных лекарственных форм для перорального введения, хорошо известны в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения таблетки, как правило, содержат стандартные фармацевтически совместимые адъюванты в виде инертных разбавителей, таких как карбонат кальция, карбонат натрия, маннит, лактоза и целлюлоза; связующие вещества, такие как крахмал, желатин и сахароза; разрыхлители, такие как крахмал, альгиновая кислота и кроскармеллоза; смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вещества, способствующие скольжению, такие как диоксид кремния, могут быть использованы для улучшения характеристик сыпучести порошкообразной смеси. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения красители, такие как красители FD&C, могут быть добавлены для улучшения внешнего вида. Подсластители и вкусовые добавки, такие как аспартам, сахарин, ментол, перечная мята и фруктовые отдушки, являются пригодными адъювантами для жевательных таблеток. Капсулы обычно содержат один или более твердых разбавителей, раскрытых выше. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения выбор компонентов носителя зависит от второстепенных факторов, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не являются критическими для целей настоящего изобретения, и может быть легко сделан специалистом в данной области техники.

В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма имеет заранее определенный профиль высвобождения. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки или жевательные таблетки с пролонгированным высвобождением. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки или жевательные таблетки с замедленным высвобождением. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма согласно настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки или жевательные таблетки с немедленным высвобождением. В одном варианте реализации пероральная лекарственная форма приготовлена в соответствии с желаемым профилем высвобождения фармацевтического действующего ингредиента, как известно специалистам в данной области техники.

В другом варианте реализации пероральные композиции включают жидкие растворы, эмульсии, суспензии и т.п. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтически приемлемые носители, пригодные для получения таких композиций, хорошо известны в данной области техники. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения жидкие пероральные композиции содержат от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,933% желаемого соединения или соединений или в другом варианте от приблизительно 0,01 до приблизительно 10%.

В одном варианте реализации композиции для применения в соответствии со способами согласно настоящему изобретению включают растворы или эмульсии, которые в другом варианте реализации представляют собой водные растворы или эмульсии, содержащие безопасное и эффективное количество соединений согласно настоящему изобретению и, возможно, другие соединения, предназначенные для местного интраназального введения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения композиции содержат от приблизительно 0,001 до приблизительно 10,0% мас./об. рассматриваемого соединения, более предпочтительно от приблизительно 0,01 до приблизительно 2,0%, которое используется для системной доставки соединений интраназальным путем.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят в мышцу (внутримышечная инъекция). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент и по меньшей мере один блок СТР, вводят под кожу (подкожная инъекция). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят в мышцу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид, содержащий полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, и по меньшей мере один блок СТР, вводят в кожу. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, как описано в данном изобретении, вводят с помощью системного пути введения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, как описано в данном изобретении, вводят путем внутривенной инъекции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения введение может быть парентеральным, внутрилегочным, пероральным, местным, внутрикожным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутривенным, подкожным, интраназальным, трансназальным, внутриглазным, офтальмологическим, эпидуральным, буккальным, ректальным, через слизистую, интестинальным или парентеральным введением, включая интрамедуллярные инъекции, а также интратекальное или прямое внутривентрикулярное введение.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения препарат вводят местным, а не системным путем, например, с помощью инъекции препарата непосредственно в конкретную область тела

пациента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ введения может быть энтеральным. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ может представлять собой конъюнктивальный, трансдермальный, внутрикожный, внутриартериальный, вагинальный, ректальный, внутрипухоловый, внутрираковый, через слизистую, внутримышечный, внутрисосудистый, внутрижелудочковый, внутричерепной, интраназальный, сублингвальный способ введения или их комбинацию.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции вводят путем внутривенной, внутриартериальной или внутримышечной инъекции жидкого препарата. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения жидкие составы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и т.п. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции вводят внутривенно, и, следовательно, изготавливают в форме, пригодной для внутривенного введения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции вводят внутриартериально и, следовательно, изготавливают в форме, пригодной для внутриартериального введения.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции вводят внутримышечно и, следовательно, изготавливают в форме, пригодной для внутримышечного введения.

Также в другом варианте реализации фармацевтические композиции наносят местно на поверхность тела и, следовательно, изготавливают в форме, пригодной для местного применения. Пригодные композиции для местного применения включают гели, мази, кремы, лосьоны, капли и т.п. Для местного введения соединения согласно настоящему изобретению комбинируют с дополнительным соответствующим терапевтическим агентом или агентами, готовят и наносят в виде растворов, суспензий или эмульсий в физиологически приемлемом разбавителе, содержащем фармацевтический носитель или не содержащем его.

В одном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению изготовлены с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например посредством стандартного смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, включения или лиофилизации.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением изготовлены стандартным способом с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, включая вспомогательные вещества и наполнители, которые облегчают переработку действующих ингредиентов в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения характеристики состава зависят от выбранного способа введения.

В одном варианте реализации инъеклируемые составы согласно настоящему изобретению изготовлены в виде водных растворов. В одном варианте реализации инъеклируемые составы согласно настоящему изобретению изготовлены в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения в составах для введения через слизистую используют вещества, способствующие проникновению, которые соответствуют барьеру, который должна преодолеть композиция. Такие вещества, способствующие проникновению, обычно известны в данной области техники.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения препараты, описанные в настоящем документе, изготовлены для парентерального введения, например для болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения составы для инъекций представлены в стандартной дозированной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах, возможно с добавленным консервантом. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения композиции представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и содержат вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Композиции также содержат в другом варианте реализации консерванты, такие как хлорид бензалкония и тимеросал и т.п.; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетраацетат натрия и др.; буферы, такие как фосфат, цитрат и ацетат; контролирующие тоничность агенты, такие как хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннитол и другие; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистеин, метабисульфит натрия и др.; ароматические вещества; регулирующие вязкость агенты, такие как полимеры, включая целлюлозу и ее производные; поливиниловый спирт и кислоты и основания для доведения pH таких водных композиций, в случае необходимости. Композиции также содержат в другом варианте реализации местные анестетики или другие активные вещества. Композиции могут быть использованы в виде спреев, аэрозолей, капель и т.п.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активного препарата в водорастворимой форме. Помимо этого, суспензии действующих ингредиентов могут быть получены в виде подходящих суспен-

зий для инъекций на масляной или водной основе. Подходящие липофильные растворители или носители включают в другом варианте реализации нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды или липосомы. Водные суспензии для инъекций содержат в другом варианте реализации вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения суспензия также содержит подходящие стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость действующих ингредиентов, чтобы обеспечить получение высококонцентрированных растворов.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения активное соединение может быть доставлено в везикуле, в частности в липосоме (см. Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, p. 317-327; J.E. Diederichs and al., *Pharm./nd.* 56 (1994), 267-275).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, доставленная в системе с контролируемым высвобождением, изготовлена для введения с помощью внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения используется насос (см. Langer, *выше*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения могут быть использованы полимерные материалы. В еще одном варианте реализации система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени, т.е. мозга, следовательно, это потребует использования только части системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, *выше*, vol. 2, p. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (*Science*, 249:1527-1533 (1990)).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения действующий ингредиент находится в форме порошка для восстановления подходящим носителем, например стерильным, апирогенным водным раствором, перед использованием. Композиции изготовлены в другом варианте реализации для распыления и ингаляции. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения композиции помещены в контейнер с присоединенными средствами для распыления.

В одном варианте реализации настоящего изобретения препарат согласно настоящему изобретению изготовлен в виде композиций для ректального введения, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, стандартных основ для суппозиториев, такие как масло какао или другие глицериды. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции, пригодные для использования в соответствии с настоящим изобретением, включают композиции, в которых действующие ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения предполагаемой цели. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество означает количество действующих ингредиентов, которое является эффективным для предотвращения, облегчения или улучшения симптомов заболевания или продления продолжительности выживания субъекта, которого лечат.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения определение терапевтически эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей или их компонентов, включают сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и метилцеллюлоза; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; твердые смазывающие вещества, такие как стеариновая кислота и стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао-бобов; полиолы, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновую кислоту; эмульгаторы, такие как эмульгаторы марки Твин™; смачивающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия; красители; ароматизаторы; агенты для таблетирования, стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; и фосфатные буферные растворы. Выбор фармацевтически приемлемого носителя для использования в комбинации с соединением в основном определяется способом, с помощью которого должно быть введено соединение. В одном варианте реализации, если рассматриваемое соединение должно быть введено путем инъекции, то фармацевтически приемлемым носителем является стерильный физиологический раствор, содержащий совместимый с кровью суспендирующий агент, значение pH которого было доведено до приблизительно 7,4.

Помимо этого, композиции дополнительно содержат связующие агенты (например, гуммиарабик, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), дезинтегрирующие агенты (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, натриевую соль гликолята крахмала), буферы (например, Трис-HCl, ацетатный, фос-

фатный) с различными значениями pH и ионной силы, добавки, такие как альбумин или желатин, предотвращающие всасывание на поверхностях, ПАВ (например, Твин 20, Твин 80, плуроновую кислоту F68, соли желчных кислот), ингибиторы протеаз, сурфактанты (например, лаурилсульфат натрия), усилители проницаемости, солюбилизующие агенты (например, глицерин, полиэтиленгликоль), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), повышающие вязкость агенты (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, аспартам, лимонную кислоту), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), смазывающие агенты (например, стеариновую кислоту, стеарат магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), улучшающие сыпучесть агенты (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, натрий лаурилсульфат), полимерные покрытия (например, полоксамеры или полоксамины), агенты, образующие покрытия и пленки (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адьюванты.

Типичные компоненты носителей для сиропов, эликсиров, эмульсий и суспензий включают этанол, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, жидкую сахарозу, сорбит и воду. Типичные суспендирующие агенты для суспензии включают метилцеллюлозу, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, целлюлозу (например, Avicel™, RC-591), трагакант и альгинат натрия; типичные смачивающие агенты включают лецитин и полиоксиэтилен сорбитана (например, полисорбат 80). Типичные консерванты включают метилпарабен и бензоат натрия. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения пероральные жидкие композиции также содержат один или более компонентов, таких как подсластители, ароматизаторы и красители, раскрытые выше. Композиции также включают введение активного материала внутрь или на поверхность дисперсных препаратов полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, гидрогели и т.д., или на липосомы, микроэмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, эритроцитарные тени или сферопласты. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения в условиях *in vivo* и скорость клиренса в условиях *in vivo*.

В настоящем изобретении также предусмотрены дисперсные композиции, покрытые полимерами (например, полоксамерами или полоксаминами), и соединение, конъюгированное с антителами, направленными против тканеспецифичных рецепторов, лигандов или антигенов, либо конъюгированное с лигандами тканеспецифичных рецепторов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соединения модифицированы путем ковалентного присоединения водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, сополимеров полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозы, декстрана, поливинилового спирта, поливинилпирролидона или полипролина. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированные соединения проявляют, по существу, более длительный период полувыведения из сыворотки крови после внутривенной инъекции, чем соответствующие немодифицированные соединения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модификации также увеличивают растворимость соединений в водном растворе, устраняют агрегацию, повышают физическую и химическую стабильность соединения и значительно уменьшают иммуногенность и реакционную способность соединения. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения желаемой биологической активности в условиях *in vivo* достигают путем введения таких аддуктов полимер-соединение с меньшей частотой или в меньших дозах по сравнению с немодифицированным соединением.

Получение эффективного количества или дозы можно первоначально оценить на основании результатов количественных исследований в условиях *in vitro*. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения величина дозы может быть определена на моделях животных, и такая информация может быть использована для более точного определения подходящих доз у человека.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения токсичность и терапевтическая эффективность действующих ингредиентов, описанных в настоящем описании, может быть определена с помощью стандартных фармацевтических методик в условиях *in vitro*, в клеточных культурах или у экспериментальных животных. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения данные, полученные в таких количественных исследованиях в условиях *in vitro*, на клеточных культурах и в исследованиях на животных, могут быть использованы для определения диапазона дозировок для применения у человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения дозировки варьируются в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения точный состав, способ введения и дозировка могут быть выбраны лечащим врачом с учетом состояния пациента. [См, например, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1, p. 1].

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения в зависимости от степени тяжести и восприимчивости заболевания, подлежащего лечению, дозировка может включать одно или более введений, при этом курс лечения может продолжаться от нескольких дней до нескольких недель или до дос-

тижения излечения или ослабления патологического состояния.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество композиции для введения будет, как известно, зависеть от субъекта, подлежащего лечению, тяжести заболевания, способа введения, решения лечащего врача и т.д.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции, включая препараты согласно настоящему изобретению, изготовленные в совместимом фармацевтическом носителе, также получают, помещают в соответствующий контейнер и маркируют для лечения указанного заболевания.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид или его фрагмент, или его вариант (СТР-модифицированный), описанный в настоящем документе, представляет собой лиофилизированный (т.е. подвергнутый сублимационной сушке) препарат в комбинации со сложными органическими вспомогательными веществами и стабилизаторами, такими как неионные поверхностно-активные вещества (т.е. сурфактанты), различные сахара, органические полиолы и/или сывороточный альбумин человека. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, приготовленный в стерильной воде для инъекций. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, приготовленный в стерильном ФСБ для инъекций. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, приготовленный в стерильном 0,9% NaCl для инъекций.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, и сложные носители, такие как сывороточный альбумин человека, полиолы, сахара и анионные поверхностно-активные стабилизирующие агенты. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит СТР-полипептид или его фрагмент и лактобионовую кислоту и ацетатный /глициновый буфер. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, и аминокислоты, такие как аргинин или глутамат, которые увеличивают растворимость композиций интерферона в воде. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, и глицин или сывороточный альбумин человека (САЧ), буфер (например, ацетатный) и изотонический агент (например, NaCl). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, и фосфатный буфер, глицин и САЧ.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, стабилизируется при помещении в буферные растворы, имеющие значение pH от приблизительно 4 до 7,2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, находится в буферном растворе, имеющем значение pH от приблизительно 4 до 8,5. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, находится в буферном растворе, имеющем значение pH от приблизительно 6 до 7. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, находится в буферном растворе, имеющем значение pH приблизительно 6,5. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, стабилизируется аминокислотой в качестве стабилизирующего агента и в некоторых случаях солью (если аминокислота не содержит заряженную боковую цепь). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, представляет собой жидкую композицию, содержащую стабилизирующий агент, который представляет собой аминокислоту, в концентрации от приблизительно 0,3 до 5 мас. %.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, обеспечивает точность дозирования и безопасность продукта. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, обеспечивает биологически активный, стабильный жидкий состав для использования при введении путем инъекций. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит нелиофилизированный СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, предложенный в настоящем описании, представляет собой жидкий состав, обеспечивающий хранение в жидком состоянии в течение длительного периода времени, что облегчает хранение и транспортировку перед введением.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, предложенные в настоящем описании, включает твердые липиды в качестве вяжущего материала. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения инъектируемая фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, содержит твердые липиды в качестве вяжущего материала. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения получение липидных микрочастиц с помощью распылительной кристаллизации было описано Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991), 47-54), а затем был раскрыт способ получения липидных наноосадков для перорального введения (Speiser EP 0167825 (1990)). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используемые липиды хорошо переносятся организмом (например, глицериды, состоящие из жирных кислот, которые присутствуют в эмульсиях для парентерального питания).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит полимерные микрочастицы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит наночастицы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит липосомы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит липидную эмульсию. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит микросферы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит липидные наночастицы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит липидные наночастицы, содержащие амфифильные липиды. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид или его фрагменты, описанные в настоящем описании, содержит липидные наночастицы, содержащие лекарственный препарат, липидный носитель и поверхностно-активное вещество. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения содержание моноглицеридов в липидном носителе составляет по меньшей мере 50% мас./мас.

В одном варианте реализации настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению представлены в упаковке или дозирующем устройстве, таком как набор, одобренный Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), которые содержат одну или более стандартных лекарственных форм, содержащих действующий ингредиент. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения упаковка, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения к упаковке или дозирующему устройству прилагаются инструкции по введению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения к упаковке или дозирующему устройству прилагается информационное письмо, относящееся к контейнеру, в форме, предписанной правительственным учреждением, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов, такое информационное письмо свидетельствует об одобрении указанным учреждением формы композиций или возможности их применения у человека или животных. Такое информационное письмо, в одном варианте реализации, представляет собой маркировку, одобренную FDA для лекарственных препаратов, отпускаемых по рецепту, или одобренный листок-вкладыш. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения будет понятно, что полипептиды или их фрагменты, предложенные в настоящем описании, могут быть обеспечены индивидууму с дополнительными активными агентами, чтобы достичь улучшенного терапевтического эффекта, по сравнению с лечением с использованием каждого агента по отдельности. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предпринимаются определенные меры (например, дозирование и подбор дополнительного агента), чтобы избежать развития нежелательных побочных явлений, которые связаны с видами комбинированной терапии.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "приблизительно" означает в количественном выражении $\pm 5\%$, или в другом варианте $\pm 10\%$, или в другом варианте $\pm 15\%$, или в другом варианте $\pm 20\%$.

Термин "субъект" относится в одном варианте к млекопитающему, включая человека, которое нуж-

дается в терапии для лечения или восприимчиво к заболеванию или его осложнениям. Субъект может включать собак, кошек, свиней, коров, овец, коз, лошадей, крыс, мышей и человека. Термин "субъект" не исключает индивидуума, который является нормальным во всех отношениях.

Дополнительные цели, преимущества и новые отличительные черты настоящего изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники после рассмотрения следующих примеров, которые не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Помимо этого, каждый из различных вариантов реализации и аспектов настоящего изобретения, описанных выше и заявленных в формуле изобретения, находит экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

Примеры

Материалы и методы.

Получение различных СТР-модифицированных белков.

Кодирующую область ДНК гормона роста человека (СТГ человека), эритропоэтина (ЭПО), апо-А1, фактора IX и фактора VII лигировали с последовательностью ДНК пептида СТР. Пептид СТР гибридизовали с N-концом и/или C-концом в виде единичной копии или нескольких копий последовательно, как подробно описано в табл. 2. Модифицированные плазмиды трансфицировали и экспрессировали в клеточной линии СНО, что обеспечивает образование надлежащей структуры О-гликанов, которые играют важную роль в увеличении гидродинамического объема белков (см. табл. 5). Различные белки очищали в соответствии со специализированными способами, которые были разработаны индивидуально для каждого из белков, как описано ниже: СТР-ЭПО-СТР-СТР: Осветленный биологический материал загружали на колонку Blue Sepharose. Элюированный продукт разбавляли и наносили на колонку Q Sepharose. Элюированную фракцию из колонки Q-Sepharose обрабатывали путем ультрафильтрации с использованием устройства для центрифугирования Amicon (порог пропускания 30 кДа) и подвергали диализу. Концентрированную и диализованную фракцию наносили на колонку с фенилсефарозой. Элюированную фракцию после пропускания через фенилсефарозу обрабатывали путем ультрафильтрации с использованием устройства для центрифугирования Amicon (порог пропускания 30 кДа) и подвергали диализу против ФСБ с pH 7.

СТР-СТР-ЭПО и СТР-СТР-ЭПО-СТР-СТР: Осветленный биологический материал наносили на колонку с DEAE-сефарозой и элюировали. Элюированную фракцию кондиционировали сульфатом аммония и наносили на колонку с фенилсефарозой HS. Элюированный фенил концентрировали и подвергали диализу. Следующие две колонки использовали в проточном режиме: гидроксипатит I типа с размером частиц 40 мкм и сефароза SP. Готовый продукт концентрировали, подвергали диализу и хранили при -20°C.

АПО-СТР и АПО-СТР-СТР: Данные два варианта белков АПО очищали с использованием колонки для аффинной хроматографии (Capture Select Apo, Bac). Осветленный биологический материал разбавляли ФСБ в соотношении 1:1 и элюировали из колонки. Элюат концентрировали, подвергали диализу против ФСБ и хранили при -80°C.

СТР-СТГ человека-СТР-СТР: Осветленный биологический материал фильтровали на первом этапе ультрафильтрации/диафильтрации (UFDF-1). Обеспечивали инактивацию вируса. Первый хроматографический этап представляет собой анионообменную хроматографию с использованием DEAE-сефарозы FF. Смола для второго хроматографического этапа представляет собой фенилсефарозу. Объединенную элюированную фракцию после второго хроматографического этапа подвергают диафильтрации и концентрируют на втором этапе ультрафильтрации/диафильтрации (UFDF-2). После UFDF-2 выполняют еще два хроматографических этапа, используя керамический гидроксипатит (СНТ) I типа с размером частиц 40 мкм и SP Sepharose FF, в проточном режиме. Проводили нанофильтрацию. Раствор продукта концентрируют до 41 ± 1 мг/мл и подвергают диализу.

ФИХ-СТР-СТР-СТР: Трис-HCl, pH 9, добавляли к осветленному биологическому материалу. Первую колоночную хроматографию проводили, используя анионообменную колонку Q. Следующая колонка была заполнена Нерагин НуперD®. Элюированную фракцию доводили до конечной концентрации 10 мМ фосфатом натрия с конечным значением pH 6,8. Последний хроматографический этап проводили на смоле СНТ. Элюированную фракцию концентрировали и подвергали диализу против TBS с pH 7,5.

ФИХ-СТР-СТР-СТР-СТР: Осветленный биологический материал концентрируют и подвергают диализу. Единственный хроматографический этап представляет собой аффинную хроматографию на иммобилизованном джакаине. Элюированный продукт концентрировали и подвергали диализу против TBS с pH 7,5.

ФИХ-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР: Осветленный биологический материал концентрируют и подвергают диализу. Единственный хроматографический этап представляет собой аффинную хроматографию на иммобилизованном джакаине. Элюированный продукт концентрировали и подвергали диализу против TBS с pH 7,5.

Апо-А1-СТР-СТР: Осветленный биологический материал концентрируют и подвергают диализу. Первый хроматографический этап проводили с использованием анионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Sepharose FF. Второй хроматографический этап проводили на смоле с иммобилизованным

джакалином. Элюат подвергали диафильтрации и концентрировали в ходе UFDF-2 против TBS с pH 7,4.

АпоА1-СТР: Первый хроматографический этап проводили с использованием аффинной хроматографии на колонке CaptureSelect™ Апо-А1. Второй хроматографический этап проводили на смоле с иммобилизованным джакалином. Элюат подвергали диафильтрации и концентрировали в ходе UFDF-2 против TBS с pH 7,4.

АпоА1: Разбавленный биологический материал наносили на колонку для аффинной хроматографии CaptureSelect™ Апо-А1. Элюат подвергали диафильтрации и концентрировали в ходе UFDF-2 против TBS pH 7,4.

ФVIIa-СТР-СТР-СТР: Осветленный биологический материал концентрировали и подвергали диализу. Осуществляли инактивацию вируса. Первый хроматографический этап проводили с использованием колонки для аффинной хроматографии, VII Select. Элюированную фракцию разбавляли перед нанесением на следующую колонку с керамическим гидроксипатитом (СНТ). Элюат после СНТ наносили на колонку с фенилсефарозой. Элюат подвергали диафильтрации и активировали на колонке для анионообменной хроматографии. Затем колонку промывали, и элюировали продукт. Проводили нанофильтрацию.

ФVIIa-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР: Осветленный биологический материал концентрировали и подвергали диализу. Первый хроматографический этап проводили с использованием колонки для аффинной хроматографии, VII Select. Элюированную фракцию наносили на следующую колонку с керамическим гидроксипатитом (СНТ). Колонку промывали, и элюировали продукт. Элюат после СНТ наносили на колонку с фенилсефарозой. Элюат подвергают диафильтрации и концентрируют. Фактор VII активировали на колонке для анионообменной хроматографии. Затем колонку промывали и элюировали продукт.

Таблица 2. Схематическое описание СТР-модифицированного белка.

Схематическое описание плазмиды
СТР-СТГ человека-СТР-СТР (MOD-4023)
СТР-СТР-ЭПО
СТР-ЭПО-СТР-СТР
СТР-СТР-ЭПО-СТР-СТР
Апо-СТР
Апо-СТР-СТР
ФИХ-СТР-СТР-СТР
ФИХ-СТР-СТР-СТР-СТР
ФИХ-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР
ФVIIa-СТР-СТР-СТР
ФVIIa-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР

Дегликозилирование СТР-модифицированных белков.

Дегликозилирование СТР-модифицированных белков проводили с использованием сиалидазы A Glyko (каталожный номер PZ PZGK80040, Prozyme), О-гликаназы (каталожный номер PZ PZGK80090, Prozyme) и N-гликаназы (каталожный номер PZGKE-5006A, Prozyme). Белки расщепляли в течение 2 ч (при 37°C) в присутствии сиалидазы А с последующим расщеплением О-гликаназой и, если необходимо, N-гликаназой в течение ночи.

Определение молекулярной массы с помощью MALDI-TOF.

Молекулярные массы (ММ) СТР-модифицированных белков измеряли с помощью методики MALDI-TOF с использованием модели REFLEX-IV (Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Масс-спектрометрия с времяпролетной ионизацией лазерной десорбцией с использованием матрицы (MALDI-TOF MS) представляет собой методику, при которой совместный осадок матрицы, поглощающей УФ-свет, и биомолекулы, сходной с протеинами или пептидом, облучается лазерным импульсом. Ионизированные биомолекулы ускоряются в электрическом поле и попадают в пролетную трубку. Во время полета в этой трубке различные молекулы разделяются в соответствии с их отношением массы к заряду и достигают детектора в различные моменты времени. Таким образом, каждая молекула дает отдельный сигнал, который может быть преобразован в значение молекулярной массы. Метод используется для характеристики различных белков и пептидов с молекулярными массами от 400 до 350000 Да. Это очень чувствительный метод, который позволяет обнаруживать небольшие (от 10^{-15} до 10^{-18} моль) количества образца с точностью 0,1-0,01%. Измерения проводили в подразделении аналитических научных исследований (Университет Бен-Гуриона, Беэр-Шева, Израиль).

Анализ гидродинамического размера методом ВЭЖХ с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии.

Гидродинамический размер белков измеряли с помощью ВЭЖХ (Dionex UltiMate 3000), используя эксклюзионную колонку TSKgel G2000SW (каталожный номер 08540, TosohHaas) для нативных и родст-

венных СТР-модифицированных белков СТГ человека, ЭПО и Апо или эксклюзионную колонку TSKgel G3000WXL (каталожный номер 08541, TosoHaas) для нативных и родственных СТР-модифицированных белков фактора IX и фактора VII. Калибровочный набор для высокомолекулярных соединений (каталожный номер 151-1901, BioRad) использовали для измерения размеров белков. Результаты аппроксимировали с использованием логарифмической функции ($y=a*\ln X+b$) и рассчитывали гидродинамические размеры различных белков.

Результаты

Пример 1. Получение различных СТР-модифицированных белков.

11 различных СТР-модифицированных белков трансфицировали и экспрессировали в клеточной линии СНО. Биологический материал для различных белков очищали в соответствии со способами, описанными выше. Очищенные белки показаны на фиг. 1 и 2.

Пример 2. Исследование молекулярной массы методом MALDI-TOF.

Молекулярную массу различных белков, модифицированных гликозилированными и негликозилированными СТР, определяли с использованием методики MALDI-TOF и сравнивали со значениями для соответствующих нативных белков (интактные белки, не гибридные с СТР, в частности биотропин для СТГ человека, ЭПРЕКС (EPREX®) для ЭПО, Апо-А1, мононин (Mononine®) для фактора IX и новосевен (NovoSeven®) для фактора VIIa), см. значения молекулярных масс в табл. 3. Измеренные молекулярные массы для всех нативных и негликозилированных белков соответствовали теоретическим значениям молекулярной массы, рассчитанной на основании аминокислотных последовательностей белков. Рассчитывали приращения молекулярных масс в расчете на одну копию негликозилированного и гликозилированного СТР, результаты показаны на фиг. 3А и 3В соответственно. Вклад одной копии СТР в величину молекулярной массы рассчитывали следующим образом: во-первых, приращение молекулярной массы рассчитывали путем вычитания величины измеренной, или теоретической, в случае нативного СТГ человека, молекулярной массы нативных белков из измеренной молекулярной массы соответствующих СТР-модифицированных белков. Затем рассчитанное приращение делили на количество копий СТР для каждого белка. Например, MOD-4023 (СТГ человека, который был гибризован с одной копией СТР на N-конце и 2 копиями СТР, расположенными последовательно, на C-конце) имеет молекулярную массу 38128 Да, тогда как нативный СТГ человека имеет теоретическую молекулярную массу 22000 Да. Разница между двумя этими белками составляет 16,13 кДа, это означает, что вклад каждого гликозилированного СТР составляет 5,4 кДа (значение 16,13 разделенное на 3 копии СТР). Средний вклад одной копии негликозилированного СТР во всех измеренных белках составляет $2,76 \pm 0,103$ кДа (фиг. 3А, табл. 3). Этот результат соответствует теоретической молекулярной массе одного СТР, которая составляет 2,78 кДа. Гликозилированный СТР способствует увеличению молекулярной массы в среднем на $4,76 \pm 0,422$ кДа (фиг. 3В, табл. 3), без существенных различий между различными измеренными белками.

Таблица 3. Результаты определения молекулярной массы белков, модифицированных негликозилированными и гликозилированными СТР, и соответствующих им нативных белков с помощью MALDI-TOF.

Описание белков	Теоретическая ММ (на основании белковой цепи, исключая вклад гликана)	Негликозилированные белки. Результаты MALDI-TOF (Да)	Гликозилированные белки. Результаты MALDI-TOF (Да)	Приращение ММ на одну копию негликозилированного СТР	Приращение ММ на одну копию гликозилированного СТР
Биотропин (СТГ человека)	22000	ND	ND	ND	ND
СТР-СТГ человека-СТР-СТР (MOD-4023)	30469,4	30525	38128	2,8	5,4
ЭПРЕКС® (р ЭПО)	18396	18246	29160	0,0	0,0
СТР-СТР-ЭПО	23956	23690	37074	2,7	4,0

СТР-ЭПО-СТР-СТР	26736	27300	43547,8	3,0	4,8
Апо АІ	28078	28021,5	28024,5	0,0	0,0
Апо-СТР	30858	30686,5	32505	2,7	4,5
Апо-СТР-СТР	33638	33569	36710	2,8	4,3
Мононин® (рФІХ)	48695,6	47172	53270	0,0	0,0
ФІХ-СТР-СТР-СТР	57036	55626,5	68876	2,8	5,2
ФІХ-СТР-СТР-СТР-СТР	59816,2	58346,5	73552,5	2,8	5,1
ФІХ-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР	62596,2	61051,5	77797	2,8	4,9
Новосевен® (рФVІІа)	47222,6	45899	50310,4	0,0	
ФVІІа-СТР-СТР-СТР	58343,1	53755,5	64302	2,6	4,7
ФVІІа-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР	61123,2	59266	74431	2,7	4,8
			Среднее	2,76	4,76
			Ст. откл.	0,103	0,422
			%КВ	3,72	8,87

ND - не определено.

Пример 3. Исследование гидродинамического размера методом ВЭЖХ.

Гидродинамический объем является основным параметром, влияющим на время удержания (RT) белков, при прохождении через эксклюзионную колонку. Поэтому размеры белков рассчитывали с помощью эксклюзионной колонки, используя калибровочный набор для высокомолекулярных соединений для гель-эксклюзионной хроматографии (каталожный номер 151-1901, BioRad). Время удержания стандартов измеряли в обеих эксклюзионных колонках TSK 2000 и TSK 3000, и для определения прецизионности аналитических методов рассчитывали % относительной погрешности (% RE) для каждой колонки. Процент относительной погрешности наблюдаемой молекулярной массы калибровочных белков рассчитывали и сравнивали с известными и ожидаемыми значениями молекулярных масс калибровочных белков. Результаты расчетов ММ для калибровочной кривой и %RE представлены в табл. 4а для эксклюзионной колонки TSK 2000 и в табл. 4б для эксклюзионной колонки TSK 3000. Результаты показывают, что значение %RE было ниже или равно 20% ($\leq 20\%$), это указывает на высокую прецизионность для широкого диапазона молекулярных масс белков, определенных в данных исследованиях.

Таблица 4а. Результаты калибровочной кривой для высокомолекулярных соединений и рассчитанные величины %RE, полученные с использованием TSK 2000. Ожидаемая молекулярная масса белков калибровочной кривой была указана в коммерческом наборе, который был использован (калибровочный набор для высокомолекулярных соединений, каталожный номер 151-1901 BioRad).

Стандартные белки	Ожидаемая ММ	Время удержания	Наблюдаемая ММ	%RE
Гамма-глобулин	158000	15,535	155279,16	-1,72
Овальбумин	44000	18,535	52924,39	20,28
Миоглобулин	17000	22,315	13635,14	-19,79
Витамин В12	1350	28,61	1424,88	5,55

Таблица 4б. Результаты калибровочной кривой для высокомолекулярных соединений и рассчитанные величины %RE, полученные с использованием колонки TSK 3000. Ожидаемая молекулярная масса белков калибровочной кривой была указана в коммерческом наборе, который был использован (калибровочный набор для высокомолекулярных соединений, каталожный номер 151-1901 BioRad).

Стандартные белки	Ожидаемая ММ	Время удержания	Наблюдаемая ММ	%RE
Тиреоглобулин	670000	11,925	753500	12,46
Гамма-глобулин	158000	16,250	126808	-19,74
Овальбумин	44000	18,702	46172	4,94
Миоглобулин	17000	21,012	17824	4,85

Для того чтобы определить вклад гликозилированного СТР в величину гидродинамического объема СТР-модифицированных белков, различные СТР-модифицированные белки исследовали с помощью эксклюзионной колонки, и рассчитывали их гидродинамические размеры. Соответствующие рекомбинантные белки: биотропин (рГРЧ), ЭПРЕКС® (рЭПО), Апо-А1, мононин® (рФІХ) и новосевен® (рФVІІа) исследовали параллельно с соответствующими СТР-модифицированными белками, чтобы вычислить вклад гликозилированного СТР в величину гидродинамического размера белка (табл. 5, фиг. 4). На фиг. 4А представлено полное приращение гидродинамического размера СТР-модифицированных белков по сравнению с нативными белками, согласно результатам измерения с помощью эксклюзионной колонки.

Таблица 5. Результаты ВЭЖХ с эксклюзионной хроматографией и рассчитанное приращение на одну копию СТР для СТР-модифицированных белков и соответствующих им нативных белков.

Гликозилированные белки	ММ согласно ВЭЖХ-ЭХ (Да)	Увеличение в кДа на один гликозилированный СТР
Биотропин (рГРЧ)	21116	Нет данных
СТР-СТГ человека-СТР-СТР (MOD-4023)	107750	28,9
ЭПРЕКС® (рЭПО)	79014	Нет данных
СТР-СТР-ЭПО	146616	33,8
СТР-ЭПО-СТР-СТР	168032	29,7
СТР-СТР-ЭПО-СТР-СТР	199970	30,2
Апо	62086	Нет данных
Апо-СТР	100233	38,1
Апо-СТР-СТР	141094	39,5
Мононин® (рФІХ)	117553	Нет данных
ФІХ-СТР-СТР-СТР	261982	48,1
ФІХ-СТР-СТР-СТР-СТР	329362	53,0
ФІХ-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР	381095	52,7
Новосевен® (рФVІІа)	76706	Нет данных
ФVІІа-СТР-СТР-СТР	206645	43,3
ФVІІа-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР	325602	49,8

Приращение молекулярной массы на одну копию гликозилированного СТР рассчитывали путем вычитания измеренного гидродинамического размера нативных белков из измеренного гидродинамического размера соответствующих им СТР-модифицированных белков. Затем рассчитанное приращение делили на количество копий СТР для каждого белка. Рассчитанные вклады одной копии гликозилированного СТР в величину молекулярной массы различных белков представлены на фигуре 4В. Различные белки имеют величины приращения, которые варьируются от 29 до 53 кДа на одну копию гликозилированного СТР.

Интересным и неожиданным фактом явилось то, что вклад одной копии гликозилированного СТР для фактора ІХ и фактора VІІа был существенно выше и составил 43-53 кДа (на одну копию СТР) по сравнению с другими измеренными белками (табл. 5). Приращение гидродинамического размера на одну копию гликозилированного СТР значительно выше, чем рассчитанный вклад в величину молекулярной массы, равный 4,76 кДа на одну копию гликозилированного СТР, согласно результатам измерения с помощью MALDI-TOF. Различия в величинах рассчитанной ММ между разными методами являются результатом того факта, что, в то время как MALDI-TOF измеряет фактическую ММ белка, на результаты измерения с помощью ВЭЖХ-ЭХ влияет гидродинамический объем белка, это позволяет предположить, что гликозилированный СТР существенно увеличивает гидродинамический объем белков, к которым он присоединен. Величина гидродинамического объема приблизительно в 6-11 раз выше по сравнению с

рассчитанным вкладом на одну копию СТР, измеренным с помощью MALDI-TOF. Следует отметить, что вклад СТР в величину гидродинамического размера модифицированного белка был ниже для СТГ человека и СТР-модифицированных вариантов ЭПО (приблизительно 30 кДа), но немного выше для ФІХ и СТР-модифицированных вариантов ФVІІ и, неожиданно, не зависел от количества копий СТР, добавленных к конкретному белку.

Помимо этого, вклад негликозилированного СТР в величину ММ белка определяли с помощью ВЭЖХ-ЭХ (табл. 6, фиг. 5А и 5В). Дегликозилирование проводили путем инкубации белков с сиалидазой А (чтобы удалить сиаловую кислоту) в течение 2 ч при 37°C с последующим добавлением О-гликаназы (для удаления О-гликанов). В случае ЭПРЕКС® (рЭПО), мононина® (рФІХ), новосевен® (рФVІІ) и соответствующих им СТР-модифицированных белков, которые содержат N-гликаны, N-гликаназу добавляли для расщепления в течение ночи, чтобы удалить N-гликаны. Вклад негликозилированного СТР в величину гидродинамического размера или объема различных белков рассчитывали и сравнивали с величинами для соответствующих нативных белков, т.е. вклад модифицированных полипептидов, содержащих негликозилированный СТР, в величину гидродинамического объема рассчитывали путем сравнения гидродинамического объема модифицированных полипептидов, содержащих негликозилированный СТР, с величиной для соответствующего негликозилированного нативного белка. Например, для ЭПО из молекулы ЭПРЕКСА® удаляли N- и О-гликаны, и увеличение гидродинамического объема СТР-модифицированных вариантов ЭПО рассчитывали и сравнивали с их молекулярной массой.

На фиг. 5А показано приращение гидродинамического размера интактных белков, в то время как на фиг. 5В показан вклад одной копии для модифицированных белков, содержащих негликозилированный СТР. Примечательно, что негликозилированный СТР увеличивает гидродинамический размер СТР-модифицированных белков, при сравнении с соответствующими нативными белками. Рассчитанный вклад одной копии негликозилированного СТР отличался для различных белков, варьируясь от 8 до 21 кДа на одну копию негликозилированного СТР (табл. 6). Учитывая, что теоретическая молекулярная масса СТР, который состоит из 28 аминокислот, составляет 2,78 кДа, и измеренная молекулярная масса (согласно данным MALDI-TOF) также составляла 2,76 кДа, эти результаты показывают, что вклад негликозилированного СТР в величину молекулярной массы выше, чем ожидалось. Кроме того, аналогично результатам, наблюдаемым для гликозилированного СТР, было установлено, что гидродинамический объем также гораздо выше, чем ожидалось для негликозилированного СТР. В целом, присоединение СТР к белку приводит к увеличению гидродинамического объема, которое связано как с основной аминокислотной цепью СТР, так и с остатками гликанов на СТР.

Также было отмечено, что количество пептидов СТР, присоединенных к конкретному белку, не влияет на вклад в величину гидродинамического размера этого белка. Наиболее значительное приращение для негликозилированного СТР наблюдали для Апо, ФІХ и ФVІІ, которые содержат копии СТР на С-конце белка. Результат, что добавление СТР на С-конце приводит к большему вкладу в величину гидродинамического объема, был неожиданным. Интересным и неожиданным фактом явилось то, что величина вклада одной копии негликозилированного СТР была сопоставимой и составила ~20 кДа для СТР-модифицированных белков Апо, ФІХ и ФVІІа (табл. 6), однако вклад гликозилированного СТР для факторов свертывания крови был значительно выше по сравнению с вкладом гликозилированного СТР для Апо (табл. 5).

Таблица 6. Результаты ВЭЖХ-ЭХ и рассчитанное приращение на одну копию СТР для модифицированных белков, содержащих негликозилированный СТР, и соответствующих им нативных белков.

Негликозилированные белки	ВЭЖХ-ЭХ ММ (Да)	Увеличение в кДа на один негликозилированный СТР
Биотропин (рГРЧ)	21116	Нет данных
СТР-СТГ человека-СТР-СТР (MOD-4023)	45480	8,1
ЭПРЕКС® (рЭПО)	18083	Нет данных
СТР-СТР-ЭПО	49472	15,7

СТР-ЭПО-СТР-СТР	65991	16,0
СТР-СТР-ЭПОСТР-СТР	85228	16,8
Апо	61267	Нет данных
Апо-СТР	82846	21,6
Апо-СТР-СТР	104007	21,4
Мононин® (рFIX)	79539	Нет данных
FIX-СТР-СТР-СТР	138132	19,5
FIX-СТР-СТР-СТР-СТР	160115	20,1
FIX-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР	186677	21,4
Новосевен® (рFVIIa)	52570	Нет данных
FVIIa-СТР-СТР-СТР	107321	18,3
FVIIa-СТР-СТР-СТР-СТР-СТР	158706	21,2

Это исследование показало, что одна копия гликозилированного СТР увеличивает гидродинамический объем по меньшей мере на 28 кДа, при этом приращение ММ составляет $4,76 \pm 0,422$ кДа согласно результатам определения с помощью ВЭЖХ-ЭХ и MALDI-TOF соответственно. Такая неожиданная величина гидродинамического объема СТР-модифицированных белков, вероятно, обуславливает наблюдаемый более длительный период полувыведения из сыворотки крови и усиление биологической активности СТР-модифицированных белков. Негликозилированный СТР увеличивает гидродинамический объем по меньшей мере на 8 кДа, в то время как приращение молекулярной массы составляет $2,76 \pm 0,103$ кДа. Интересно отметить, что ММ негликозилированного и гликозилированного пептида СТР, согласно результатам измерения с помощью MALDI-TOF, была сопоставимой для всех белков. Кроме того, гидродинамический объем модифицированных белков, содержащих гликозилированный и негликозилированный пептид СТР, согласно результатам измерения с помощью ВЭЖХ-ЭХ, был различным. Эти результаты показывают, что, несмотря на аналогичные значения ММ пептида СТР, при гибридизации с различными белками в различных положениях, данный пептид вызывает неожиданное увеличение гидродинамического объема различных белков, к которым он присоединен, согласно результатам измерений с помощью эксклюзионной хроматографии.

Учитывая вышеизложенное описание предпочтительных вариантов реализации изобретения, приведенное со ссылкой на прилагаемые чертежи, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается точными вариантами реализации, и различные изменения и модификации могут быть осуществлены специалистами в данной области техники, не отступая от объема или сущности настоящего изобретения, которые определены в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ постепенного увеличения гидродинамического размера рекомбинантного полипептида, выбранного из группы, состоящей из фактора коагуляции IX (FIX) и фактора коагуляции VIIa (FVIIa), включающий стадию рекомбинантной гибридизации:

а) трех блоков карбоксиконцевых пептида (СТР) хорионического гонадотропина с карбоксиконцом указанного фактора коагуляции IX (FIX) без гибридизации СТР блоков с N-концом фактора коагуляции IX (FIX) или

б) трех СТР блоков с карбоксиконцом указанного фактора коагуляции VIIa (FVIIa) без гибридизации СТР блоков с N-концом фактора коагуляции VIIa (FVIIa),

с последующей стадией гликозилирования указанных блоков СТР путем экспрессии рекомбинантного СТР-модифицированного полипептида в клетке-хозяине яичника китайского хомячка (CHO), где гликозилирование включает О-гликозилирование; где гликозилированные СТР блоки постепенно увеличивают гидродинамический размер FIX приращением на 48-53 кДа на каждый из указанных гликозилированных СТР блоков и постепенно увеличивают гидродинамический размер FVIIa приращением на 43-50 кДа на каждый из указанных гликозилированных СТР блоков, таким образом увеличивая гидродинамический размер указанного рекомбинантного полипептида.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное О-гликозилирование представляет собой присоединение N-ацетилгалактозамина (GalNAc) к серину (Ser) или треонину (Thr) в полипептидной цепи с помощью α -гликозидной связи.

3. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что указанное О-гликозилирование представляет собой гликозилирование по 1 положению главной цепи, О-фукозилирование, О-маннозилирование или О-гликозилирование.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное О-гликозилирование сопровождается добавлением от 1 до 60 молекул галактозы или добавлением от 1 до 120 молекул сиаловой кисло-

ты или их комбинацией.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что увеличение гидродинамического размера увеличивает время удержания указанного рекомбинантного полипептида в биологическом образце или увеличивает биодоступность указанного рекомбинантного полипептида или их комбинации.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный биологический образец представляет собой кровь, спинномозговую жидкость (СМЖ), лимфу или сыворотку крови.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность по меньшей мере одного из указанных блоков СТР выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

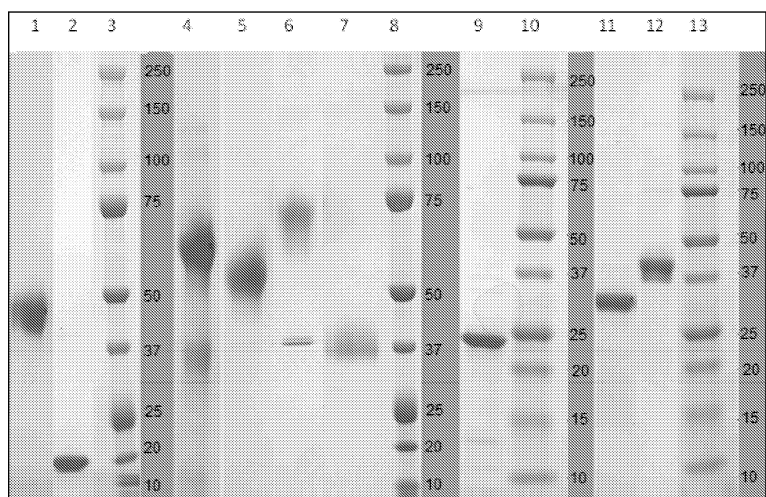
8. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных блоков СТР является усеченным и его аминокислотная последовательность содержит первые десять аминокислот SEQ ID NO: 3 (SSSSKAPPPS).

9. Способ по любому из пп.1-8, где по меньшей мере один из указанных блоков СТР присоединен к указанному рекомбинантному полипептиду через линкер.

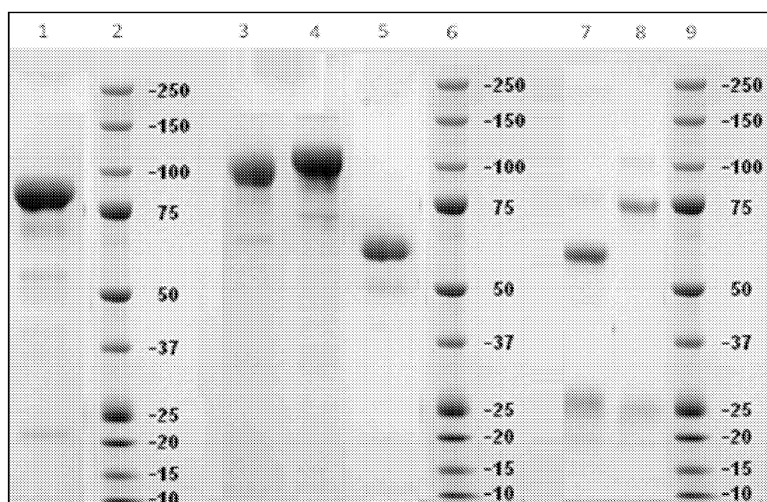
10. Способ по п.9, где указанный линкер представляет собой пептидную связь.

11. Способ по любому из пп.1-10, где указанный рекомбинантный СТР-модифицированный ФІХ полипептид имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 61, или последовательность, которая по меньшей мере 95% гомологична ей.

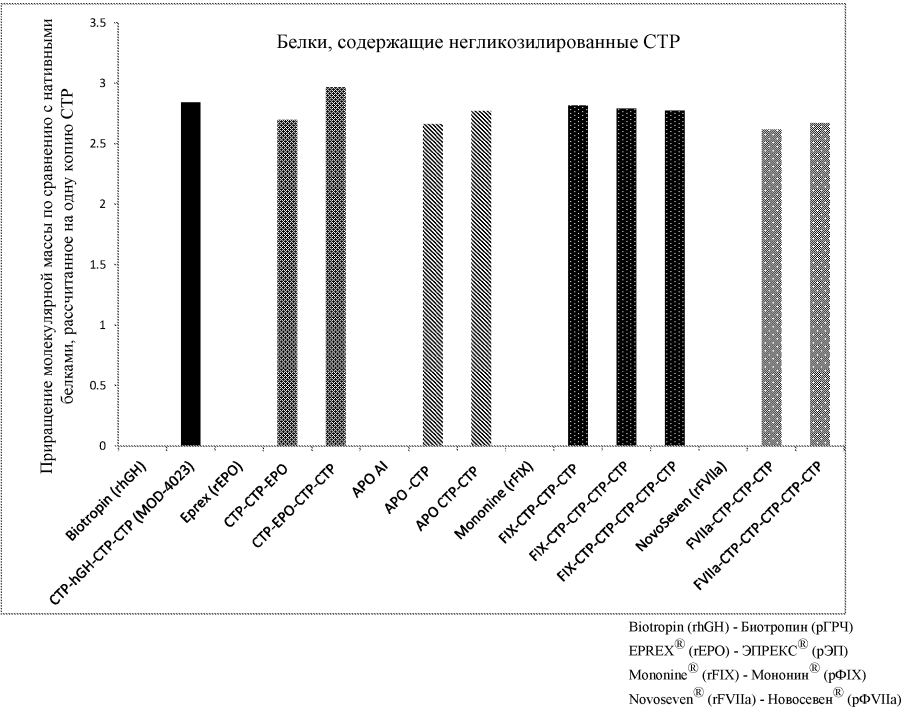
12. Способ по любому из пп.1-10, где указанный рекомбинантный СТР-модифицированный FVIIa полипептид имеет аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 52, или последовательность, которая по меньшей мере 95% гомологична ей.



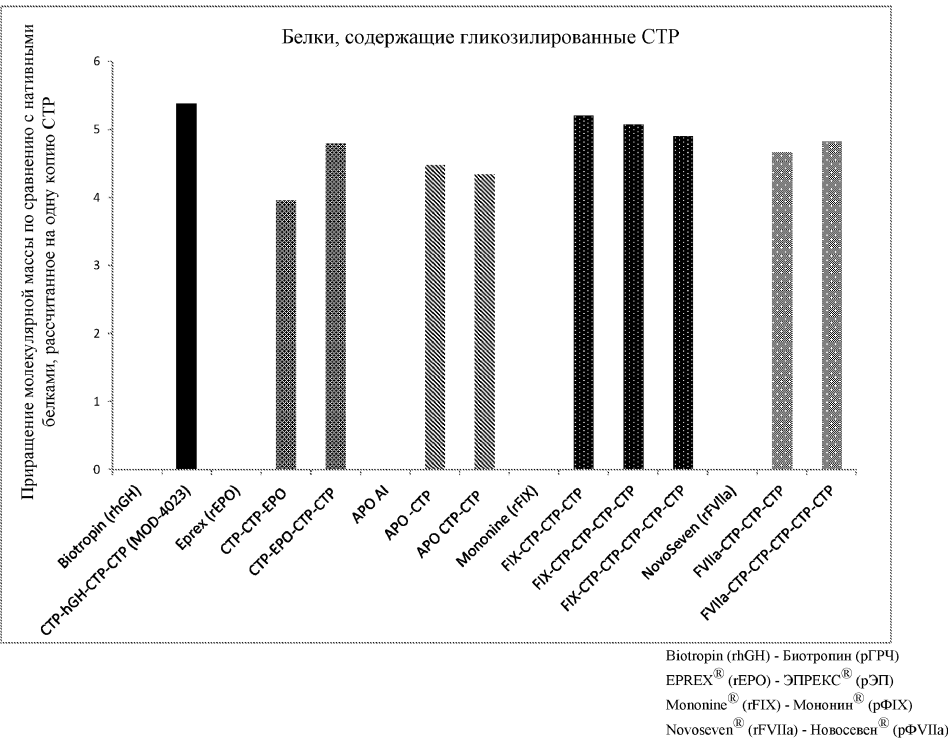
Фиг. 1



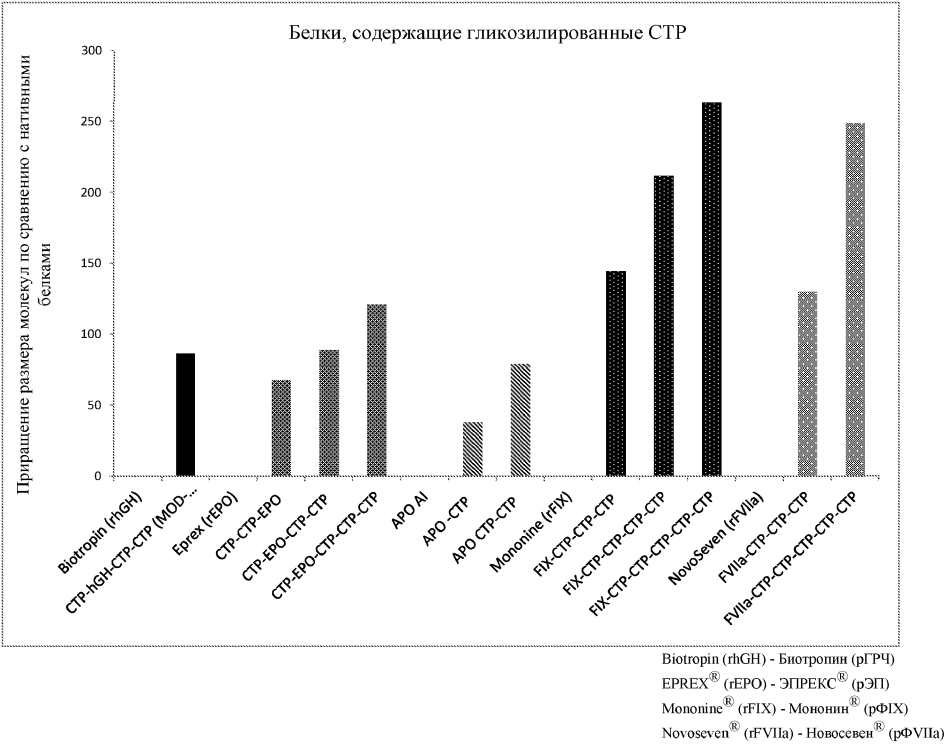
Фиг. 2



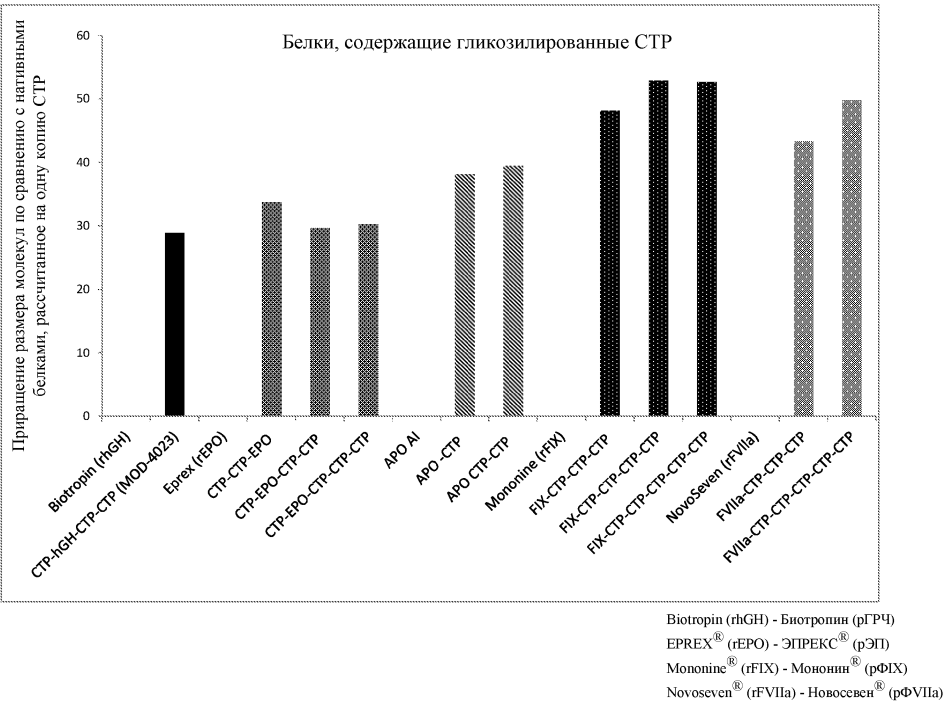
Фиг. 3А



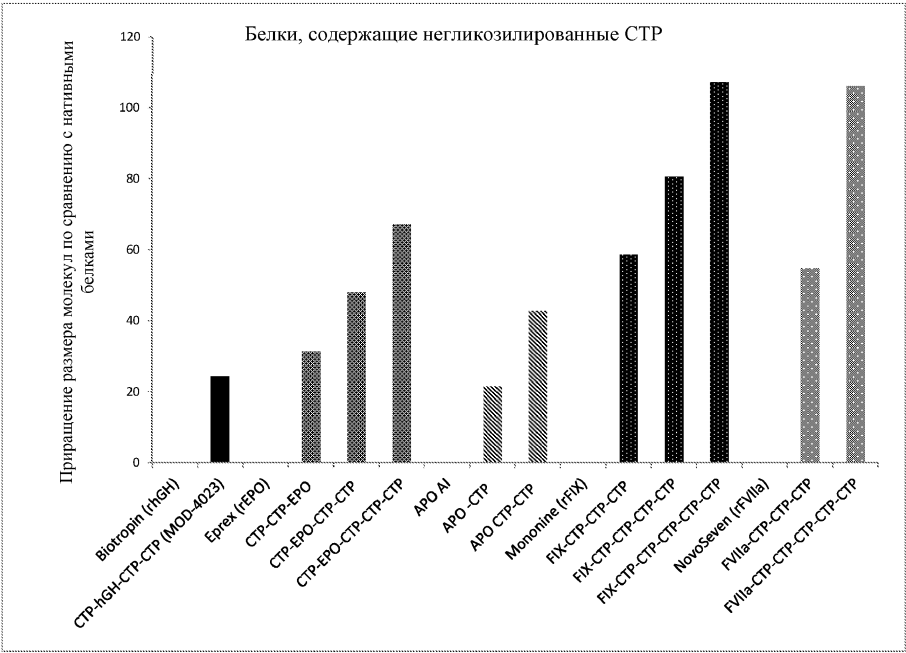
Фиг. 3В



Фиг. 4А

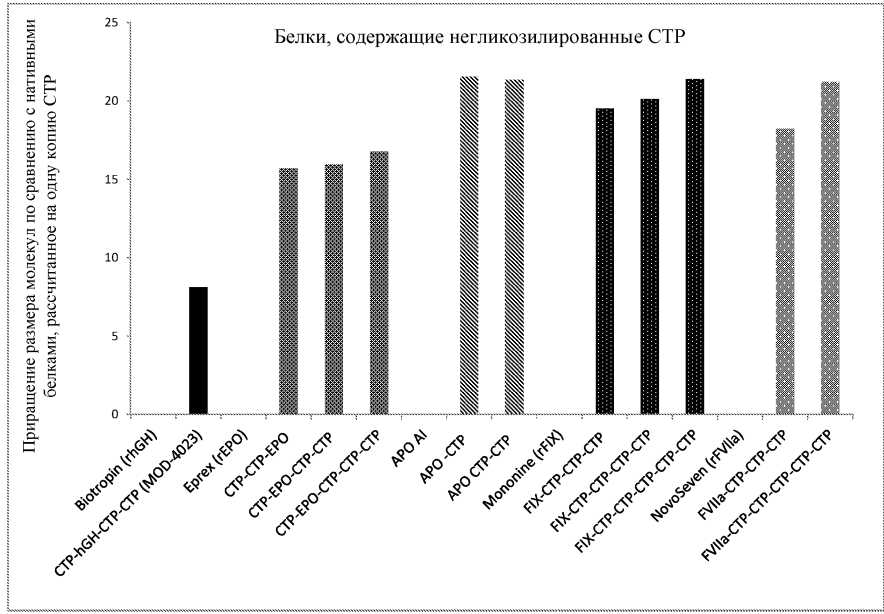


Фиг. 4В



Biotropin (rhGH) - Биотропин (pГРЧ)
EPREX[®] (rEPO) - ЭПРЕКС[®] (pЭП)
Mononine[®] (rFIX) - Мононин[®] (pФИХ)
Novoseven[®] (rFVIIa) - Новосевен[®] (pФVIIa)

Фиг. 5А



Biotropin (rhGH) - Биотропин (pГРЧ)
EPREX[®] (rEPO) - ЭПРЕКС[®] (pЭП)
Mononine[®] (rFIX) - Мононин[®] (pФИХ)
Novoseven[®] (rFVIIa) - Новосевен[®] (pФVIIa)

Фиг. 5В

